

Optimització de tecnologies d'imatge per espectrometria de masses per a una futura aplicació en toxicologia ambiental

Optimization of mass spectrometry imaging technologies for future application in environmental toxicology studies

Albert Menéndez-Pedriz,¹ Christoph Bookmeyer,² Michiel Vandenbosch,³ Eduardo Chicano-Gálvez,⁴ Ron M. A. Heeren,³
Laia Navarro-Martín i Joaquim Jaumot¹

¹ Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis de l'Aigua. Consell Superior d'Investigacions Científiques (IDAEA-CSIC).
Departament de Química Ambiental

² Universitat Rovira i Virgili (URV). Departament d'Enginyeria Electrònica

³ Universitat de Maastricht. Divisió d'Imatge per Espectrometria de Masses. Institut d'Imatge Molecular Multimodal de Maastricht (M4I)

⁴ Hospital Universitari Reina Sofía. Institut Maimónides de Recerca Biomèdica de Còrdova (IMIBIC).
Unitat d'Espectrometria de Masses i Imatge Molecular

Resum: La imatge per espectrometria de masses pot revolucionar les ciències òmiques pel fet de caracteritzar canvis moleculars amb context espacial. En aquest estudi, hem optimitzat protocols de lipidòmica espacial per tal d'analitzar embrions de peix zebra, una alternativa als models animals clàssics en estudis de toxicologia ambiental. Així, s'han avaluat una tècnica convencional d'ionització per desorció làser assistida per matriu – imatge per espectrometria de masses (MALDI-MSI, de *matrix-assisted laser desorption/ionization – mass spectrometry imaging*) i una tècnica desenvolupada recentment anomenada MALDI-2. Els resultats mostren que ambdues tècniques permeten analitzar les seccions de teixit de forma reproduïble amb una alta resolució espacial. La combinació amb l'anàlisi quimiomètrica ha permès observar una clara diferenciació en el contingut lipídic de les diferents zones del cos de l'embrió i es demostra així la utilitat que pot tenir en estudis (eco)toxicològics futurs.

Paraules clau: Imatge per espectrometria de masses, MALDI, lipidòmica, embrió de peix zebra, quimiometria.

Abstract: Mass spectrometry imaging has the potential to revolutionize omics by characterizing molecular changes with spatial context. In this study, we optimized spatial lipidomics protocols to analyze zebrafish embryos, an alternative to classical animal models in the environmental toxicology field. Specifically, a conventional MALDI-MSI technique and a recently developed technique called MALDI-2 were evaluated. The results show that both techniques allow reproducible tissue section analysis with high spatial resolution. By combining them with chemometric analysis, a clear differentiation has been observed in the lipid content of different regions of the embryo body, demonstrating the utility of these techniques in future (eco)toxicological studies.

Keywords: Mass spectrometry imaging, MALDI, lipidomics, zebrafish embryo, chemometrics.

Introducció

La imatge per espectrometria de masses (MSI, de *mass spectrometry imaging*) és una tecnologia emergent que té la capacitat de caracteritzar la distribució molecular mantenint la informació espacial. Per aquest motiu, es presenta com una tècnica ideal per a un gran nombre d'aplicacions en diferents àrees científiques. Això inclou des del mesurament de compostos organometàl·lics [1] fins a la

realització d'estudis òmics tant en biomedicina [2] com en toxicologia ambiental [3].

En particular, en el camp de les ciències òmiques, l'MSI està adquirint una rellevància especial, ja que proporciona informació relativa als mecanismes moleculars afectats en condicions d'estrès, com poden ser una malaltia o l'exposició a contaminants ambientals. Això permet superar les limitacions dels protocols òmics actuals, que possibiliten la caracterització del proteoma (conjunt de proteïnes/pèptids), del lipidoma (conjunt de lípids) i del metaboloma (conjunt de metabòlits). Aquesta millora és especialment notable en l'estudi de sistemes pluricel·lulars, com ara teixits, òrgans o organismes sencers, mitjançant una anàlisi òmica no dirigida (és a dir, una anàlisi global del conjunt de biomolècules sense cap hipòtesi

Correspondència: Albert Menéndez-Pedriz
Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis de l'Aigua. Consell Superior d'Investigacions Científiques (IDAEA-CSIC). Departament de Química Ambiental
C. de Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona
Tel.: +34 690 802 682
A/e: ampqam@idaea.csic.es

prèvia). Els protocols proteòmics i metabolòmics més utilitzats en els últims anys es basen principalment en tècniques com la cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses d'alta resolució (*liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*, LC-HRMS). En aquests casos, la informació obtinguda és una mitjana del canvi de l'anàlit en la totalitat del teixit, de l'òrgan o de l'organisme. Per tant, la informació espacial sobre el lloc on es produeixen exactament aquestes alteracions, clau per a poder determinar els mecanismes moleculars implicats en la resposta del teixit o de l'organisme, en molts casos no es pot caracteritzar adequadament. A més, els canvis moleculars produïts en teixits minoritaris, o en un conjunt de cèl·lules molt concret, quedaran amb molta probabilitat emascarats en la resposta global [4]. Cal esmentar en aquest punt que, junt amb el desenvolupament de tècniques òmiques espacials, en els últims anys també han aparegut altres tècniques per a millorar les prestacions dels mètodes òmics convencionals, com són les tècniques de cèl·lula única [5] o les metodologies basades en microdissecció per làser acoblades a LC-HRMS [6]. En ambdós casos, la millora se centra en l'assignació dels canvis produïts a escala cel·lular, i no en l'aportació de la informació espacial dels canvis moleculars.

El desenvolupament continu tant de les fonts d'ionització com dels analitzadors de masses ha donat lloc a una àmplia gamma d'eines MSI disponibles [7]. Les fonts d'ionització més populars són l'electropolvorització per desorció (DESI, de *desorption electrospray ionization*), l'espectrometria de masses d'ió secundari (SIMS, de *secondary ion mass spectrometry*) i la desorció-ionització làser assistida per matriu (MALDI, de *matrix-assisted laser desorption/ionization*). Totes aquestes

fonts presenten fortaleeses i limitacions, encara que la ionització per MALDI actualment té una major aplicabilitat, sobretot en teixits biològics, atès que proporciona un equilibri favorable entre el temps de preparació de la mostra, la sensibilitat química, la resolució espacial i la interpretació espectral [7]. La ionització dels anàlits mitjançant MALDI es produeix de forma suau, ja que el làser en primera instància ionitza la matriu dipositada prèviament sobre la mostra i, a continuació, aquesta transfereix la càrrega als anàlits (figura 1a). Malgrat això, la tecnologia MALDI-MS encara té unes certes limitacions, com la ionització deficient de determinades classes de molècules (per exemple, els esterols, les vitamines o alguns compostos farmacèutics) o la baixa resolució espacial en comparació amb altres tècniques d'MSI [8]. Per aquesta raó, recentment s'han desenvolupat mètodes MALDI alternatius als mètodes convencionals, que acostumen a emprar diversos tipus de matrius orgàniques, com l'àcid dihidroxibenzoic (DHB), l'àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic (4-HCCA), el norharmà (Nor) o la 2',6'-dihidroxiacetofenona (DHAP). Aquests nous mètodes es basen en la deposició de matrius inorgàniques com els metalls preciosos (per exemple, l'or i la plata) [8] o en la deposició de compostos que permeten la derivatització sobre el mateix teixit dels anàlits d'interès (per exemple, l'aldehid de betaïna, per a derivatitzar els esterols, o el reactiu T de Girard, per a millorar la ionització dels esteroides) [9].

Recentment, la tècnica de postionització amb làser, coneguda com a MALDI-2, ha representat un punt d'inflexió en el camp de l'MSI [10]. Així, MALDI-2 millora la sensibilitat (fins a dos o tres ordres de magnitud) per a detectar un elevat nombre de molècules que no es poden caracteritzar amb MALDI convencional [11]. Aquesta tècnica millora la ionització dels com-

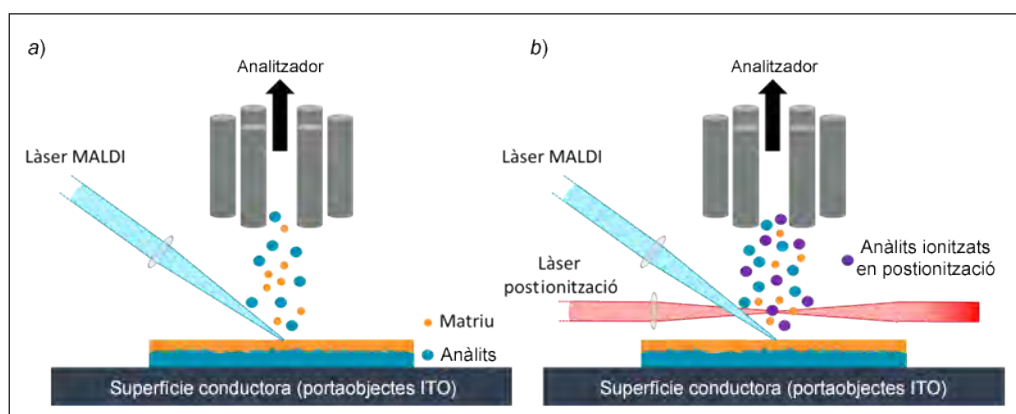


FIGURA 1. Esquema gràfic del procés d'ionització per mitjà de MALDI (a) i MALDI-2 (b). Elaboració pròpia.

postos, ja que introdueix un segon làser que incideix de forma perpendicular al núvol electrònic generat pel primer làser, tal com es mostra gràficament a la figura 1b. Aquest increment en el rendiment de la ionització també permet augmentar la resolució espacial, clau per a caracteritzar regions espacials en teixits petits, com, per exemple, els embrions de peix zebra (amb una dimensió mitjana de 4 mm de llargària i 0,5 mm d'amplària).

La figura 2 mostra un esquema general de l'anàlisi de molècules petites basat en un protocol de MALDI-MSI. La primera etapa consisteix en la preparació de la mostra, que requereix una optimització adequada per a obtenir bons resultats. En nombrosos estudis s'ha demostrat que la inclusió inicial de la mostra en un medi concret és un pas clau per a garantir un bon rendiment en les etapes posteriors de l'anàlisi MSI [12]. En aquest pas, és cabdal utilitzar un medi d'inclusió amb una viscositat suficient i una adherència adequada que permeti un posicionament precís dels diferents teixits biològics. A més, el medi ha de facilitar l'obtenció de seccions que preservin una bona qualitat del teixit quan es tallen en fred. D'aquesta manera, el protocol d'inclusió optimitzat ha de reduir al màxim tant la possible deslocalització dels anàlits (és a dir, el desplaçament dels compostos d'interès a altres regions de la mostra) com el soroll que pot introduir en l'espectre de masses el mateix medi d'inclusió. Les estratègies d'inclusió més populars en

mostres de teixit fresc inclouen l'ús de diversos materials com la temperatura òptima de tall (OCT, de *optimal cutting temperature*), la gelatina, l'agarosa, la carboximetilcel·lulosa (CMC) o l'hidroxipropilmetilcel·lulosa (HPMC) [13].

La segona etapa en el protocol d'anàlisi MALDI-MSI està relacionada amb la selecció i la deposició de la matriu, ja que, com s'ha explicat anteriorment, té una influència directa en la ionització dels anàlits d'interès. Un paràmetre clau en les anàlisis de MALDI-MSI també és la resolució espacial, que és inversament proporcional a la mida del feix del làser que incideix sobre la mostra. Com més petit sigui el feix del làser, més píxels tindrem per mostra (cada punt on incideix el làser, representat pels cercles blaus a la figura 2) i més gran serà la resolució espacial. Treballar a una resolució espacial elevada (mida de píxel petita) ens permet caracteritzar molt millor els teixits (permet discernir més bé diferències cel·lulars de zones contigües), però la sensibilitat del mètode es pot veure compromesa (ja que, en incidir en una àrea més petita, la quantitat de molècules que es poden analitzar és inferior). Per tant, les condicions que afavoreixen una bona ionització en MALDI-MSI depenen en gran mesura de les característiques del làser i de la matriu utilitzada, així com del procediment emprat per a dur-ne a terme la deposició. A la bibliografia es recullen diversos estudis comparatius sobre els avantatges i els inconvenients de l'ús de cada matriu per a classes específiques

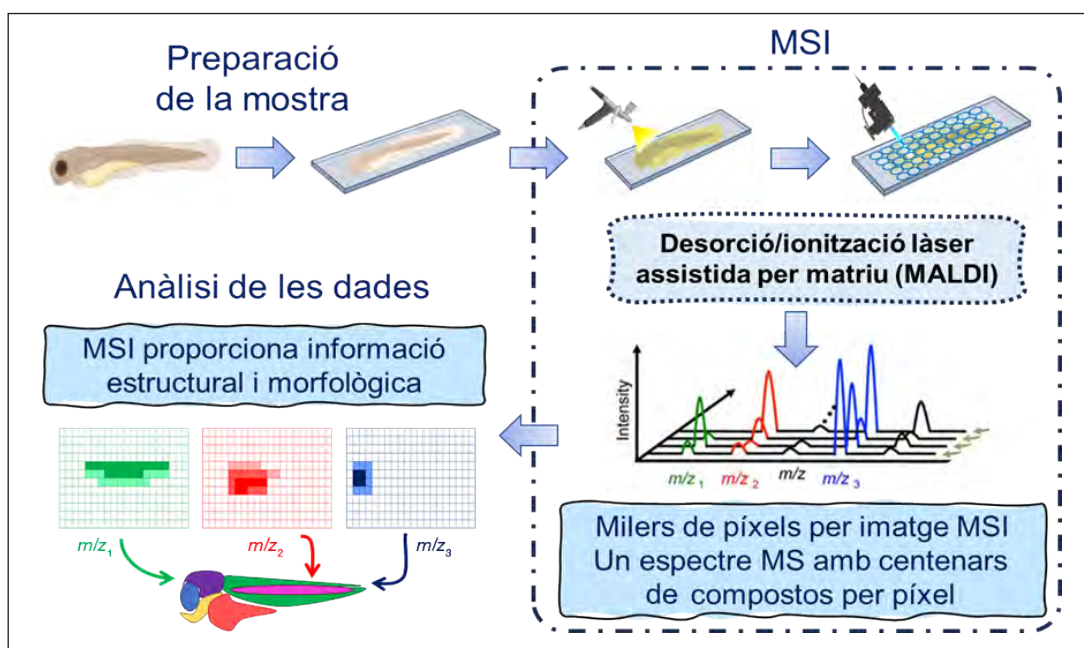


FIGURA 2. Esquema genèric del funcionament d'una anàlisi d'imatge per espectrometria de masses. Elaboració pròpia.

de molècules i dels diferents protocols de deposició matricial disponibles (com ara la polvorització o la sublimació) [14, 15].

L'etapa final dels estudis amb MSI consisteix en l'anàlisi de les dades, que poden arribar a ser molt complexes, ja que es produeix la ionització simultània de centenars de compostos en cada un dels píxels. Per tant, aquest tipus d'estudis implica dur a terme una anàlisi exhaustiva de les dades utilitzant diferents eines quimiomètriques per a poder-ne obtenir la informació més rellevant. En el camp del MALDI-MSI, l'anàlisi per clústers i l'anàlisi de components principals (PCA, de *principal component analysis*) són les més utilitzades; aquests mètodes permeten conèixer quines regions dels teixits tenen una resposta similar, a més de facilitar l'assignació a diferents regions presents en els teixits.

Malgrat el potencial únic de l'MSI sobre altres tecnologies per a caracteritzar els canvis induïts a escala molecular, la seva aplicació en toxicologia ambiental continua sent un camí en gran part poc explorat. Els embrions de peix zebra tenen un paper cabdal en diversos camps científics, incloent-hi la toxicologia ambiental, la farmacologia o la biomedicina, atesa la bona predicció de la resposta a l'estrès entre el peix zebra i els mamífers, una configuració experimental molt més senzilla si es compara amb altres organismes model com els rosegadors, tot acomplint el principi de les 3 R en experimentació animal [16]. Fins i tot, recentment s'ha proposat com la connexió entre els assaigs preliminars i la validació biològica en experimentació animal. Malgrat la importància que té, l'anàlisi per MSI d'aquest model alternatiu és pràcticament inexistent. Les nombroses dificultats que presenta la preparació de les mostres es deuen al fet que són de mida petita (4 mm de llargària per 0,5 mm d'amplària) i tenen teixit ric en greixos. En aquest treball, doncs, s'ha avaluat la capacitat de diverses estratègies òmiques espacials basades en MALDI-MSI per a caracteritzar el lipídoma embrionari del peix zebra al cap de cinc dies de la fecundació. S'han examinat diferents protocols d'anàlisi MALDI-MSI i s'han avaluat diversos tipus de matrius (norharmà, àcid dihidroxibenzoic i or) i la forma de deposició (polvorització i sublimació), alhora que s'han emprat diferents classes d'ionització, tant amb MALDI convencional com amb la innovadora tècnica de MALDI-2. Les diverses estratègies optimitzades en aquest treball tenen com a objectiu principal poder contribuir en un futur proper a estudiar de manera més acurada la distribució espacial del lipídoma en els embrions de peix zebra utilitzant MSI.

Metodologia analítica

Preparació de les mostres d'embrions de peix zebra per MALDI-MSI

Els ous de peix zebra es van obtenir mitjançant l'aparellament natural dels adults. Els ous fecundats es van recollir i es van cultivar en aigua de peixos fins a cinc dies després de la fecundació (dpf). Tots els procediments experimentals d'aquest estudi s'han dut a terme seguint les directrius institucionals sota llicència de l'Administració local i han estat aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal del Centre d'Investigació i Desenvolupament del Consell Superior d'Investigacions Científiques (CID-CSIC). Els passos principals que cal optimitzar en un protocol de MALDI-MSI es presenten a la figura 3.

En primer lloc es realitza la inclusió de la mostra. Aquest pas no sempre és necessari, depèn del tipus de mostra amb la qual es treballi. En el nostre cas particular, la mida dels embrions de peix zebra requereix incloure'ls en un suport adient (el medi d'inclusió) i, per tant, s'ha dut a terme l'optimització de les condicions de mostreig. En aquest estudi, després de fer diverses proves comparant diversos medis d'inclusió, es va concloure que una solució de CMC a l'1 % amb gelatina al 9 % era la més adient per a poder col·locar correctament fins a un total de deu embrions de peix zebra per mostra, a causa de la seva viscositat. A més, aquest medi d'inclusió ha demostrat ser compatible amb la posterior anàlisi per MALDI-MSI sense alterar significativament l'espectre de masses. Un cop incloses en la solució de CMC, les mostres es congelaven ràpidament mitjançant la immersió en una solució d'isopropanol refredat amb gel sec. En cas que la secció de les mostres no es produís immediatament, aquestes s'emmagatzemaven a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de la secció. Les mostres de peix zebra es van seccionar posteriorment amb un gruix de $10\text{ }\mu\text{m}$ utilitzant un criòstat Leica CM1520 (Leica Biosystems, EUA) i mantenint la temperatura a l'interior del criòstat entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuació, les seccions es van adherir mitjançant calor corporal en portaobjectes de vidre recoberts d'òxid d'estany d'indi (ITO, de *indium tin oxide*) (Bruker, Bremen, Alemanya). Prèviament es va aplicar una capa addicional de polilisi-na als portaobjectes per tal de millorar l'adherència del teixit. A fi d'evitar la deslocalització lipídica, els portaobjectes es van tornar a congelar immediatament a la temperatura del criòstat abans d'emmagatzemar les mostres a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins a la realització de la deposició de la matriu.

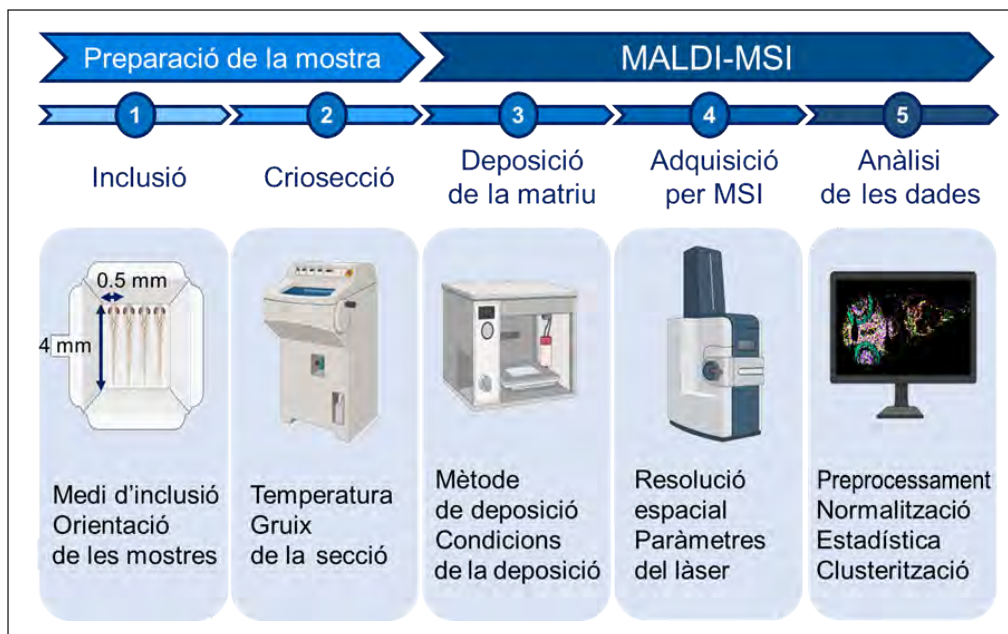


FIGURA 3. Esquema genèric dels passos més importants que cal optimitzar en un protocol d'imatge per espectrometria de masses utilitzant MALDI com a font d'ionització. Elaboració pròpia.

Per a poder realitzar una deposició adequada de la matriu, en tots els casos els portaobjectes es van assecat primer en un dessecador en condicions de buit durant 30-60 minuts a fi de garantir una sequedat completa. A continuació, s'expliquen breument els diferents protocols de deposició de matriu optimitzats, dels quals es destaquen els paràmetres més importants.

Polvorització de norharmà. Es va aplicar una solució de norharmà a 7 mg/mL, dissolta en dues parts de clorur de metil i una part de metanol (v/v), sobre les mostres d'embrions de peix zebra utilitzant un HTX M5 (HTX Imaging Technologies, EUA). Es van aplicar set capes de norharmà sobre els teixits amb un cabal de $0,05 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ i una velocitat de $1200 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$, i es va ajustar la temperatura de polvorització a $75 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sublimació de DHB. Es va col·locar una solució d'àcid dihidroxibenzoic a 50 mg/mL (amb una proporció 3:1 entre isòmers 2,5-DHB i 2,4-DHB) en acetona en una placa escalfada prèviament a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ dins de l'aparell de sublimació (fabricat al laboratori). Es va permetre que la matriu s'evaporés ràpidament a la placa calefactora per assegurar el màxim contacte entre la matriu i l'element calefactor, i millorar així l'eficiència de sublimació. La pressió a la cambra de sublimació es va establir a uns $2,0 \times 10^{-2} \text{ mBar}$ (2 Pa) abans d'escalfar la matriu (aproximadament un minut). La temperatura de subli-

mació es va fixar a $160 \text{ }^\circ\text{C}$ i es va dur a terme el procés de sublimació durant 160 s.

Polvorització d'or. Les nanocapes d'or es van dipositar a les seccions de $10 \text{ }\mu\text{m}$ de les mostres dels embrions de peix zebra utilitzant un sistema de polvorització ATC Orion 8-HV (AJA International, N. Scituate, MA, EUA), segons el procediment descrit per Ràfols *et al.* [17]. Es va utilitzar una atmosfera d'argó amb una pressió de 30 mTorr per tal de crear el plasma a la pistola. La temperatura del substrat es va mantenir freda durant la deposició perquè no es produís la degradació dels lípids del teixit. Les condicions finals optimitzades de polvorització per MSI van resultar en la polvorització de nanoestructures metàl·liques d'or d'uns 50-100 nm de gruix. La morfologia de la capa d'or es va caracteritzar mitjançant microscòpia electrònica de rastreig ambiental (ESEM, de *environmental scanning electron microscopy*) amb un microscopi Quanta 600 FEG (Field Electron and Ion Company, FEI, Hillsboro, EUA).

Anàlisi mitjançant MALDI-MSI

Les anàlisis de MALDI-MSI es van realitzar en un instrument Bruker timsTOF fleX (Bruker, Bremen, Alemanya) equipat amb un làser que opera a una freqüència del làser de 10 kHz, utilit-

zant 300 trets per píxel. Quan es va treballar amb el Bruker timsTOF fleX amb el tipus MALDI-2, es va operar a una freqüència d'1 kHz i es va reduir també el nombre de trets del làser per píxel a 100. A més, és important assenyalar que es va deixar un interval de 10 µs entre els dos làsers per tal d'optimitzar la postionització (el segon làser ha d'incidir sobre el núvol electrònic format pel primer làser). Els espectres es van adquirir amb una resolució lateral de 5 µm a 15 µm, en mode iònic positiu en el rang de 250–1 300 m/z. Es va emprar fòsfor vermell per a calibrar l'instrument abans de la mesura.

Anàlisi de les dades

Les imatges obtingudes per MALDI-MSI analitzades amb l'instrument Bruker timsTOF fleX van ser generades utilitzant el programa de control d'adquisició flexImaging proporcionat per Bruker. Les anàlisis quimiomètriques realitzades (és a dir, anàlisi de clústers i anàlisi per PCA) es van dur a terme amb el programari SCiLS Lab (Bruker). Els espectres es van normalitzar per mitjà del mètode de recompte total d'ions (TIC, de *total ion count*). L'anàlisi de clústers es va efectuar mitjançant el procediment recomanat pel programari, treballant en tots els espectres individuals sense considerar una reducció del soroll, tenint en compte només la llista de pics prèviament creada de forma manual (aproximadament, uns 500 pics). El mètode utilitzat va ser el Bisecting K-Means, amb mètrica euclidiana. Respecte a l'anàlisi de PCA, també es va treballar en tots els espectres individuals sense considerar una reducció del soroll i escalant amb el mètode Pareto. En aquest treball, els lípids han estat identificats mitjançant la comparació de les seves masses exactes amb bases de dades públiques, com LipidMaps [18]. En l'assignació, es va permetre un error màxim de 15 ppm.

Discussió dels resultats

Avaluació dels mètodes de preparació de la mostra

Com s'ha esmentat anteriorment, la selecció de la matriu, juntament amb la forma de deposició, tenen un impacte significatiu en els resultats obtinguts en MALDI-MSI, atès que tenen un paper fonamental en el rendiment de la ionització dels anàlits i, en aquest cas, dels lípids.

En l'avaluació de les diferents deposicions de matriu orgànica, és important assenyalar que la sublimació d'una matriu orgànica en general és el mètode que redueix al màxim el risc de deslocalització dels anàlits. Per altra banda, la deposició per polvorització, tot i no oferir les mateixes capacitats, és un mètode més reproduïble entre mostres i permet ajustar molt millor el mètode per a una anàlisi determinada. Això es deu a la capacitat que té de variar la composició del solvent i els paràmetres de polvorització. Per tant, tot i que la sublimació proporciona més bons resultats, tal com esperàvem, l'optimització de la polvorització ha permès que els resultats siguin comparables. Pel que fa a la deposició de la nanocapa d'or, els resultats suggereixen una deslocalització i una reproductibilitat mínimes, com en el cas de la sublimació.

El mètode optimitzat de polvorització d'una matriu orgànica (per exemple, el norharmà) es podria definir com un mètode convencional de MALDI-MSI. Els resultats obtinguts han demostrat la utilitat d'aquesta tècnica per a caracteritzar les principals famílies lipídiques, ja que indica exactament la seva ubicació en les diferents regions del cos dels embrions de peix zebra. Aquest mètode ha demostrat la capacitat que té de caracteritzar els grups de fosfolípids més importants, com les fosfatidilcolines (PC) o les fosfatidiletanolamines (PE), a més d'altres famílies rellevants com els triglicèrids (TG) o els esfingolípids. Així mateix, el norharmà, a diferència de l'or o del DHB, permet dur a terme l'anàlisi en mode d'ionització tant positiu com negatiu, de manera que facilita la caracterització també de famílies lipídiques com les cardiolipines (CL), els àcids fosfatídics (PA) o els fosfatidilinositols (PI), que acostumen a presentar una millor ionització en mode negatiu.

Malgrat aquests avantatges, un mètode convencional de MALDI-MSI com el descrit no té capacitat per a ionitzar i, per tant, no permet analitzar algunes famílies de lípids com, per exemple, els esterols [6], que s'han descrit com una família particularment rellevant en el lipidoma dels embrions de peix zebra [19]. De fet, els esterols poden arribar a representar aproximadament un 40% del contingut lipídic total en els embrions de peix zebra a 5 dpf. Per tant, aquest mètode presenta una limitació significativa per a poder fer una caracterització completa del contingut lipídic dels embrions de peix zebra.

Una de les estratègies per a millorar la ionització, que faciliten la caracterització d'aquells anàlits que no són adequats

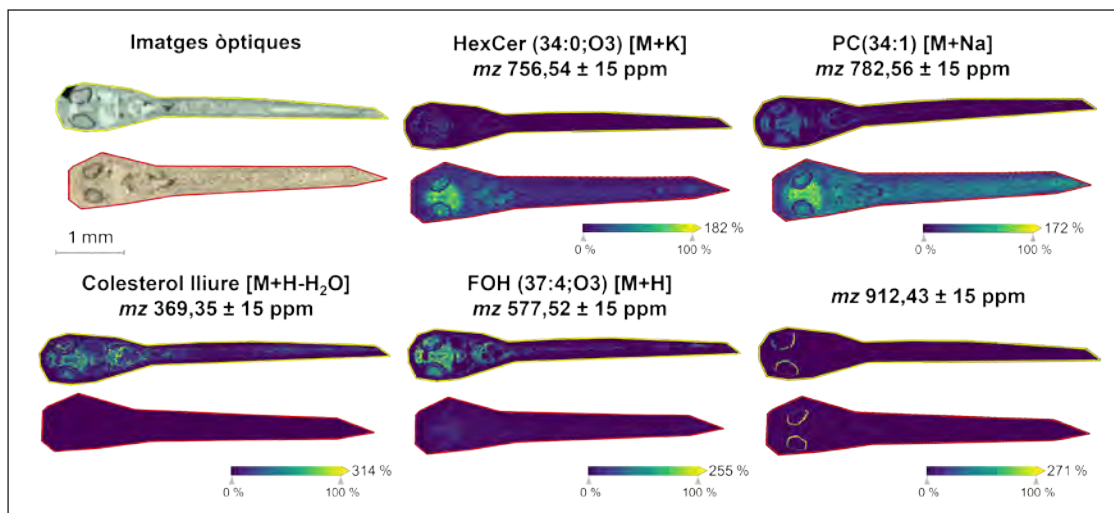


FIGURA 4. Exemple de diferents lípids en els embrions de peix zebra analitzats a una resolució espacial de 10 μm mitjançant una tècnica de MALDI-MSI utilitzant una matriu inorgànica com l'or (groc) i una matriu orgànica com el norharmà (vermell). Elaboració pròpia.

per a ser caracteritzats pel mètode convencional, és l'ús d'una matriu inorgànica com la dels metalls preciosos [9]. En aquest treball, s'ha optimitzat un mètode basat en la deposició d'or, el qual ha demostrat tenir unes prestacions molt útils per a la caracterització de lípids amb un valor de massa baixa, com poden ser els àcids grassos (FA, de *fatty acids*) o els esterols. Com en el cas anterior, aquest mètode també presenta certes limitacions en la ionització d'algunes famílies de lípids. En aquest cas, es perd molta sensibilitat en comparació amb una matriu orgànica per a ionitzar algunes famílies majoritàries com els fosfolípids, tal com s'observa a la figura 4.

En els últims anys, s'han implementat diverses tècniques per a millorar les capacitats del MALDI-MSI quan es treballa amb una matriu orgànica, entre les quals destaca la utilitzada en aquest treball, la postionització amb làser o MALDI-2 [10]. Com a dada especialment rellevant, els nostres resultats mostren una millora important, sobretot en la ionització d'anàlits que es troben en un rang baix de masses (relació m/z entre 280 i 600), tot i que els anàlits no caracteritzats per MALDI es poden trobar també en tot el rang de masses de treball habitual en l'estudi de lípids (m/z entre 280 i 1 300). Com es pot apreciar a la figura 5, el mètode basat en MALDI-2 millora significativament la detecció del MALDI convencional. Això permet caracteritzar noves famílies lipídiques, com els esterols, o lípids poc abundants en el teixit estudiat, i, també, incrementar el rendiment de la ionització i millorar així encara més la resolució espacial (permet arribar a mides de píxel de 5 μm).

A la figura 6 es demostra visualment que aquesta millora en la resolució espacial és cabdal per a l'estudi de mostres com els embrions de peix zebra, ateses les seves dimensions. Tal com es pot veure, quan la resolució espacial millora, hi ha teixits tan heterogenis com els ulls que poden ser caracteritzats d'una manera més acurada i precisa. Les imatges mostren que, en el cas de l'anàlisi realitzada amb MALDI-2, podem distingir clarament les capes de diferents tipus cel·lulars que formen la retina. Malgrat la millora assolida quant a la resolució de masses i espacial, el mètode basat en MALDI-2 també presenta alguns inconvenients, sobretot relacionats amb l'increment del temps d'anàlisi. En el cas concret d'un teixit d'embrions de

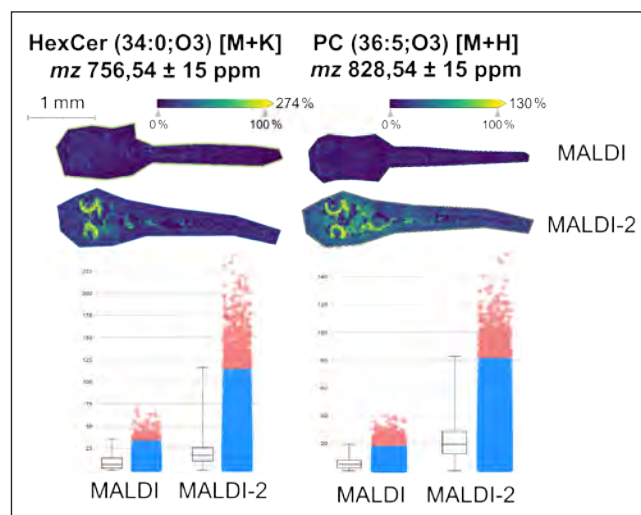


FIGURA 5. Exemple de dos lípids abundants en els embrions de peix zebra analitzats a una resolució espacial de 5 μm utilitzant MALDI i MALDI-2. Elaboració pròpia.

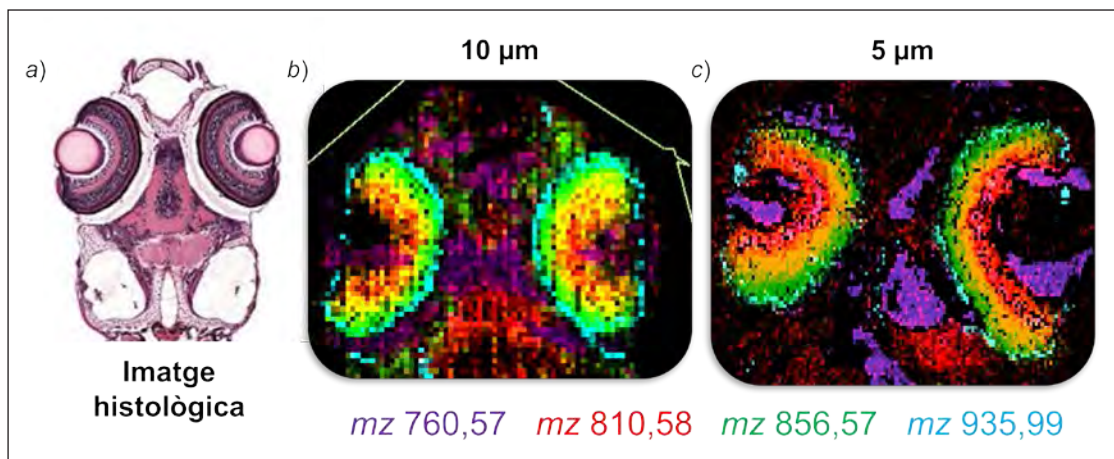


FIGURA 6. Demostració visual de la importància de treballar a una resolució espacial elevada per a poder caracteritzar adequadament els teixits presents en els embrions de peix zebra, comparant: a) la imatge histològica presa de *Zebrafish Atlas* [20], b) el cap d'un embrió de peix zebra analitzat per MALDI-MSI a una resolució espacial de 10 μm tenint en compte quatre lípids diferents (elaboració pròpia) i c) el cap d'un embrió de peix zebra analitzat per MALDI-MSI a una resolució espacial de 5 μm considerant quatre lípids diferents (elaboració pròpia).

peix zebra, l'anàlisi amb MALDI-2 pot arribar a triplicar el temps que requereix el MALDI convencional (noranta minuts, en contrapartida als menys de trenta minuts).

Per tant, cal destacar que tots els protocols utilitzats han demostrat ser aplicables per a la caracterització del lipidoma dels embrions de peixos zebra, mesurats a una resolució espacial alta (5–10 μm). Tanmateix, cadascun d'ells presenta avantatges i inconvenients respecte als altres. Així, la seva aplicació potencial en estudis futurs dependrà en gran part de la hipòtesi de treball, que determinarà quin és el mètode més adient en cada cas. S'ha comprovat que el mètode basat en MALDI-2 és el més útil per a fer una caracterització general del lipidoma. No obstant això, si, per exemple, l'estudi se centra exclusivament en la caracterització dels esterols, i tenint en compte el temps d'anàlisi i la disponibilitat dels instruments de MALDI-2, pot ser més adient seguir un mètode convencional de MALDI amb deposició d'or.

Anàlisi multivariant de les dades obtingudes per MALDI-MSI

Les anàlisis de MALDI-MSI generen una gran quantitat de dades que proporcionen informació tant espectral com morfològica. D'una banda, es facilita la visualització senzilla de la distribució espacial d'anàlisis específics basada en el seu valor m/z , tal com s'ha mostrat a les figures 4, 5 i 6. De l'altra, les dades recollides en aquests estudis MALDI-MSI possibiliten la

diferenciació de les diverses regions del cos dels embrions de peixos zebra, en aquest cas, basant-se en la variació que hi ha en el contingut lipídic. Malgrat això, cal tenir present que, per a aconseguir-ho, es necessiten eines avançades d'anàlisi de dades. Aquestes eines quimiomètriques ens permetran obtenir la informació valuosa a partir d'anàlisis multivariants i, d'aquesta manera, s'evitarà malinterpretar els resultats obtinguts. Per exemple, si es duu a terme una anàlisi d'agrupacions de clústers, tal com s'exemplifica a la figura 7a, les principals regions del cap i del cos dels embrions es diferencien de forma notable. Principalment, es poden observar les zones del cervell i del sistema nerviós, i hi destaca la medul·la espinal, que encara no es troba totalment desenvolupada a l'edat dels embrions emprats per a l'estudi. També es distingeixen els ulls, el sistema digestiu, el sac vitel·lí (on es troben grans quantitats de lípids que els embrions utilitzen com a font d'energia durant els primers dies de vida) i la part muscular de la cua. Cal remarcar que, en l'estudi amb MALDI emprant or o norharmà com a matriu, s'obtenen resultats similars als de l'anàlisi d'agrupacions, tot i no disposar d'una resolució espacial tan elevada.

Els resultats obtinguts de realitzar una anàlisi de components principals (figura 7b) permeten diferenciar pràcticament les mateixes regions. Una possibilitat per a millorar la diferenciació de certes zones del teixit és aplicar l'anàlisi PCA a regions d'interès més petites de l'embrió, en comptes d'anàlitzar tota la secció simultàniament. Per exemple, la figura 7c il·lustra que l'anàlisi de PCA d'un dels ulls de la secció presentada a

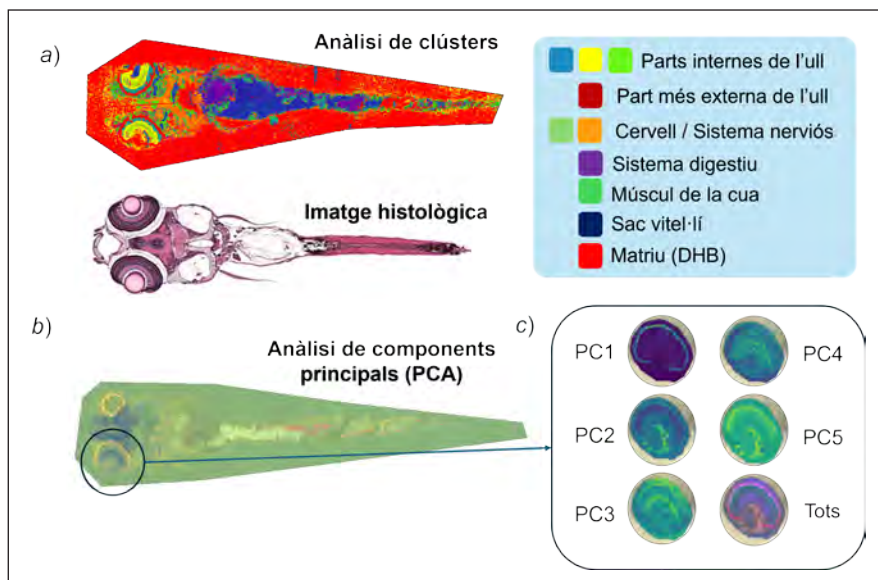


FIGURA 7. Exemple de les agrupacions per clústers obtingudes en analitzar una secció d'embrió de peix zebra observada per MALDI-2 treballant a una resolució espacial de 5 μm , mitjançant: a) anàlisi de clústers, per comparació amb una imatge histològica presa del *Zebrafish Atlas* [20]; b) PCA sobre una secció sencera (elaboració pròpia), i c) PCA sobre un teixit heterogeni, com ara l'ull (elaboració pròpia).

la figura 7b permet distingir noves regions i ofereix una descripció molt més acurada de les diferents àrees que apareixen en aquest teixit. A més, cal tenir en compte que, pel fet de treballar a una resolució espacial elevada, les tècniques MALDI-MSI cada dia són més a prop de proporcionar informació espacial a escala cel·lular.

En conclusió, aquesta anàlisi multivariant ens ha permès confirmar que les noves metodologies basades en MALDI-MSI són útils per a estudiar el lipidoma de mostres biològiques complexes, com els embrions de peix zebra. Així, s'ha pogut demostrar l'aplicabilitat potencial que té en la identificació de regions espacials dels teixits biològics amb base al seu contingut lipídic.

Conclusions i estudis futurs

Aquest treball presenta diferents protocols de MALDI-MSI per a analitzar de forma reproducible el lipidoma de teixits biològics, prenent com a cas d'estudi les seccions d'embrions de peixos zebra. L'avaluació dels diferents mètodes ha demostrat que tots ells permeten una ionització correcta de la major part de famílies lipídiques sense una deslocalització important, de manera que s'ha arribat a obtenir una sensibilitat analítica i una resolució espacial excel·lents.

Tot i que l'optimització dels diferents protocols analítics ha estat un component important d'aquest treball, cal destacar també l'aplicació potencial que tenen en diverses àrees científiques, com la toxicologia ambiental o la recerca biomèdica, atesa la creixent popularitat dels embrions de peix zebra com a organisme model emprat en aquests camps. Aquest treball també destaca el desenvolupament de noves tècniques d'MSI, com la postionització per làser (MALDI-2), que supera les limitacions dels mètodes basats en MALDI. Aquesta nova tècnica possibilita una millor caracterització del lipidoma de l'embrió de peix zebra en una sola anàlisi. Actualment, aquestes tècniques, com es demostra en aquest estudi, tenen la capacitat d'estudiar organismes sencers, com en el cas dels embrions de peix zebra. De fet, a la resolució espacial utilitzada (5-10 μm), els tres mètodes optimitzats han pogut discernir, pel seu contingut lipídic, un teixit especialment heterogeni, diferenciant no només els diferents òrgans dels embrions, sinó també diferents capes cel·lulars, com succeeix en el cas dels ulls.

Tots aquests avenços fan possible imaginar que el futur de moltes àrees científiques, incloent-hi la toxicologia ambiental, haurà d'estar estretament vinculat a l'evolució de les tècniques espacials que permeten obtenir simultàniament la caracterització molecular i morfològica de teixits, d'òrgans i fins i tot d'organismes sencers.

Agraïments

La recerca que ha permès obtenir els resultats que es mostren en aquest treball ha rebut finançament del Ministeri de Ciència i Innovació MCIN/AEI/10.13039/501100011033 i els ajuts PID2021-1229290B-C33 i CEX2018-000794-S. Albert Menéndez-Pedrizo també agraeix una subvenció PRE2020-094656 finançada pel MCIN/AEI/10.13039/501100011033 i pel European Social Fund: Investing in Your Future.

Referències i altres fonts

- [1] FLEISSNER, S.; PITTENAUER, E.; PECÁK, J.; KIRCHNER, K. «Characterization of selected organometallic compounds by electrospray ionization- and matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry using different types of instruments: Possibilities and limitations». *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 36 (2022), p. e9281. DOI: 10.1002/rcm.9281.
- [2] PIERRE-MAXENCE, V.; HEEREN, R. M. A.; PORTA, T.; BALLUFF, B. «Mass spectrometry imaging for clinical research – latest developments, applications, and current limitations». *Analyst*, 142 (2017), p. 2690-2712. DOI: 10.1039/C7AN00565B.
- [3] HERRUZO-RUIZ, A.; PERALBO-MOLINA, A.; MARÍA-LÓPEZ, C.; MICHÁN, C.; ALHAMA, J.; CHICANO-GÁLVEZ, E. «Mass spectrometry imaging in environmental monitoring: From a scarce existing past to a promising future». *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 42 (2024), p. e00228. DOI: 10.1016/j.teac.2024.e00228.
- [4] GIKA, H. G.; WILSON, I. D.; THEODORIDIS, G. A. «LC-MS-based holistic metabolic profiling. Problems, limitations, advantages, and future perspectives». *Journal of Chromatography B*, 966 (2014), p. 1-6. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.01.054.
- [5] LEE, J.; HYEON, D. Y.; HWANG, D. «Single-cell multiomics: technologies and data analysis methods». *Experimental and Molecular Medicine*, 52 (2020), p. 1428-1442. DOI: 10.1038/s12276-020-0420-2.
- [6] MUND, A.; BRUNNER, A.; MANN, M. «Unbiased spatial proteomics with single-cell resolution in tissues». *Molecular Cell*, 82 (2022), p. 2335-2349. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.05.022.
- [7] BUCHBERGER, A. R.; DELANEY, K.; JOHNSON, J.; LI, L. «Mass spectrometry imaging: A review of emerging advancements and future insights». *Anal. Chem.*, 90 (2018), p. 240-265. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04733.
- [8] SAMARAH, L. Z.; VERTES, A. «Mass spectrometry imaging based on laser desorption ionization from inorganic and nanophotonic platforms». *View*, 1 (2020), p. 20200063. DOI: 10.1002/VIW.20200063.
- [9] HARKIN, C.; SMITH, K. W.; CRUICKSHANK, F. L.; MACKAY, C. L.; FLINDERS, B.; HEEREN, R. M. A.; MOORE, T.; BROCKBANK, S.; COBICE, D. F. «On-tissue chemical derivatization in mass spectrometry imaging». *Mass Spectrom. Rev.*, 41 (2022), p. 662-694. DOI: 10.1002/mas.21680.
- [10] DREISEWERD, K.; BIEN, T.; SOLTWISCH, J. «MALDI-2 and t-MALDI-2 mass spectrometry imaging». A: LEE, Y. J. (ed.). *Mass Spectrometry Imaging of Small Molecules: Methods in Molecular Biology*, 2437. Humana, Nova York, NY. DOI: 10.1007/978-1-0716-2030-4_2.
- [11] McMILLEN, J. C.; FINCHER, J. A.; KLEIN, D. R.; SPRAGGINS, J. M.; CAPRIOLI, R. M. «Effect of MALDI matrices on lipid analyses of biological tissues using MALDI-2 postionization mass spectrometry». *Journal of Mass Spectrometry*, 55 (2020), p. e4663. DOI: 10.1002/jms.4663.
- [12] GOODWIN, R. J. A. «Sample preparation for mass spectrometry imaging: small mistakes can lead to big consequences». *Journal of Proteomics*, 75 (2012), p. 4893-4911. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.04.012.
- [13] DANNHORN, A.; KAZANC, E.; LING, S.; NIKULA, C.; KARALI, E.; SERRA, M. P.; VORNG, J.-L.; INGLESE, P.; MAGLENNON, G.; HAMM, G.; SWALES, J.; STRITTMATTER, N.; BARRY, S. T.; SANSOM, O. J.; POULOGIANNIS, G.; BUNCH, J.; GOODWIN, R. J. A.; TAKATS, Z. «Universal sample preparation unlocking multimodal molecular tissue imaging». *Anal. Chem.*, 92 (2020), p. 11080-11088. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c00826.
- [14] HUIZING, L. R. S.; ELLIS, S. R.; BEULEN, B. W. A. M. M.; BARRÉ, F. P. Y.; KWANT, P. B.; VREEKEN, R. J.; HEEREN, R. M. A. «Development and evaluation of matrix application techniques for high throughput mass spectrometry imaging of tissues in the clinic». *Clinical Mass Spectrometry*, 12 (2019), p. 7-15. DOI: 10.1016/j.clinms.2019.01.004.
- [15] GEMPERLINE, E.; RAWSON, S.; LI, L. «Optimization and comparison of multiple MALDI matrix application methods for small molecule mass spectrometric imaging». *Anal. Chem.*, 86 (2014), p. 10030-10035. DOI: 10.1021/ac5028534.
- [16] SEGNER, H. «Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption». *Comp. Biochem. Physiol. C*, 149 (2009), p. 187-195. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.10.099.
- [17] RÄFOLS, P.; VILALTA, D.; TORRES, S.; CALAVIA, R.; HEIJS, B.; McDONNELL, L. A.; BREZMES, J.; CASTILLO, E. DEL; YANES, O.; RAMÍREZ, N.; CORREIG, X. «Assessing the potential of sputtered gold nanolayers in mass spectrometry imaging for metabolomics applications». *Plos One*, 13 (2018), p. e0208908. DOI: 10.1371/journal.pone.0208908.

[18] *Lipid Maps* [en línia]. <<https://www.lipidmaps.org>> [Consulta: 20 abril 2024].

[19] FRAHER, D.; SANIGORSKI, A.; MELLETT, N. A.; MEIKLE, P. J.; SINCLAIR, A. J. «Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the

yolk cell is metabolically active in processing lipid». *Cell Reports*, 14 (2016), p. 1317-1329. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.016.

[20] *Bio-Atlas* [en línia]. <<https://bio-atlas.psu.edu/>> [Consulta: 25 abril 2024].



A. Menéndez-Pedriz



C. Bookmeyer



M. Vandenbosch



E. Chicano-Gálvez



R. M. A. Heeren



L. Navarro-Martín



J. Jaumot

Albert Menéndez-Pedriz és estudiant de doctorat en el Programa de Química Analítica i Medi Ambient a la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona (UB), i porta a terme els seus estudis a l'Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis de l'Aigua (IDAEA-CSIC). L'any 2019 va acabar el grau de química i el 2020, el Màster en Química Analítica, ambdós realitzats també a la Facultat de Química de la UB. Els seus estudis de doctorat estan focalitzats sobretot en el desenvolupament de tècniques òmiques innovadores, com són les anàlisis multiòmiques o òmiques espacials, per a una aplicació posterior en toxicologia ambiental.

Christoph Bookmeyer és doctor en química analítica per la Universitat de Münster (Alemanya), on treballava en els fonaments de MALDI-MSI i desenvolupava estratègies de postionització complementàries a MALDI-2. Actualment està centrat en estudis que tenen un enfocament bioquímic, mitjançant l'aplicació de tècniques d'imatge per espectrometria de masses. En la seva posició actual com a Marie Skłodowska-Curie Actions (MSCA) al Laboratori Interdisciplinari de Metabolòmica (MiL@b) de la Universitat Rovira i Virgili, explora les possibilitats d'imatge LDI-MS assistida per superfície basada en nanocapes d'or i altres superfícies activades. A més, aplica diverses tècniques de MALDI-MSI i SALDI-MSI a la recerca biomèdica de teixits cancerosos i al descobriment de nous biomarcadors basats en l'anàlisi de dades multivariants.

Michiel Vandenbosch és doctor en ciències farmacèutiques per la Universitat Catòlica de Lovaina (Bèlgica). Un cop completat el doctorat, va decidir aprofundir en diversos aspectes de la recerca científica adoptant un nou repte relacionat amb la imatge per espectrometria de masses a M4I (Institut d'Imatge Molecular Multimodal de Maastricht de la Universitat de Maastricht, Països Baixos). El seu treball postdoctoral es va centrar en els lipidomes a la malaltia de Parkinson. Actualment, dirigeix la instal·lació MassSpec CORE juntament amb el seu grup de recerca. A les instal·lacions del CORE, M4I proporciona accés a equips, serveis i experiència especialitzats en especificacions massives que donen suport a diversos projectes de recerca en diferents disciplines. El seu grup de recerca es dedica a avaluar noves teràpies mitjançant un enfocament multiòmic, utilitzant espectrometria de masses.

Eduardo Chicano-Gálvez és cap de la Unitat d'Espectrometria de Masses i Imatge Molecular (IMSMI) de l'Institut Maimónides de Recerca Biomèdica de Còrdova (IMIBIC). En aquest càrrec, s'ocupa de l'optimització i l'anàlisi de tècniques d'imatge per

espectrometria de masses, així com de l'anàlisi de dades quantitatives adquirides per LC-MS (DIA, DDA, PRM). Doctorat per la Universitat de Còrdova i màster en bioinformàtica per la Universitat Internacional d'Andalusia (UNIA), després va continuar el seu treball a IMSMI com a tècnic superior de recerca, centrant-se en l'anàlisi multiòmica. Col·labora activament amb investigadors d'arreu del món, principalment en el camp biomèdic, però també en el del medi ambient i l'agricultura i en altres àrees de recerca bàsica i aplicada. La seva recerca actual se centra en la identificació de nous biomarcadors de pronòstic/diagnòstic en fluids i teixits, i en el desenvolupament de nous enfocaments que integren dades MSI i/o dades LC-MS utilitzant intel·ligència artificial, xarxes neuronals, mètodes clàssics d'aprenentatge automàtic i biologia de sistemes.

Ron M. A. Heeren es va doctorar en física tècnica l'any 1992 a la Universitat d'Amsterdam (Països Baixos). Inicialment, va començar a treballar en instrumentació d'imatge molecular i la seva aplicació com a cap de grup a l'institut de recerca FOM-AMOLF (Amsterdam). Del 2001 al 2019, va ser professor a la Facultat de Química de la Universitat d'Utrecht mentre dirigia el Grup d'Imatges a AMOLF. El 2014 va començar com a professor distingit i catedràtic a la Universitat de Maastricht (Limburg). És el fundador i director científic d'M4I, l'Institut d'Imatge Molecular Multimodal de Maastricht al Campus de Salut de la Universitat de Maastricht. El 2021 va ser elegit membre de la Reial Acadèmia Holandesa de Ciències (KNAW). Els seus interessos acadèmics de recerca són la medicina personalitzada basada en l'espectrometria de masses, la imatge molecular translacional i la recerca òmica, la bioinformàtica d'alt rendiment i el desenvolupament i la validació de tècniques innovadores d'imatge analítica molecular en totes les disciplines científiques.

Laia Navarro-Martín és llicenciada en ciències del mar per la Universitat de Cadis i doctora en biologia per la Universitat de Barcelona. El seu interès per la fisiologia i l'endocrinologia animal l'ha portat a estudiar l'efecte dels contaminants ambientals en la salut dels organismes aquàtics. Els objectius principals de la seva recerca són esbrinar els mecanismes moleculars implicats en la modulació del sistema endocrí, a més de les alteracions provocades per l'exposició a disruptors endocrins, identificar biomarcadors d'exposició mitjançant enfocaments multiòmics i avaluar la toxicitat associada a contaminants de preocupació emergent presents en mostres d'aigua ambiental.

Joaquim Jaumot és doctor en química per la Universitat de Barcelona. La seva recerca se centra en el desenvolupament i l'aplicació de mètodes quimiomètrics d'anàlisi de dades. D'aquesta manera, ha construït una carrera de recerca multidisciplinària aplicant la seva experiència en diferents camps d'estudi, com la biologia molecular, la química analítica i de processos i, més recentment, la química ambiental. En aquest darrer punt, la seva recerca s'ha focalitzat en l'estudi de l'impacte dels estressors ambientals en diversos organismes model mitjançant la caracterització dels canvis en els seus perfils de metabòlits i lípids emprant metodologies de massa i espacials.