



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



COS

Centre for Omic Sciences

ESTUDI DE LÍPIDS EN TEIXIT MITJANÇANT MALDI IMAGING I LA SEVA APLICACIÓ A L'ÀMBIT FORENSE

Màster en Genètica, Física i Química Forense
AINA LLORACH RODRIGUEZ

Tutor acadèmic: Joan Carles Ronda

Universitat Rovira i Virgili

Tutor d'empresa: Pol Herrero

Center of Omic Sciences

ABSTRACT

In this study, the MALDI-IMS (MALDI Imaging) technique will be used specifically. Mass spectrometry in MALDI images is the use of ionization of matrix-assisted laser desorption as a mass spectrometry image technique in which the sample, often a section of the thin tissue, moves in two dimensions while registering the mass spectrum. The most important advantage of this technique shows us the ability to measure the distribution of a large number of analytes without destroying the sample, this fact makes it a useful method for studying tissues.

An important point in the present study will be the optimization of the preparation and use of different types of matrix, such as 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), sinapinic acid (SA), α -cyano acid -4-hidroxicinamic (CHCA) and 9-aminoacridine (9-AA).

In several works it has been proven that the MALDI-TOF-MS technology is useful for genetic markers. Along with multivariate analysis, it can be used to determine intermediate PMIs and improves the sensitivity of detection of some drugs embedded in a hair matrix. It is also helpful for providing a level of detection of methamphetamine up to a nanogram per millimeter incorporated into the hair. It can prove for the elaboration of fast chemical profiles or the image of the red marks, to detect the chemical species contained in the residue and this allows the physical reconstruction of the ridges of the fixed fin.

Mass spectrometry in MALDI images has entered the field of tissue-based research, providing unique advantages to analyze them in detail.

RESUM

Aquest estudi es centra en la tècnica MALDI, concretament MALDI Imaging. L'espectrometria de masses en imatges MALDI és l'ús de la ionització de la desorció làser assistida per matrius com una tècnica d'imatge d'espectrometria de masses en la qual la mostra, sovint una secció del teixit prim, es mou en dues dimensions mentre se'n registra l'espectre de masses.

L'avantatge més important d'aquesta tècnica ens mostra la capacitat de mesurar la distribució d'un gran nombre d'analits sense destruir la mostra, fet que el converteix en un mètode útil per a l'estudi dels teixits.

Un punt important en aquest estudi serà l'optimització de la preparació i l'ús de diferents tipus de matrius, com l'àcid 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), l'àcid sinapínic (SA), l' α -cianoàcid -4-hidroxicinàmic (CHCA) i 9-aminoacridina (9-AA).

L'espectrometria de masses en imatges de MALDI ha contribuït al camp de la investigació basada en teixits, oferint avantatges únics per analitzar-los en detall.

En diferents estudis, s'ha demostrat que la tecnologia MALDI-TOF-MS és útil per als marcadors genètics. Juntament amb l'anàlisi multivariant, es pot utilitzar per determinar els intervals postmortem i que millora la sensibilitat de detecció d'alguns medicaments incrustats en una matriu de cabell.

També és útil per proporcionar un nivell de detecció de metamfetamina fins a un ng/mm incorporat al cabell. També ha estat utilitzat per a l'elaboració de perfils químics ràpids o la imatge de les marques vermelles per detectar les espècies químiques contingudes en el residu, i aquest últim també permet la reconstrucció física de les crestes de l'aleta fixa.

ÍNDEX

ABSTRACT.....	2
RESUM.....	3
1. INTRODUCCIÓ.....	6
1.1. Font de ionització.....	7
1.1.1. Làser	8
1.2. Analitzador de masses.....	8
1.3. Detector	9
1.4. Construcció de la imatge.....	10
1.5. Matrius.....	11
2. OBJECTIUS.....	14
3. METODOLOGIA	15
3.1. Calibratge amb patrons.....	16
3.2. Preparació de mostres	23
4. DISCUSIÓ	26
5. APLICACIÓ AL CAMP FORENSE	28
6. CONCLUSIONS.....	32
7. BIBLIOGRAFIA.....	33

Figura 1. Equip MALDI.....	7
Figura 2. Diferència d'espectres entre MALDI-TOF i ESI-TOF.	9
Figura 3. Diferències a l'espectre resultant entre ionització mitjançant MALDI o ESI.	10
Figura 4. Principi d'espectrometria de masses d'imatges MALDI. Dalt a la dreta: Una secció de teixits convencionals està recoberta amb una matriu, que permet l'extracció de molècules del teixit. Després, la mostra s'introdueix al MALDI en el qual obtenim un espectre de masses, mentre que el làser UV només afecta els cristalls de la matriu sense afectar la secció del teixit. Posteriorment al mesurament de MALDI, es realitza una tinció histològica, permetent així una anàlisi dirigida per histologia dels espectres de masses. Amb l'espectre, els pics característics dels diferents components, i la imatge del teixit tenyit podem reconstruir i veure on es localitzen les compostos trobats en el nostre teixit damunt de la imatge.....	11
Figura 5. Espectre del compost S-LPC, massa teòrica: 525.3789 m/z.	19
Figura 6. Espectre del compost PP-PE, massa teòrica: 693.5303 m/z.	19
Figura 7. Espectre del compost PP-PC, massa teòrica: 735.5773 m/z.	20
Figura 8. Espectre del compost POL-TG, massa teòrica: 858.7676 m/z.	20
Figura 9. Espectre del compost SS-DG, massa teòrica: 626.5844 m/z.	21
Figura 10. Espectre del compost Àcid taurocòlic, massa teòrica: 516.2989 m/z.	21
Figura 11. Mix dels lípids seleccionats per tal de calibrar l'instrument.	22
Figura 12. Estructura química de PC (18:0/18:1).	24
Figura 13. Espectre del mateix compost en cervell a diferents resolucions (Nota: no és el mateix tall de cervell).	24
Figura 14. Estructura química de PC (16:0/16:0).	25
Figura 15. Espectre del mateix compost en cervell a diferents resolucions (Nota: no és el mateix tall de cervell).	25
Figura 16. Taula resum de les proves realitzades.	26
Figura 17. Estructura química de la matriu umbelliferone.	29
Figura 18. Estructura química de la metamfetamina.	30

1. INTRODUCCIÓ

La ionització MALDI (matrix-assisted làser desorption), acoblada a un analitzador TOF (temps de vol), és una tècnica de ionització suau utilitzada en espectrometria de masses que permet l'anàlisi de biomolècules i molècules orgàniques grans que tendeixen a fer-se fràgils i fragmentar-se quan són ionitzades.

En aquesta tècnica, la mostra és barrejada amb la matriu en excés sobre una superfície de metall de tal manera que les dues co-cristal·litzen quan s'evapora el solvent. Aquesta preparació és sotmesa a polsos curts de làser en alt buit, el que provoca que l'absorció d'energia per part de la matriu, i aquesta, posteriorment, sigui convertida en energia d'excitació i en transferència de H^+ a la mostra (ionització) donant lloc, normalment, a espècies monocarregades que són analitzades mitjançant l'analitzador TOF (temps de vol). Aquest analitzador permet la determinació de la massa en una regió de buit mitjançant una mesura molt precisa del període de temps des de l'acceleració dels ions en la font, fins que impacten amb el detector.

L'espectrometria de masses de ionització làser amb matriu ha demostrat ser una de les tècniques de ionització més potents per a l'anàlisi espectromètrica de masses d'aminoàcids, pèptids i proteïnes, carbohidrats, àcids nucleics i fàrmacs.¹

En l'estudi que es realitzarà s'utilitzarà concretament la tècnica MALDI-IMS (MALDI Imaging), l'espectrometria de masses d'imatges MALDI és l'ús de la ionització de desorció làser assistida per matrius com una tècnica d'imatges d'espectrometria de masses en que la mostra, sovint una secció del teixit prim, es mou en dues dimensions mentre se'n registra l'espectre de masses.

L'avantatge més important que ens mostra aquesta tècnica és la capacitat de mesurar la distribució d'una gran quantitat d'analits alhora sense destruir la mostra, aquest fet la converteixen en un mètode útil en l'estudi de teixits.

¹ Hoffmann, E. i Stroobant, V. (2007) *Mass Spectrometry, Principles and Applications* (3a ed.) England: Wiley Editorial.

A continuació es mostra un instrument MALDI-TOF i es detallen les seves parts més importants:

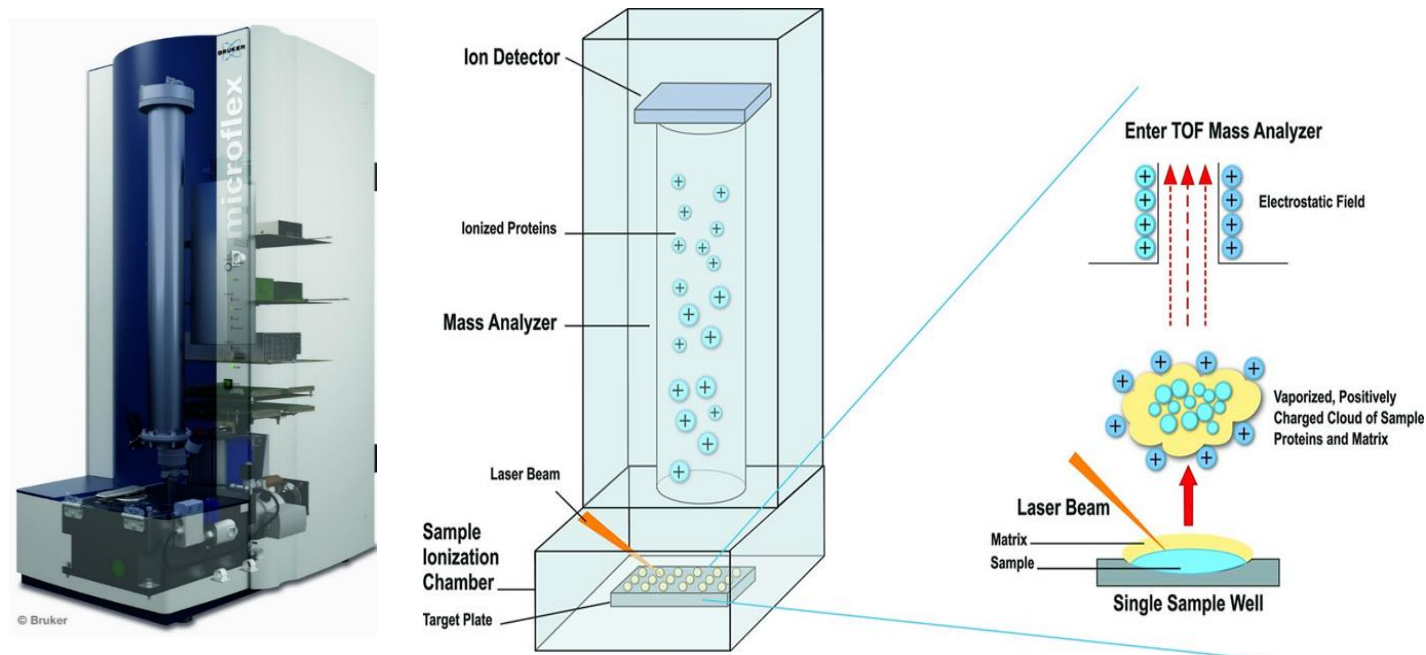


Figura 1. Equip MALDI

L'espectròmetre de masses produeix, separa i detecta ions en fase gasosa. Els elements principals que formen un espectròmetre de masses són tres: una font de ionització, un analitzador de masses i un detector. Els tres elements es mantenen en una atmosfera de buit.

A la figura 1 s'esquematitzen els components d'un espectròmetre de masses.

A continuació es detallen cada part de l'instrument:

1.1. Font de ionització

La font de ions és l'element de l'espectròmetre que ionitza la mostra que s'analitzarà (el analit).

El resultat d'aplicar una font de ionització sobre una molècula és la formació de ions, generats per excés o pèrdua d'electrons, de manera que aquestes molècules estaran carregades elèctricament.

En el cas del MALDI, la mostra és continguda en una matriu orgànica, la qual cristal·litza en contacte amb l'aire. Aquesta barreja es diposita en una targeta d'un material conductiu i és irradiada per un làser. L'energia del làser causa una desestructuració de la matriu cristal·litzada generant un núvol de partícules. Els ions d'aquest núvol s'extreuen en ser sotmesos a un camp elèctric, a través del qual aquests són accelerats a causa de la seva càrrega. Els ions obtinguts són dirigits cap a l'analitzador de masses i, posteriorment, al detector.

1.1.1. Làser

Les tècniques de MALDI solen emprar l'ús de làsers UV com ara làsers de nitrogen (337nm) i làsers Nd: YAG triplicats i quadruplicats (355nm i 266nm, respectivament).

El làser es dispara als cristalls de la matriu. La matriu absorbeix l'energia del làser i la matriu és ionitzada (per addició d'un protó). La matriu transfereix protons a les molècules d'analit, carregant-lo. La desorció/ionització amb el MALDI es porta a terme al buit on els ions solen produir-se a 10mTorr o menys.

1.2. Analitzador de masses

Es tracta del component principal de l'espectròmetre. Tot i existir diferents analitzadors, el més utilitzat en les aplicacions de l'espectrometria de masses dins el camp de la microbiologia és l'analitzador de tipus TOF degut al seu ampli rang de masses.

L'estructura delimita una zona de vol a través de la qual els ions són accelerats adquirint una elevada energia cinètica, i durant aquest trajecte es separaran segons la seva ràtio massa/càrrega (m/z). La major part de ions generats tenen una sola càrrega ($z=1$), de manera que la ràtio m/z equival a m . El període de temps que triga cada ió a arribar fins al detector és denominat temps de vol i depèn d'aquesta ràtio, és per això que sabent el temps de vol de cadascun dels ions podem relacionar-los amb la seva estructura o massa.

1.3. Detector

Al final de la zona de vol dels ions impacten en el detector. A partir de la informació recollida pel detector, es genera l'espectre de masses en el qual es mostra la massa dels diferents ions de la mostra calculada a partir del temps de vol. A l'eix de les ordenades a l'espectre de masses es representen els valors de la ràtio m/z , mentre que en l'eix de les abscisses es representa la intensitat, és a dir, el nombre de ions d'una determinada ràtio m/z que ha impactat contra el detector.

En el cas del MALDI-TOF, com s'ha comentat amb anterioritat, la ràtio m/z sol ser equivalent a la massa molecular (m) de l'analit, de manera que en l'espectre típic de MALDI-TOF s'observa un només pic predominant, corresponent a aquesta massa. En el cas de l'ESI-TOF (un altre tipus de ionització), en l'espectre generat es veuen representats tots els ions generats a partir de l'anàlit en les seves diferents intensitats, de manera que s'observen múltiples pics.

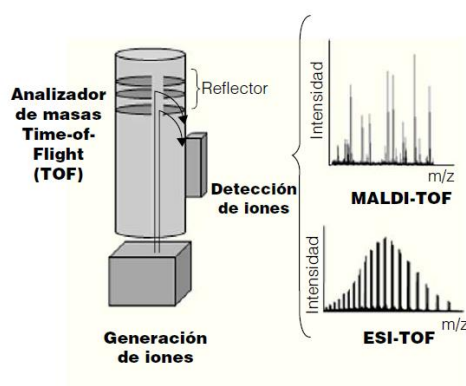


Figura 2. Diferència d'espectres entre MALDI-TOF i ESI-TOF.

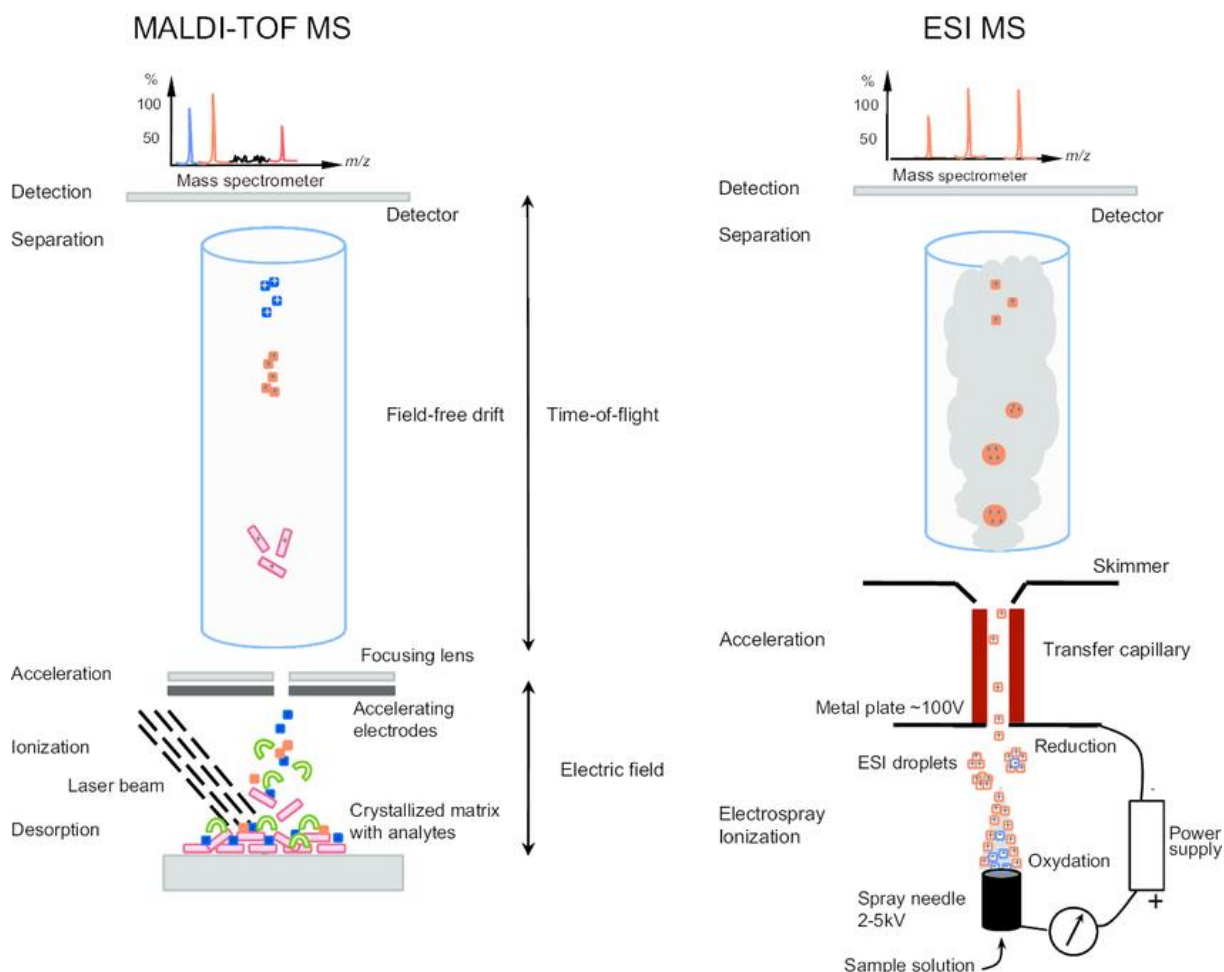


Figura 3. Diferències a l'espectre resultant entre ionització mitjançant MALDI o ESI.

1.4. Construcció de la imatge

Les imatges es construeixen traçant la intensitat dels ions front de la posició relativa de les dades de la mostra. La resolució espacial afecta molt a la informació molecular obtinguda de l'anàlisi.

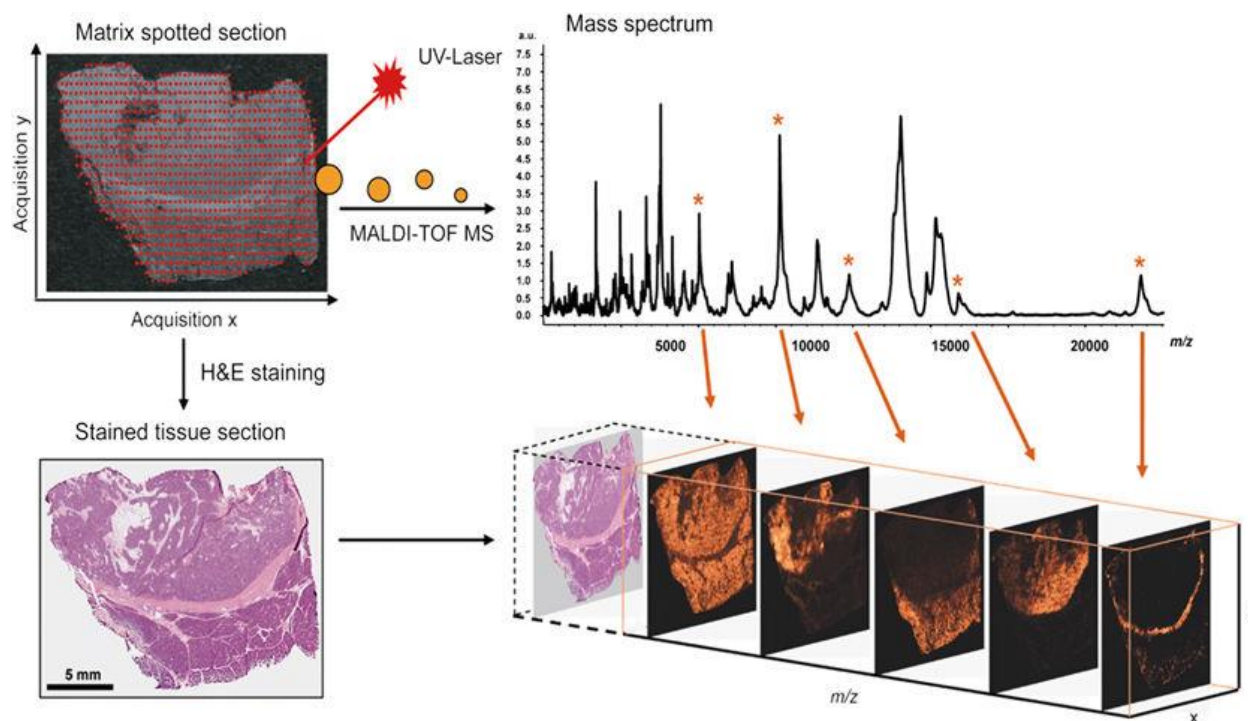


Figura 4. Principi d'espectrometria de masses d'imatges MALDI. Dalt a la dreta: Una secció de teixits convencionals està recoberta amb una matriu, que permet l'extracció de molècules del teixit. Després, la mostra s'introdueix al MALDI en el qual obtenim un espectre de masses, mentre que el làser UV només afecta els cristalls de la matriu sense afectar la secció del teixit. Posteriorment al mesurament de MALDI, es realitza una tinció histològica, permetent així una anàlisi dirigida per histologia dels espectres de masses. Amb l'espectre, els pics característics dels diferents components, i la imatge del teixit tenint podem reconstruir i veure on es localitzen les compostos trobats en el nostre teixit damunt de la imatge.

1.5. Matrius

El paper de la matriu és fonamental per als processos electroquímics que es produeixen. Generalment es tracta de substàncies orgàniques que absorbeixen l'energia del làser. Algunes de les matrius més utilitzades són l'àcid α -ciano-4-hidroxitrans cinàmic, l'àcid 2,5-dihidrobenczoico, o l'àcid sinapínic.

Existeixen diferents mètodes d'aplicació de la matriu a la mostra a estudiar:

- a. La matriu seca es pot sublimar al teixit a buit.

- b. La matriu es pot dissoldre en un dissolvent. Això es fa sovint amb una solució mixta d'aigua altament purificada i un dissolvent orgànic, com l'acetonitril/àcid trifluoroacètic. I després aquesta solució es polvoritza damunt del teixit.

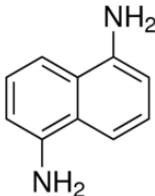
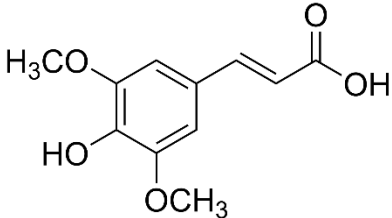
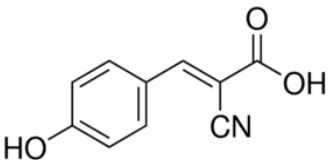
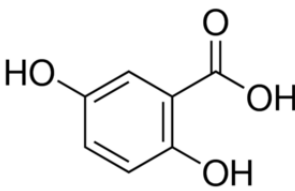
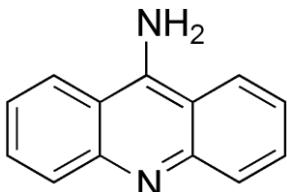
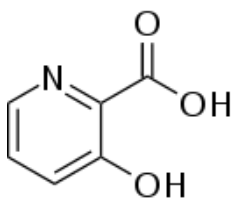
A l'hora de triar la matriu, es busquen unes característiques determinades d'aquesta per tal de facilitar l'estudi:

- Es busca una matriu amb pes molecular baix, que garanteixi una fàcil evaporació, però encara prou gran que no s'evapori durant la preparació de la mostra i que sigui estable al buit.
- Ha de tenir una forta absorció òptica tant en el radi ultraviolat com en l'infraroig, per tal d'absorbir ràpidament i de forma eficient la irradiació làser.
- Normalment, la matriu conté un cromòfor, que és una útil ajuda visual.

Triarem la matriu més adequada per l'espectrometria de masses MALDI-Imaging depenen del tipus de compost que s'analitzi. La majoria de les matrius són àcides i són excel·lents donadores de protons, que condueixen la ionització del seu analit. Tanmateix, per a mostres sensibles a l'àcid, també hi ha algunes matrius bàsiques que s'utilitzen. També hi ha altres matrius que contenen compostos similars a naftalina, que poden servir com a receptor d'electrons.

A continuació, es mostren algunes matrius d'ús comú, amb les seves aplicacions:

Taula 1.Descripció de matrius típiques en estudis de MALDI

Matriu	Aplicació
1,5-diaminonaftalè 	- S'utilitza per a imatges d'alta resolució espacial de lípids. - Funciona bé tant per a modes iònics positius com negatius.
Àcid 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinàmic (Àcid sinapínic) 	- Detecció de molècules d'alt pes com a proteïnes que superen els 5000 daltons. - S'utilitza principalment en mode de ions positiu.
Àcid α-ciano-4-hidroxicinàmic (CHCA) 	- Detecció de molècules de pes mitjà com pèptids. - S'utilitza principalment en mode positiu.
Àcid 2,5-dihidroxibenzoic (DHB) 	- Detecció de molècules de pes baix com pèptids, nucleòtids, oligonucleòtids i oligosacàrids, que no ionitzen bé amb CHCA o SA. - Més apropiat per a l'anàlisi de manera positiva de ions.
9-aminoacridina (9-AA) 	- Detecció de molècules de baix pes com els lípids i els metabòlits. - Més apropiat per a l'anàlisi del mode de ions negatius.
Àcid 3-hidroxipicolínic (HPA) 	- Detecció d'oligonucleòtids.

2. OBJECTIUS

El principal objectiu serà l'optimització de la preparació i ús de diferents tipus de matriu, com l'àcid 2,5-dihidroxibenzoic (DHB), l'àcid sinapínic (SA), l'àcid α -ciano-4-hidroxicinamic (CHCA) i la 9-aminoacridina (9-AA). Es provarà l'ús de les matrius amb l'equip de polvoritzat automàtic, seguit per la detecció i identificació de diverses famílies de lípids en diversos tipus de teixits d'interès biològic, per permetre la realització d'anàlisi de rutina amb resultats de qualitat.

Aquest projecte s'emmarca doncs, en la innovació de les fases de preparació de les mostres de teixit per a ser analitzades per MALDI-IMS, amb la comparació dels resultats obtinguts amb les tècniques clàssiques d'esprai automàtic, centrant-nos en la visualització de la distribució de lípids i fent èmfasi en l'elecció de la millor matriu en funció de la família de compostos lipídics a estudiar.

3. METODOLOGIA

A continuació s'explica la metodologia que s'emprarà de manera general, més endavant es detalla cadascun dels passos seguits, segons sigui un patró per calibrar o la mostra a analitzar.

1. Preparació del teixit/patrons

2. Preparació de la matriu.

La matriu ha d'absorbir a la longitud d'ona del làser i ionitzar l'analít. La selecció de matrius i el sistema de dissolvents es basen molt en la classe analítica desitjada en imatges. L'analít ha de ser soluble en el dissolvent per a barrejar i ser capaç de recristal·litzar-se per la matriu. La matriu ha de tenir un recobriment homogeni per tal d'augmentar la sensibilitat, la intensitat i la reproductibilitat entre dispars del làser.

La tècnica que s'utilitzarà és la fumigació (o polvorització). La matriu es polvoritza, en petites gotes, a la superfície de la mostra, que es deixa assecar i es revesteix fins que hi ha prou matriu per analitzar la mostra. La grandària dels cristalls depèn del sistema de dissolvent que s'utilitza, en el nostre cas utilitzarem l'instrument ImagePrep (en el cas de tractament de mostra).

3. Deposició de la matriu sobre el teixit/patrons.

4. Introducció de la placa al MALDI.

5. Realització de l'espectre.

- a. Selecció de la resolució i de la polaritat del làser.

6. Comprovació dels resultats.

3.1. Calibratge amb patrons

En el present estudi, primer de tot es realitza un calibratge per a la detecció de lípids, tant en mode positiu com en negatiu.

Per a realitzar-la, es seleccionen es llisten uns estàndards, que depenent de la seva visualització en aquesta tècnica es seleccionaran o no a l'hora de calibrar l'instrument.

Taula 2. $[M+H]^+$ calculat amb el software Isotope Distribution Calculator.

Estàndard	Fórmula molecular	$[M+H]^+$ (m/z)
PO-PG	C ₄₀ H ₇₈ O ₁₀ P	750.5405
PO-DG	C ₃₇ H ₇₁ O ₅	596.5374
Esfingomielina	C ₄₁ H ₈₃ N ₂ O ₆ P	731.6061
S-LPC	C ₂₆ H ₅₅ NO ₇ P	525.3789
PP-PC	C ₄₀ H ₈₁ NO ₈ P	735.5773
PP-PE	C ₃₇ H ₇₅ NO ₈ P	693.5303
PP-PG	C ₃₈ H ₇₆ O ₁₀ P	724.5249
PP-PS	C ₃₈ H ₇₅ NO ₁₀ P	737.5201
SS-PC	C ₄₄ H ₈₉ NO ₈ P	791.6399
P-LPE	C ₂₁ H ₄₅ NO ₇ P	455.3006
SS-DG	C ₃₉ H ₇₇ O ₅	626.5844
S-MG	C ₂₁ H ₄₃ O ₄	360.3234
LL-DG	C ₃₉ H ₆₉ O ₅	618.5218
POL-TG	C ₅₅ H ₁₀₂ O ₆	858.7676
Àcid taurocòlic	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	516.2989
Matrius		
DHB (àcid 2,5-dihidroxibenzoic)	C ₇ H ₆ O ₄	155.0339
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.0499

Abreviatures:

PG: fosfatidilglicerol

DG: diglicèrid

PC: fosfatidilcolina

TG: triglicèrid

LPC: lys-fosfatidilcolina

Àcids dels quals deriven:

PE: fosfatidiletanolamina

P (àcid palmític): 16:0

LPE: lys- fosfatidiletanolamina

O (àcid oleic):18:1

PS: fosfatidilserina

S (àcid esteàric): 18:0

MG: monoglicèrid

L (àcid linoleic): 18:2

A continuació s'exposa el procediment que s'utilitza per a realitzar el calibratge de l'instrument. L'objectiu és seleccionar un grup dels estàndards mostrats a la taula 2 per a calibrar.

1. Preparació dels patrons

Deposició d'1µL per duplicat de cada un dels estàndards en una placa MALDI.

2. Preparació de la matriu.

Un cop sec, el microlitre de patró que s'ha dipositat als pous de la placa, s'afegeix 1µL de la matriu seleccionada.

Es va realitzar el seguit de proves que es detallen per tal d'escollir la matriu:

Es va provar de polvoritzar amb la matriu **DHB**, tan en medi àcid com en bàsic. Es va observar que era una matriu útil per aquesta tècnica ja que la majoria de patrons s'observaven a l'espectre, però únicament en medi àcid, ja que en medi bàsic, no es podien observar la majoria. En medi bàsic només observàvem el palmitoiletanolamida, l'àcid taurocòlic i PO PG.

Les mateixes proves es van realitzar amb un altre matriu, la **Quercetina**.

Les primeres proves amb quercetina es van realitzar en medi àcid. Es va veure que en aquestes condicions aquesta matriu precipitava i no es solubilitzava, és per això que es van buscar altres referències bibliogràfiques on utilitzessin aquesta matriu en estudis MALDI. Es van realitzar les proves, doncs, en condicions bàsiques. En aquestes

condicions es va observar que podíem visualitzar la majoria dels estàndards utilitzats i que no precipitava.

Aquests estudis (tant amb el DHB com amb la Quercetina) es van realitzar en dues polaritats diferents: positiu i negatiu.

Obtenim millors resultats amb la polarització positiva. En mode negatiu, no s'observaven la majoria del patrons. Es per això que es procedeix a calibrar únicament en positiu.

Tot i que els estudis amb la Quercetina van ser positius, es va utilitzar el DHB per calibrar.

3. Deposició de la matriu sobre el teixit/patrons.

En el cas del calibratge, la deposició de la matriu es feia manual.

4. Introducció de la placa al MALDI.

5. Realització de l'espectre.

6. Comprovació dels resultats.

S'ha observat cadascun d'ells per tal de veure quins podíem seleccionar per un millor calibratge.

S'han seleccionat els estàndards que es mostren a continuació, degut a la seva bona visualització i ionització a l'instrument amb polarització positiva:

- | | |
|-------------------|----------|
| - Quercetina | - PP-PE |
| - S-LPC | - PP-PC |
| - Àcid Taurocòlic | - POL-TG |
| - SS-DG | |

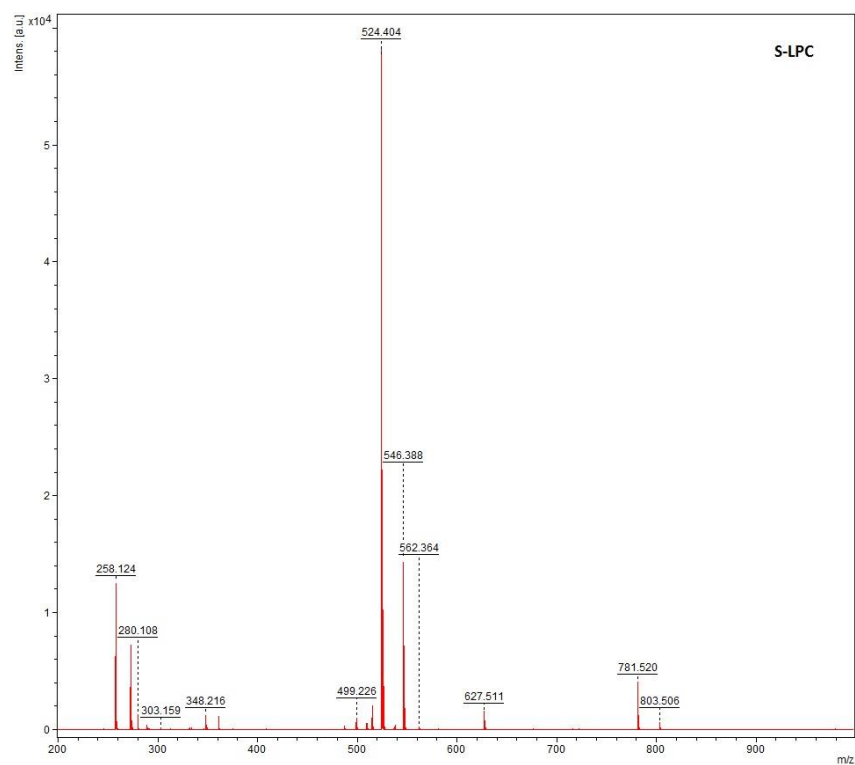


Figura 5. Espectre del compost S-LPC, massa teòrica: 525.3789 m/z .

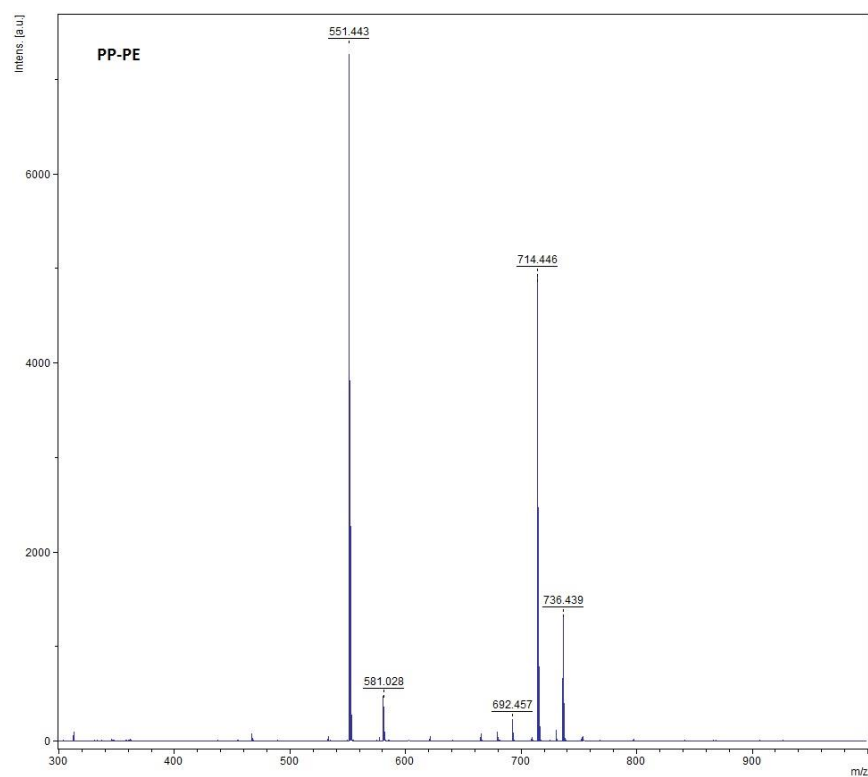


Figura 6. Espectre del compost PP-PE, massa teòrica: 693.5303 m/z .

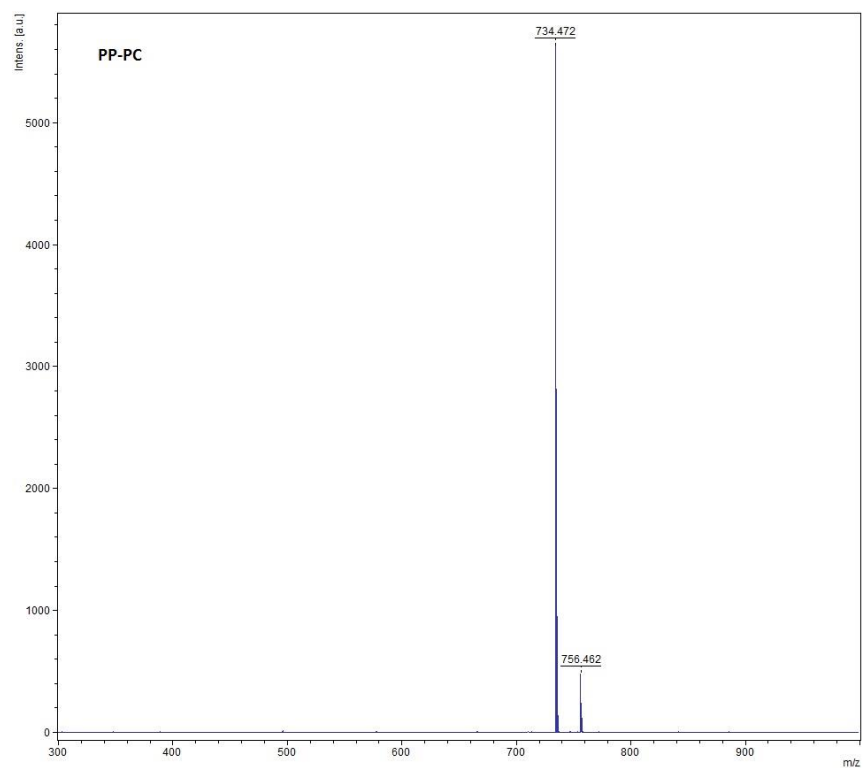


Figura 7. Espectre del compost PP-PC, massa teòrica: 735.5773 m/z.

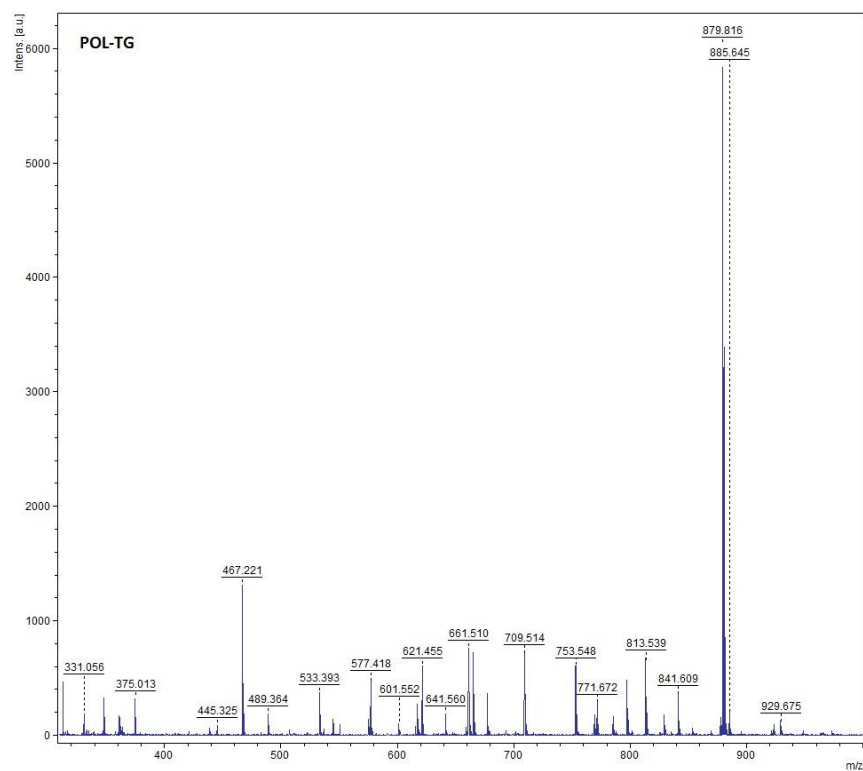


Figura 8. Espectre del compost POL-TG, massa teòrica: 858.7676 m/z.

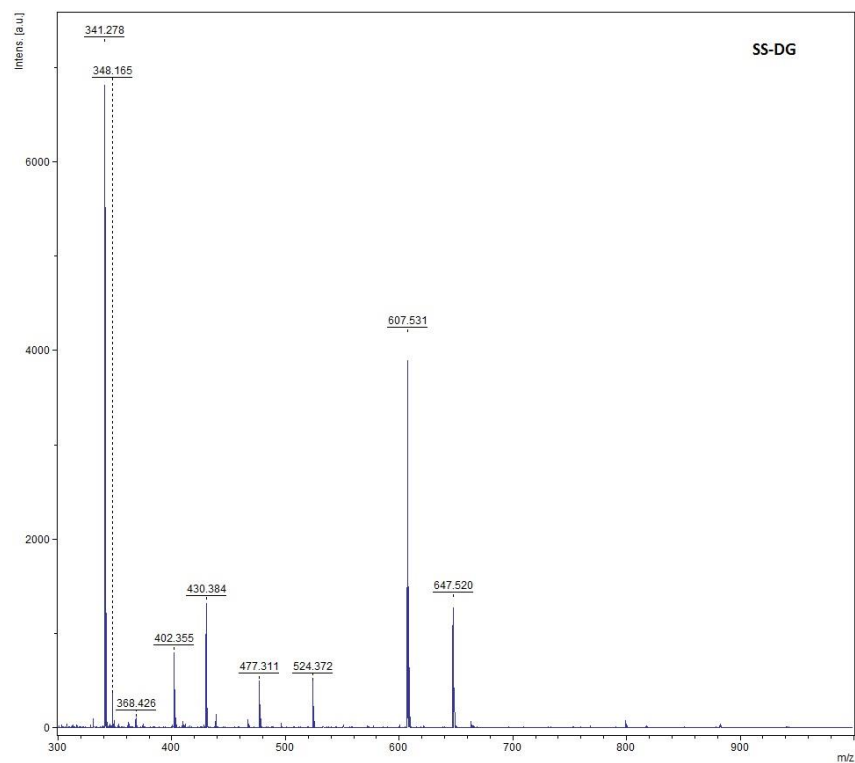


Figura 9. Espectre del compost SS-DG, massa teòrica: 626.5844 m/z .

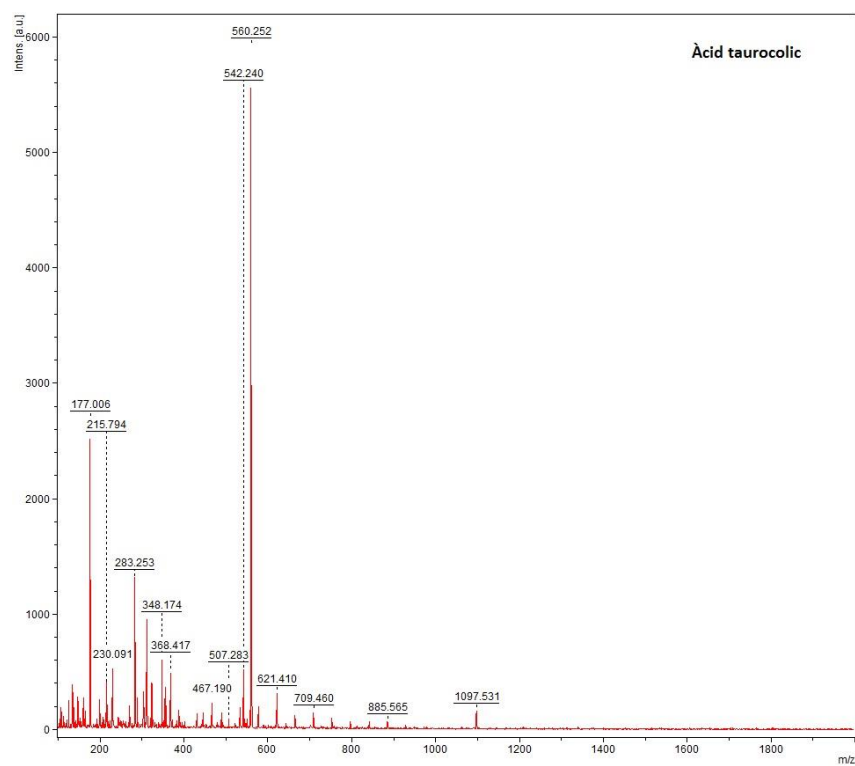


Figura 10. Espectre del compost Àcid taurocòlic, massa teòrica: 516.2989 m/z .

A continuació s'ha realitzat una mescla d'aquests estàndards seleccionats per tal de poder calibrar.

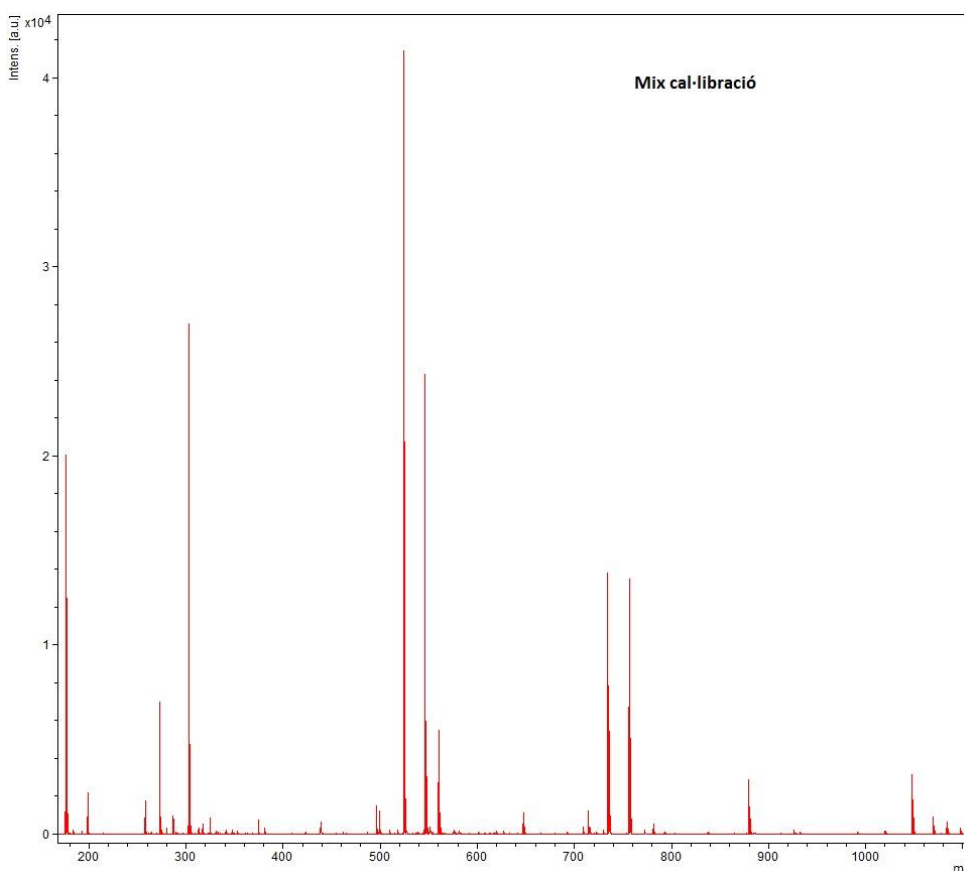


Figura 11. Mix dels lípids seleccionats per tal de calibrar l'instrument.

L'espectre resultant que s'obté en el mix és el que es mostra a la Figura 11. Amb aquest s'ha pogut calibrar. Els pics que apareixen són els corresponents als següents compostos en la ionització corresponent:

- Quercetina $[M+H^+] = 303.04990$ m/z
- S-LPC $[M+H^+] = 524.37110$ m/z
- S-LPC $[M+Na^+] = 546.35300$ m/z
- Àcid Taurocòlic $[M+2Na^+] = 560.26280$ m/z
- SS-DG $[M+Na^+] = 647.55850$ m/z
- PP-PE $[M+Na^+] = 714.50440$ m/z
- PP-PC $[M+H^+] = 734.56940$ m/z
- PP-PC $[M+Na^+] = 756.55140$ m/z
- POL-TG $[M+Na^+] = 879.74120$ m/z
- S-LPC $[2M+H^+] = 1047.7349$ m/z

Fixant els valors mostrats, s'ha pogut obtenir un bon calibratge de l'instrument en polarització positiva. Aleshores ja es pot procedir a l'estudi de les mostres.

Es calibrarà cada vegada abans d'un estudi d'una mostra per tal d'evitar qualsevol desviació de l'instrument.

3.2. Preparació de mostres

La preparació de la mostra és un pas crític en l'espectroscòpia d'imatges. Molts articles prenen làmines de teixits prims muntats en dispositius de microscopi conductor i apliquen una matriu MALDI adequada al teixit, ja sigui manualment o automàticament. A continuació, la placa preparada s'insereix en un espectròmetre de masses MALDI. L'espectròmetre de masses registra la distribució espacial d'espècies moleculars, com ara pèptids, proteïnes o molècules petites.

Posteriorment, s'usa un programari de processament d'imatges adequat per importar dades de l'espectròmetre de masses per permetre la visualització i la comparació amb la imatge òptica de la mostra.

En aquest estudi, el teixit s'incrusta per mitjà d'una gelatina que suporta el teixit mentre s'està tallant, alhora que redueix la contaminació que s'observa en les tècniques òptimes de temperatura de tal. El gruix de la secció de teixit muntat varia depenent del teixit, en el nostre cas es tallen seccions d'entre 10 i 12 micres.

Es realitza l'estudi directament al teixit, és a dir que es polvoritza amb la matriu seleccionada (DHB en medi àcid) i es realitza l'estudi MALDI-IMS per tal de veure quins lípids estan presents al cervell i a on es localitzen o quina és la seva distribució.

Aquest estudi es va realitzar amb dues diferents distàncies entre dispar i dispar per tal de veure quina era la millor opció. Es va realitzar un estudi utilitzant 100µm entre dispar i dispar del làser i un altre estudi amb 50µm.

A continuació es mostra la distribució de dos dels lípids més importants i abundants al cervell tant en l'estudi a 100 µm com a 50 µm.

Les fosfatidilcolines (PC) són una classe de fosfolípids que incorporen la colina com a grup de cap. Són un component important de les membranes biològiques i es poden obtenir fàcilment a partir d'una varietat de fonts fàcilment disponibles, com el rovell d'ou o la soja, a partir de la qual s'extreuen mecànicament o químicament amb hexà.

PC (18:0/18:1):

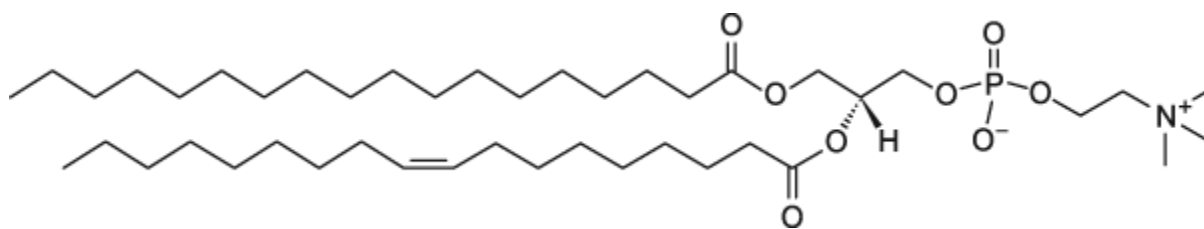


Figura 12. Estructura química de PC (18:0/18:1).

PC (18:0/18:1) → 826.5 m/z

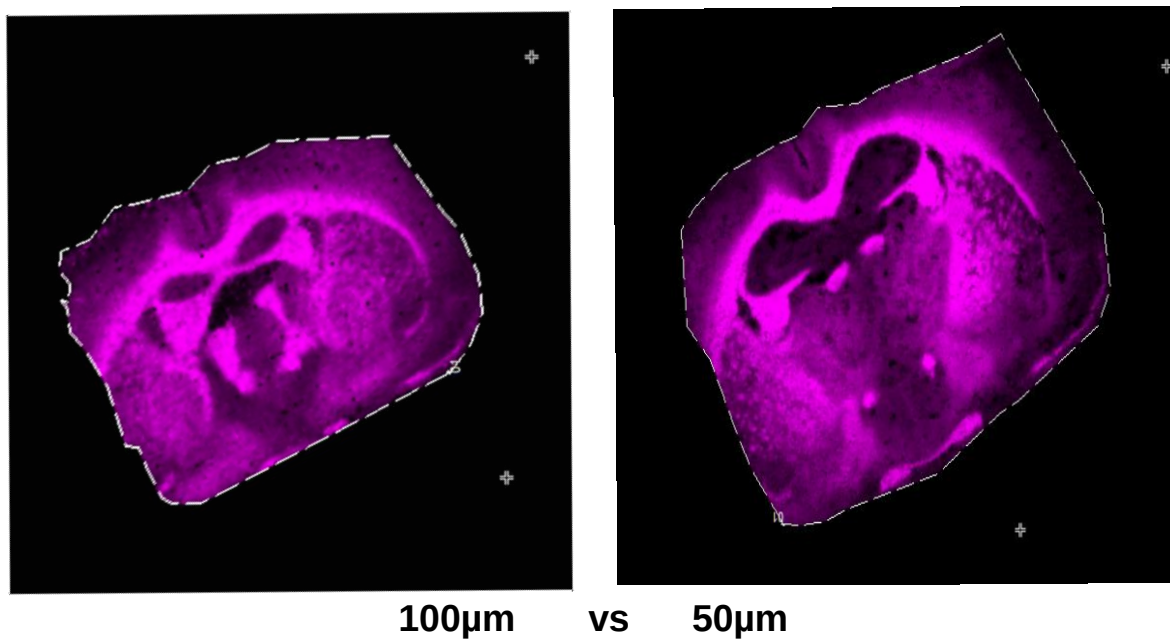


Figura 13. Espectre del mateix compost en cervell a diferents resolucions (Nota: no és el mateix tall de cervell).

PC (16:0/16:0):

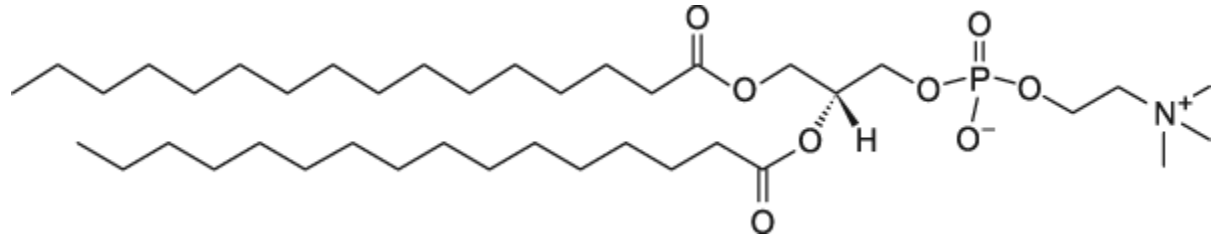
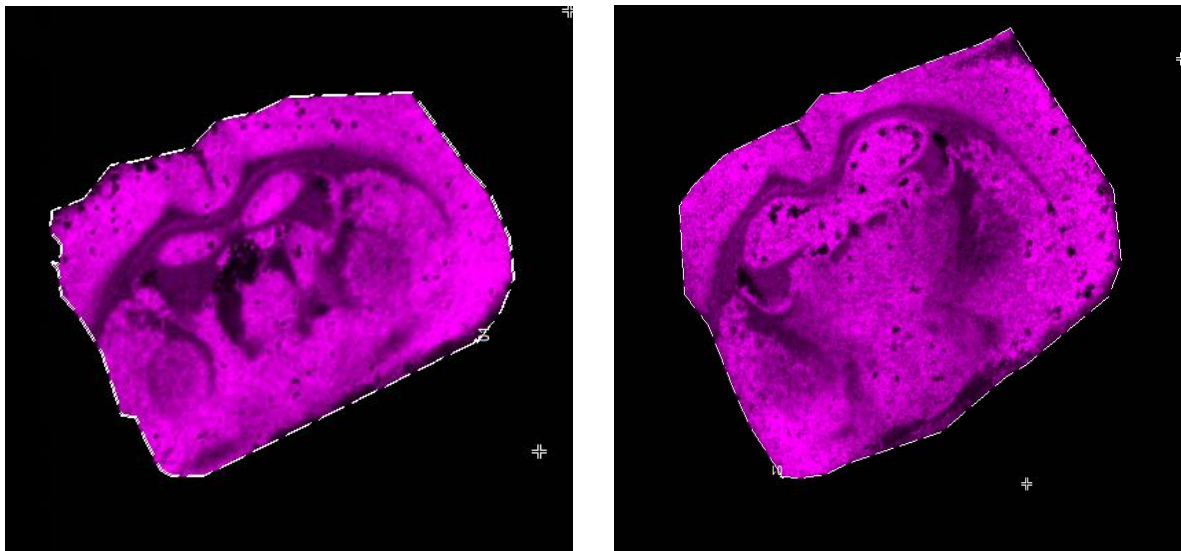


Figura 14. Estructura química de PC (16:0/16:0).

PC (16:0/16:0) → 772.5 m/z



100μm vs 50μm

Figura 15. Espectre del mateix compost en cervell a diferents resolucions (Nota: no és el mateix tall de cervell).

4. DISCUSIÓ

Els estudis realitzats amb DHB ens van permetre obtenir el resultat d'una millor resolució quan realitzàvem els dispars cada 50µm. Tal i com podem observar en les figures 6 i 8, l'espectre a 50µm d'un mateix compost, s'observa amb una millor resolució; és per això que es fa aquesta tria.

Aquestes proves van ser útils per a realitzar posteriorment l'estudi directe al teixit amb MALDI-IMS. En aquest cas es va realitzar l'estudi amb una distància entre dispar i dispar de 50µm.

En resum, els estudis realitzats:

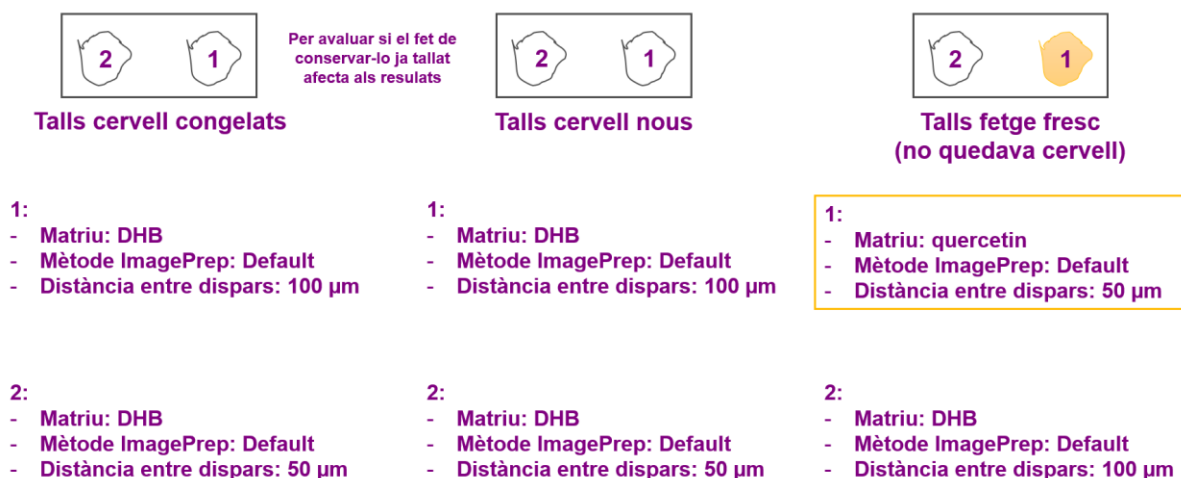


Figura 16. Taula resum de les proves realitzades.

Amb aquestes proves es va poder demostrar que no s'observen diferències significatives entre el cervell congelat i fresc.

Amb la realització de les proves esmentades es pot concloure que utilitzant DHB com a matriu, s'obté una millor solubilització i cristal·lització en totes les condicions de medi. I pel que fa a la ionització, s'obtenen millors resultats en el cas del medi àcid i amb polaritat positiva.

En les proves realitzades amb Quercetina com a matriu s'observava la precipitació en medi àcid. En canvi, en medi bàsic si que obteníem una solubilització efectiva. Pel que fa a la ionització, amb aquesta matriu s'obtenen resultats similars que amb el DHB i concretament s'observen millors resultats per àcids biliars però pitjors en fosfolípids, si comparem amb la matriu de DHB.

En un principi es volien fer proves amb altres matrius com són l'àcid sinapínic (SA), l'àcid α -ciano-4-hidroxicinamic (CHCA) o la 9-aminoacridina (9-AA), aquestes proves no han sigut possibles ja que a tres setmanes d'acabar l'estudi es va espatllar l'instrument; és per això, que únicament s'han estudiat les matrius: DHB i Quercetina.

5. APLICACIÓ AL CAMP FORENSE

La tècnica MALDI ha estat utilitzada en diversos estudis i recerques en l'àmbit forense. Ha estat de gran ajuda en molts estudis que a continuació es detallen.

En un estudi, es va investigar el genotipat de 66 marcadors genètics bial·lèlics en el cromosoma Y en 205 homes no relacionats de la població oriental xinès per espectrometria de masses de temps de vol de desorció/ionització assistida per matriu combinada de PCR combinada (MALDI-TOF-MS). Les freqüències d'al·lel en els loci a provar es van calcular mitjançant mètode de comptatge directe, i la diversitat de gens (GD) i la diversitat de haplotips (HD) es van calcular mitjançant fórmules corresponents. Els haplotips d'aquest sistema van ser provats pel programari Arlequin v3.5.2.2 i es va analitzar la comparació de la genètica poblacional. D'aquest estudi es va provar que la tecnologia MALDI-TOF-MS és capaç d'escriure marcadors genètics bial·lèlics.²

Un altre estudi en el que ha estat de gran utilitat el MALDI és en la valoració de l'interval postmortem (PMI). Aquesta és una tasca complicada en la medicina forense, especialment durant l'homicidi i les investigacions de la mort sense descans.

Molts indicadors biològics, químics i físics es poden utilitzar per determinar l'interval de postmortem, però la majoria no són exactes. En l'estudi esmentat es presenta una nova matriu de desorció per làser en espectrometria de masses de temps de vol (MALDI-TOF MS) mètode que es pot utilitzar per a l'estimació de PMI utilitzant imatges moleculars i anàlisis multivariants. En aquest estudi, es demostra que tant els teixits hepàtics de rata i humans de diferents PMI (0, 2, 4 i 6 dies) es poden discriminar utilitzant MALDI imaging i anàlisi per components principals (PCA). Mitjançant l'algoritme genètic (GA), la xarxa neuronal supervisada (SNN) i els mètodes de classificació ràpida (QC), s'han construït 6 models de classificació, que presentaven una alta capacitat de reconeixement i bona validació. Els canvis histològics en totes les

² Song, Y., Li, L., Zhang, L., Zhu, R., Liu, Y. i Lin, Y. (2017). Sixty-six Biallelic Genetic Markers on Y chromosome by MALDI-TOF-MS *Fa Yi Xue Za Zhi* (8), 58-69.

mostres en diferents punts de temps també van ser coherents amb els canvis observats en la imatge de MALDI.

El treball esmentat suggereix que MALDI-TOF MS, juntament amb l'anàlisi multivariant, es pot utilitzar per determinar PMIs intermedis³.

Altres avenços en aquest camp amb aquesta tècnica ha estat l'anàlisi del cabell segmental. Aquest ofereix un període més llarg per a la detecció retrospectiva de fàrmacs que la sang o l'orina.

El pèl és una fibra queratina i és fortament hidròfob. La incorporació de fàrmacs en cabells hidrofòbics a baixes concentracions dificulta l'extracció i la detecció amb desorció/ionització làser assistida per matrius (MALDI), juntament amb imatges d'espectrometria de masses (IMS). En aquest estudi que s'esmenta, es va tallar longitudinalment un pèl del cuir cabellut amb una secció criostàtica fins a una longitud de 4 mm i es va fixar en una placa MALDI d'acer inoxidable. La matriu umbelliferone es va utilitzar com una nova matriu hidrofòbica per enriquir i ajudar a l'eficiència de ionització de la metamfetamina a la mostra de cabell.

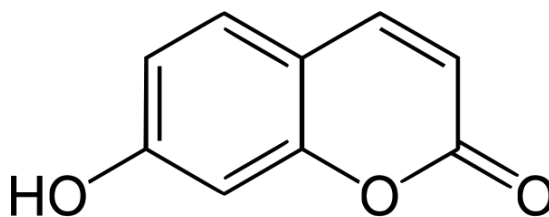


Figura 17. Estructura química de la matriu umbelliferone.

Usant MALDI-IMS, la distribució de metamfetamina es va observar a través de cinc mostres de cabell seccionades longitudinalment d'un abús de drogues.

Els canvis de metamfetamina també es van semi-quantificar comparant les ràtios de metamfetamina / estàndard intern.

³ Chengzhi, L., Zhengdong L., Ya Tuo, Dong, M., Yan Shi, Quinghua Z., Xianyi, Z., Kaifei, D., Yijiu C., Zhenyuan W. i Huang, P., (2017). MALDI-TOF MS as a Novel Tool for the Estimation of Postmortem Interval in Liver Tissue Samples. *Natura, (Scientific Reports)*, 1-11.

Aquest mètode millora la sensibilitat de detecció dels fàrmacs objectiu incrustats en una matriu de cabell per a la imatge amb espectrometria de masses.

El mètode podria proporcionar un nivell de detecció de metamfetamina fins a un nanogram per mil·límetre incorporat al cabell. Els resultats també es van comparar amb el cromatògraf líquid d'alt rendiment convencional, l'espectrometria de masses modernes (HPLC-MS / MS).

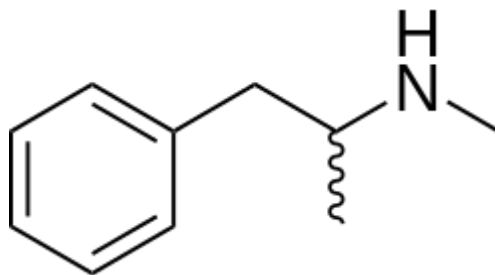


Figura 18. Estructura química de la metamfetamina.

Els canvis en els resultats de la imatge al llarg del temps mitjançant el mètode Imaging van mostrar una bona correlació semiquantitativa als resultats del mètode HPLC-MS/MS.

Aquest estudi proporciona una potent eina per al control del abús de drogues i l'anàlisi de la medicina forense en un marc de temps estreta i una reducció de la quantitat necessària.⁴

Pel que fa al món de les empremtes dactilars, també han estat diversos estudis els que s'han resolt amb l'ajuda d'aquesta tècnica.

Les marques posteriors es deriven d'una transferència de material des de la punta dels dits a una superfície després del contacte. Tradicionalment, les marques finals s'utilitzen per a la identificació biomètrica de les persones en funció de la concordança del patró de les crestes. No obstant això, en els darrers anys, s'ha experimentat un fort increment en l'ús de tècniques analítiques avançades per obtenir informació addicional,

⁴ Wang, H., Wang, Y., (2017). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging for the rapid segmental analysis of methamphetamine in a single hair using umbelliferone as a matrix. *Elsevier*, (3), 78-83

concretament la composició química del residu. La comprensió de la complexitat del contingut endogen i exògens de les marques posteriors podria ser extremadament útil per permetre un desenvolupament ulterior de les tècniques de millora utilitzades actualment en els escenaris forenses mitjançant la identificació de possibles molècules diana. Aquesta informació química també podria proporcionar una valuosa informació sobre l'estil de vida d'un individu, incloent-hi les seves activitats abans de dipositar una marca. Una eina d'anàlisi que ha guanyat popularitat en aquesta nova àrea de recerca és la tècnica esmentada, MALDI-IMS.

Aquesta tècnica pot ser utilitzada per a l'elaboració de perfils químics ràpids o la imatge de les marques vermelles per detectar les espècies químiques contingudes en el residu, i aquest últim també permet la reconstrucció física de les crestes de l'aleta fixa.⁵

⁵ Bradshaw, R. (2017) MALDI Mass Spectrometry Profiling and Imaging Applied to the Analysis of Latent Fingermarks. SAGE Journals (24), 176-183

6. CONCLUSIONS

MALDI-IMS implica la visualització de la distribució espacial de proteïnes, pèptids, lípids i altres molècules petites dins de làmines fines de teixits, com ara animals o plantes. L'aplicació d'aquesta tècnica als estudis biològics ha augmentat significativament des de la seva introducció. MALDI-IMS proporciona importants contribucions per a la comprensió de les malalties, la millora del diagnòstic i el subministrament de fàrmacs. Els estudis significatius són de l'ull, la investigació sobre el càncer, la distribució de fàrmacs i la neurociència, entre d'altres. MALDI-IMS ha estat capaç de diferenciar entre els fàrmacs i els metabòlits i proporcionar informació histològica en investigacions sobre el càncer, la qual cosa la converteix en una eina amb futur per a la recerca de nous biomarcadors de proteïnes.

L'espectrometria de masses d'imatges MALDI ha entrat en el camp de la investigació basada en teixits aportant avantatges únics per analitzar-los en detall. Un ampli espectre d'analits que van des de proteïnes, pèptids, modificació de proteïnes sobre molècules petites, fàrmacs i els seus metabòlits, així com components farmacèutics, metabòlits cel·lulars endògens, lípids i altres analits, són accessibles per aquesta tècnica *in situ* en el teixit.

D'aquesta manera, el gran avantatge de MALDI Imaging és la correlació d'informació molecular mantenint la informació de localització espacial dels analits després de la mesura espectromètrica de masses. Aquest mètode permet l'anàlisi múltiple de centenars de milers de molècules en la mateixa secció de teixits simultàniament.

En aquest estudi, s'ha pogut comprovar la visualització de diferents estàndards lipídics en dues de les matrius que es proposaven estudiar. Tant amb DHB (medi àcid), com en Quercetina (medi bàsic) es pot utilitzar la tècnica utilitzada.

La recerca de diferents estudis en l'àmbit forense en els que s'ha necessitat d'aquesta tècnica, han mostrat i comprovat que és una tècnica útil per tal de visualitzar la distribució de compostos i posteriorment poder aprofundir i utilitzar diferents tècniques.

7. BIBLIOGRAFIA

- (1). Hoffmann, E. i Stroobant, V. (2007) *Mass Spectrometry, Principles and Applications* (3a ed.) England: Wiley Editorial.
- (2) Song, Y., Li, L., Zhang, L., Zhu, R., Liu, Y. i Lin. Y. (2017). Sixty-six Biallelic Genetic Markers on Y chromosome by MALDI-TOF-MS, *Fa Yi Xue Za Zhi* (8), 58-69.
- (3). Chengzhi, L., Zhengdong L., Ya Tuo, Dong, M., Yan Shi, Quinghua Z., Xianyi, Z., Kaifei, D., Yijiu C., Zhenyuan W. i Huang, P., (2017). MALDI-TOF MS as a Novel Tool for the Estimation of Postmortem Interval in Liver Tissue Samples. *Natura, (Scientific Reports)*, 1-11.
- (4). Wang, H., Wang, Y., (2017). Matrix-assisted làser desorption/ionization mass spectrometric imaging for the rapid segmental analysis of methamphetamine in a single hair using umbelliferone as a matrix. *Elsevier*, (3), 78-83.
- (5). Bradshaw, R. (2017) MALDI Mass Spectrometry Profiling and Imaging Applied to the Analysis of Latent Fingermarks, *SAGE Journals* (24), 176-183.
- (6). Shrivastava, K., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Sugiura, Y., Zaima, N., i Setou, M. (2010). Ionic Matrix for Enhanced MALDI Imaging Mass Spectrometry for Identification of Phospholipids in Mouse Liver and Cerebellum Tissue Sections. *Analytical Chemistry*, 82, 8800-8806.
- (7). Schwamborn, K., Kriegsmann, M., i Weichert, W. (2017). Review: MALDI Imaging mass spectrometry – From bench to bedside. *Elsevier, Biochimica et Biophysica Acta* (1865), 776-783.
- (8). Jordina-Lluch, E., Matró, E. i Ausinam, V. (2012). Revisión: La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Elsevier* 30 (10), 635-644.
- (9). Chengzhi, L., Zhengdong L., Ya Tuo, Dong, M., Yan Shi, Quinghua Z., Xianyi, Z., Kaifei, D., Yijiu C., Zhenyuan W. i Huang, P., (2017). MALDI-TOF MS as a Novel Tool for the Estimation of Postmortem Interval in Liver Tissue Samples. *Natura, (Scientific Reports)*, 1-11.

- (10). Wu, Q., Comi, T. J., Li, B., Rubakhin, S. S., i Sweedler, J. V. (2016). On-Tissue Derivatization via Electrospray Deposition for Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging of Endogenous Fatty Acids in Rat Brain Tissues. *Analytical Chemistry*, 88, 5988-5995.
- (11). Moreno-Gordaliza, E., Esteban-Fernández, D., Lázaro, A., Humanes, B., Aboulmagd, S., Tejedor, A., Linscheid, M. W., i Gómez-Gómez, M. M. (2017). MALDI-LTQ_Orbitrap mass spectrometry imaging for lipidomic analysis in kidney under cisplatin chemotherapy. *Elsevier, Talanta* (164), 16-26.
- (12). Gemperline, E., Rawson, S., i Li, L. (2014). Optimization and Comparison of Multiple MALDI Matrix Application Methods for Small Molecule Mass Spectrometric Imaging. *Analytical Chemistry*, 86, 10030-10035.
- (13). Zemski, K.A., Murphy, R., Kosmider, B., i Mason, R. (2017). Lipidomic characterization and localization of phospholipids in the human lung. *Journal of Lipid Research*, 58, 926-933.