

*Esta Tesis no hubiera sido posible sin la paciencia y el apoyo de mis amigos y compañeros del grupo de espectroscopía y espectrometría de masas, así como de las ideas surgidas alrededor de una cerveza todos los viernes en la cafetería de la universidad.*



## **ÍNDICE**



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	3
• 1.1. INTRODUCCIÓN .....	3
• 1.2. OBJETIVOS .....	9
○ 1.2.1. Descripción de las muestras .....	12
○ 1.2.2. Resumen de los métodos .....	12
○ 1.2.3. Resumen de las herramientas .....	13
2. FUNDAMENTOS .....	19
• 2.1. Espectrometría de masas .....	19
○ 2.1.1. Analizador de iones .....	19
▪ 2.1.1.1. Tubo de vuelo (TOF) .....	20
▪ 2.1.1.2. Cuadrupolo .....	21
▪ 2.1.1.3. Trampa iónica (IT) .....	22
• 2.1.1.3.1 Trampa lineal .....	22
• 2.1.1.3.2. Espectrometría de masas por transformada de Fourier (FTMS) .....	23
○ 2.1.2. Fuente de iones .....	24
▪ 2.1.2.1. Ionización por electroespray (ESI) .....	25
• 2.1.2.1.1. Desorción/ionización por electroespray (DESI) .....	25
▪ 2.1.2.2. Ionización por desorción láser (LDI) .....	25
• 2.1.2.2.1. MALDI .....	26
○ 2.1.2.2.1.1. MALDI-IMS .....	26
○ 2.1.3. Fragmentación .....	27
• 2.2. Cromatografía líquida .....	28
○ 2.2.1. Cromatografía líquida en capa fina o <i>Thin layer Chromatography</i> (TLC) .....	29
○ 2.2.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) .....	30
• 2.3. Lipidómica .....	30
○ 2.3.1. Acilos Grasos .....	32
○ 2.3.2. Glicerolípidos .....	32
○ 2.3.3. Glicerofosfolípidos .....	33
○ 2.3.4. Esfingolípidos .....	35
○ 2.3.5. Lípidos Esteroides .....	38
○ 2.3.6. Prenoles .....	38
○ 2.3.7. Sacarolípidos .....	38
○ 2.3.8. Poliquétidos .....	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
• 3.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MALDI-MS .....	45
○ 3.1.1. Muestras para MALDI-MS .....	45
○ 3.1.2. Muestras para MALDI-IMS .....	46
▪ 3.1.2.1. Inmersión .....	47
▪ 3.1.2.2. Aplicación por nebulización .....	47
▪ 3.1.2.3. Sublimación .....	47
• 3.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA HPLC .....	49
• 3.3. MALDI .....	50
○ 3.3.1. Experimentos con el Tubo de vuelo .....	50
▪ 3.3.1.1. Extractos lipídicos en disolución .....	50
▪ 3.3.1.2. Secciones de tejido .....	50
▪ 3.3.1.3. Placas de TLC .....	51
▪ 3.3.1.4. Obleas de silicio nanoestructuradas .....	51
○ 3.3.2. Experimentos con la trampa iónica .....	52
▪ 3.3.2.1. Extractos lipídicos en disolución .....	52

## INDICE

▪ 3.3.2.2. Microarrays de homogeneizado de membrana .....	53
▪ 3.3.2.3. Secciones de tejido .....	53
• 3.4. UHPLC .....	54
<b>4. HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS PARA LIPIDÓMICA .....</b>	<b>59</b>
• 4.1. CAPTACIÓN DE ESPECTROS .....	59
○ 4.1.1. Bruker .....	59
○ 4.1.2. Biomap .....	61
○ 4.1.3. Thermo .....	62
○ 4.1.4. Archivos de salida .....	64
• 4.2. PRE-PROCESADO DE DATOS .....	64
○ 4.2.1. Alineado .....	64
○ 4.2.2. Recalibrado .....	66
○ 4.2.3. Normalización de espectros .....	67
▪ 4.2.3.1. p-norm .....	68
▪ 4.2.3.2. Median .....	69
▪ 4.2.3.3. Noise level .....	70
▪ 4.2.3.4. Labeled-Normalization .....	70
○ 4.2.4. Corrección de la línea base .....	70
• 4.3. VISUALIZACIÓN .....	71
• 4.4. ANÁLISIS .....	72
○ 4.4.1. Análisis por componentes principales (PCA) .....	72
▪ 4.4.1.1. Clusterización .....	74
▪ 4.4.1.2. Comparación de espectros .....	76
○ 4.4.2. Análisis por cadenas de Markov (Rankcompete) .....	77
▪ 4.4.2.1. Clusterización .....	80
▪ 4.4.2.2. Clasificación .....	80
• 4.5. POST-PROCESADO DE DATOS .....	80
○ 4.5.1. Organización y procesado de espectros .....	81
▪ 4.5.1.1. Clasificación entre tipos de muestra .....	82
▪ 4.5.1.2. Identificación de una muestra desconocida .....	84
• 4.5.1.2.1. Uso de microarrays de homogeneizado de membrana para la identificación de tejidos .....	85
○ 4.5.2. Análisis .....	85
○ 4.5.3. Bases de datos de lípidos e identificación .....	86
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>89</b>
• 5.1. TLC IMAGING – RANKCOMPETE .....	93
○ 5.1.1. Objetivo .....	93
○ 5.1.2. Métodos experimentales .....	93
○ 5.1.3. Análisis de los resultados .....	94
▪ 5.1.3.1. Análisis por componentes principales .....	95
▪ 5.1.3.2. Análisis por RankCompete .....	96
○ 5.1.4. Conclusiones .....	99
• 5.2. DETECCIÓN DE FÁRMACOS INCUBADOS EN MICROARRAYS DE HOMOGENIZADO DE MEMBRANA .....	103
○ 5.2.1. Objetivo .....	103
○ 5.2.2. Métodos experimentales .....	103
○ 5.2.3. Resultados .....	104
○ 5.2.4. Conclusiones .....	107
• 5.3. MICROARRAY DE MÚLTIPLES TEJIDOS .....	111
○ 5.3.1. Objetivo .....	111
○ 5.3.2. Procedimiento .....	111
○ 5.3.3. Verificación del método .....	112
○ 5.3.4. Identificación de los tejidos en el array .....	115

○ 5.3.5. Conclusiones .....	121
• 5.4. XENOGRAFOS .....	125
○ 5.4.1. Preparación y análisis de muestras .....	125
○ 5.4.2. Caracterización del xenografo NCI-1975 .....	128
▪ 5.4.2.1. Resultados .....	128
▪ 5.4.2.2. Conclusiones .....	138
○ 5.4.3. Estudio de éteres de PCs y PEs en diferentes xenografos .....	140
▪ 5.4.3.1. Resultados .....	141
▪ 5.4.3.2. Análisis .....	144
• 5.4.3.2.1. Estudio de la relación entre los aductos de PC en xenografos .....	144
• 5.4.3.2.2. Relación entre PCs y éteres de PC .....	146
• 5.4.3.2.3. Relación entre PEs y éteres de PE .....	148
• 5.4.3.2.4. Relación entre PEs y éteres de PE en LC-MS .....	149
▪ 5.4.3.3. Discusión .....	150
○ 5.4.4. Estudio de la influencia del tratamiento con 2OHOA en el lipidoma de xenografos de A-549 .....	153
▪ 5.4.4.1. Comparación de los espectros promedio .....	153
▪ 5.4.4.2. Estudio por regiones de interés .....	157
• 5.4.4.2.1. Normalización frente al pico 760.5851 .....	163
• 5.4.4.2.2. Normalización frente al TIC .....	169
▪ 5.4.4.3. Estudio de los aductos .....	177
▪ 5.4.4.4. Eliminación de la influencia de los aductos .....	181
• 5.4.4.4.1. Comparación de los espectros promedio, solo PCs .....	181
• 5.4.4.4.2. Estudio por regiones de interés, solo PCs .....	184
○ 5.4.4.4.2.1. Experimentos normalizados frente al pico 760.5851 .....	184
○ 5.4.4.4.2.2. Experimentos normalizados frente al TIC .....	189
• 5.4.4.4.3. Análisis del tejido viable normalizado frente al TIC, empleando más especies que las PCs .....	194
▪ 5.4.4.5. Discusión .....	198
▪ 5.4.4.6. Conclusiones .....	199
• 5.5. NERVI0 PERIFÉRICO .....	205
○ 5.5.1. Preparación y análisis de muestras .....	205
○ 5.5.2. Resultados .....	207
○ 5.5.3. Discusión .....	214
○ 5.5.4. Conclusiones .....	215
• 5.6. ESTUDIO DE MODELOS DE LESIÓN EN MEDULA DE RATA .....	219
○ 5.6.1. Preparación y análisis de muestras .....	219
○ 5.6.2. Caracterización del lipidoma en médulas sanas .....	220
○ 5.6.3. Caracterización del lipidoma en médulas lesionadas por contusión o por desmielinización parcial o general en modo de ionización positivo. ....	225
○ 5.6.4. Estudio de las médulas tratadas en modo de ionización positivo .....	235
○ 5.6.5. Caracterización del lipidoma en médulas lesionadas por desmielinización parcial o general en modo de ionización negativo .....	247
○ 5.6.6. Conclusiones .....	250
6. CONCLUSIONES .....	257
GLOSARIO.....	I
APÉNDICES.....	A



## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



### 1.1. INTRODUCCIÓN

En 1886, Eugen Goldstein, haciendo pasar una corriente eléctrica a través de un gas a baja presión confinado en un tubo de vidrio equipado con un cátodo perforado, descubrió lo que denominaría los *Kanalstrahlen* o *rayos de canal*, en lugar de viajar del cátodo al ánodo como hacen las partículas negativamente cargadas en los tubos de descarga convencionales, viajaban en la dirección opuesta.<sup>1</sup> Goldstein concluyó que los *rayos de canal* estaban por tanto formados por partículas cargadas positivamente, que no se veían afectadas por los campos magnéticos débiles.<sup>2</sup> Sin embargo, en 1898, Wilhem Wien observó que los *Kanalstrahlen* sí se veían afectados por un campo magnético fuerte y encontró que además, la curva parabólica que describían dependía de las diferentes relaciones carga/masa ( $m/z$ ) de las partículas.<sup>3</sup> No obstante, estas curvas presentaban una gran variabilidad, y fue finalmente J. J. Thomson quien, atribuyendo esa dispersión a colisiones entre las partículas cargadas y partículas de gas residual, perfeccionó el sistema y operando a presiones mucho más bajas, obtuvo con precisión las parábolas del  $H^+$ ,  $H_2^+$ ,  $O^+$ ,  $O^{2+}$  y  $O_2^+$ . Posteriormente, introduciendo moléculas poliatómicas como el  $COCl_2$ , aisló las parábolas correspondientes a los iones  $C^+$ ,  $O^+$ ,  $Cl^+$ ,  $CO^+$ ,  $Cl_2^+$  y el  $COCl_2^+$ .<sup>2</sup>



Fig 1.1.1 Réplica del primer espectrómetro de masas de J.J. Thomson.

Además, Thomson constató que las placas fotográficas que empleaba para grabar las parábolas eran mucho más sensibles para los iones ligeros que para los iones más pesados, impidiendo la cuantificación relativa de los iones. Como solución, Thomson, sustituyó la placa fotográfica por una placa de metal con una hendidura parabólica; variando la fuerza del campo magnético, fue capaz de enfocar cada haz de iones en la hendidura y medir la corriente de los iones que la atravesaba, con una segunda placa metálica conectada a un electroscopio. De esta forma, fue capaz de representar gráficamente y por primera vez en la historia un espectro de masas en el que se mostraba la abundancia relativa de los iones frente a la masa.<sup>2,4</sup>

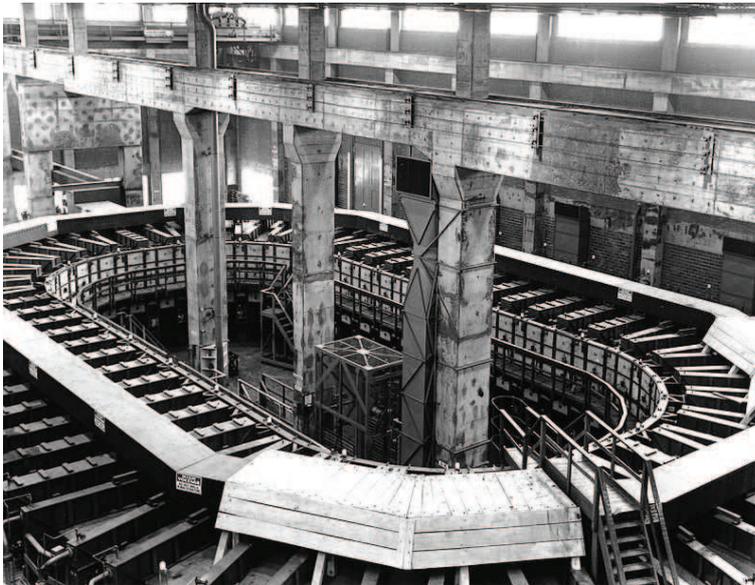
Cuando Thomson introdujo gas neón en su tubo de descarga, descubrió que obtenía dos líneas: una para una masa atómica 20 y otra para 22, lo cual no podía explicarse con la teoría contemporánea. Su nuevo asistente, Francis Aston, tras muchas pruebas y tras hacer algunas mejoras en el espectrómetro de Thomson,

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---

dedujo que estas líneas correspondían a isótopos de los elementos estables, es decir, elementos con las mismas propiedades que los elementos de la tabla periódica, pero con diferente masa atómica.<sup>5</sup> Hasta entonces se había considerado que todos los elementos eran monoisotópicos. Durante los siguientes 15 años, el estudio de los isótopos de los elementos estables fue la aplicación más extendida para la espectrometría de masas.

Durante los años 20, los físicos estuvieron especialmente interesados en el estudio de las estructuras moleculares, pero los espectrómetros de masas contemporáneos no estaban suficientemente perfeccionados, hasta que en 1929 Walker Bleakney modificó la fuente de iones, separando el campo eléctrico empleado en la ionización, del campo eléctrico empleado en la aceleración de los iones, obteniendo así una mejora significativa en las medidas de ionización y disociación de moléculas, lo que abrió la puerta al análisis estructural de moléculas complejas, como hidrocarburos y compuestos biológicos.<sup>2</sup>



*Fig 1.1.2 Calutron en la planta del proyecto Manhattan Y-12 en Oak Ridge, Tennessee, empleado para el enriquecimiento de uranio.*

En 1931, Francis Aston,<sup>6</sup> que había desarrollado un nuevo espectrómetro con mucha mejor resolución aumentando el radio de la curva del analizador de masa y la calidad del campo magnético, consiguió aislar el isótopo de uranio 238,  $^{238}\text{U}$ , y cuatro años después, Arthur Demster,<sup>7</sup> identificó un nuevo isótopo del uranio, el  $^{235}\text{U}$ . Años más tarde, en 1939, Alfred Nier<sup>8</sup> encontró el aun más extraño isótopo de  $^{234}\text{U}$  y determinó la relación de abundancia de los tres isótopos: 139:1 para  $^{238}\text{U}/^{235}\text{U}$  y 17000:1 para  $^{238}\text{U}/^{234}\text{U}$ . Un año después, Otto Hahn y Fritz Strassman, del Instituto de Química Kaiser Wilhelm de Berlín, hallaron evidencias

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---

de la fisión del uranio, que producía enormes cantidades de energía. Algunos físicos, liderados por el premio nobel Niels Bohr, postularon que el  $^{235}\text{U}$ , era mucho menos estable que el isótopo más pesado  $^{238}\text{U}$ , y que podía dividirse más fácilmente al bombardearlo con neutrones. En un tenso ambiente político internacional, preludio de la segunda guerra mundial, científicos estadounidenses y alemanes comenzaron a especular con que si el isótopo  $^{235}\text{U}$ , pudiese ser identificado y separado del uranio natural en la suficiente cantidad y con la suficiente pureza, sería posible crear un arma de destrucción masiva sin precedentes en la historia. En 1940, Alfred Nier, mediante su espectrómetro de masas consiguió aislar nanogramos de  $^{235}\text{U}$  puro, partiendo de  $\text{UBr}_4$ . Armado con este conocimiento, el gobierno de los Estados Unidos, activo el primer programa civil de energía atómica, directamente supervisado por el ejército. En 1943, el ciclotrón, modificado para funcionar como un espectrómetro masas de  $180^\circ$  tipo Dempster de Ernest Lawrence, al que se denominó "calutron" (*California University cyclotron*), fue el elegido para purificar uranio dentro del proyecto Manhattan.<sup>2</sup> En 1945, cientos de calutrones, funcionando simultáneamente, producían 198.8 gramos al día de  $^{235}\text{U}$  con un 80% de pureza, la suficiente para construir la primera bomba atómica.

Mientras los físicos estaban utilizando la espectrometría de masas para determinar las masas exactas de los elementos y sus isótopos, científicos de otros campos, como la química, la geología o la biología, vieron en la espectrometría de masas una potente herramienta para obtener información. Alfred Nier, empleando su espectrómetro de masas de  $180^\circ$ , estudió el proceso natural de decaimiento de Uranio a plomo. En teoría, midiendo el contenido en plomo, y conociendo la tasa de decaimiento del uranio a plomo, era posible calcular la edad de una muestra mineral. Sin embargo, el proceso no era tan sencillo, ya que el  $^{238}\text{U}$  y el  $^{235}\text{U}$  decaían a  $^{206}\text{Pb}$  y  $^{207}\text{Pb}$ , pero además, en el plomo natural, hay presentes otros dos isótopos, el  $^{204}\text{Pb}$  y el  $^{208}\text{Pb}$ . La precisión del espectrómetro de masas de Nier, permitió extraer de la composición isotópica del plomo el  $^{206}\text{Pb}$  y el  $^{207}\text{Pb}$ , lo que posibilitaba calcular la edad del mineral con mucha mayor precisión. Esta herramienta permitió a los geólogos estudiar una gran variedad de problemas geocronológicos e investigar la historia de los eventos acontecidos en la tierra y en nuestro sistema solar. Estudios de la relación entre el isótopo  $^{18}\text{O}$  y el  $^{16}\text{O}$  en el carbonato de calcio de conchas fosilizadas, que varía con la temperatura del agua de los océanos, permitió a los científicos calcular las temperaturas de la tierra en el tiempo en el que esos organismos estaban vivos, haciendo posible determinar con precisión la edad de las glaciaciones.<sup>9</sup> En esta era, la llamada espectrometría de masas de relación isotópica de alta precisión (IRMS) constituye una magnífica herramienta que proporciona información de una enorme variedad de procesos naturales. Empleando esta tecnología, a principios de los años 60, se descubrió que los isótopos del carbono eran empleados por las plantas en dos mecanismos diferentes.<sup>10</sup> Este descubrimiento aun se usa extendidamente para identificar fuentes de comida de animales y humanos en estudios arqueológicos.<sup>2</sup>

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---

A finales de los años 50, la división de Cincinnati de la Bendix Aviation Corporation introdujo el primer espectrómetro de masas de tubo de vuelo comercial (TOF-MS).<sup>11</sup> Este equipo era capaz de hacer identificaciones cualitativas a muy alta velocidad, en el orden de los milisegundos. Poco después, en los años 60 aparecieron los primeros espectrómetros de masas de cuadrupolo.

En 1977, el desarrollo de la espectrometría de masas de acelerador (AMS), permitió introducir la datación por  $^{14}\text{C}$ , que hasta entonces había sido imposible, ya que las cantidades de  $^{14}\text{C}$  en la naturaleza son muy pequeñas y la presencia de grandes cantidades de  $^{14}\text{N}$  en el aire interferían en la obtención de resultados precisos. La técnica empleaba un acelerador de alta energía que permitía acelerar los iones hasta energías de 60 millones de voltios, permitiendo emplear en la detección técnicas de recuento de iones, más sensibles. El problema con el  $^{14}\text{N}$ , se solucionó empleando iones negativos, ya que el  $^{14}\text{N}$  cargado negativamente no es estable y no llegaba a alcanzar el detector.<sup>12</sup> Tras esto, se desarrolló la metodología para explorar otras transiciones radioactivas, como  $^{10}\text{Be}$ ,  $^{26}\text{Al}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{41}\text{Ca}$  y  $^{129}\text{I}$ , proporcionando las herramientas para la datación de objetos de múltiples orígenes.

Tras la segunda guerra mundial, los espectroscopistas pusieron el foco en encontrar una fuente de iones capaz de ionizar de forma efectiva materiales inorgánicos, para ampliar el uso de la espectrometría de masa a un gran número de elementos presentes en metales, aleaciones y semiconductores, cuyo estudio se veía principalmente frenado por la dificultad para ionizar las muestras. El método de ionización más comúnmente utilizado era el *método de chispa*, introducido por Arthur Dempster en 1936, pero debido a las dificultades técnicas que entrañaba, y a que difícilmente se podía emplear con semiconductores y con materiales aislantes, dejó de utilizarse en los años 60. Al decaer el interés en la ionización por chispa, se buscaron métodos alternativos como la fuente de iones por descarga brillante, que también presentaba bastantes problemas. Finalmente, a mediados de los 60, algunos investigadores, demostraron que la mejor forma de ionizar estas muestras era en la expansión de la pluma de material ablacionado mediante un láser, en un plasma acoplado inductivamente (ICP) con un gas ionizado, que transfería su carga a las moléculas neutras. Se dio así origen a la espectrometría de masas de ionización por desorción láser (LDI). Una de sus ventajas se debía a la posibilidad de focalizar la ionización en un área muy pequeña de la muestra, obteniendo el espectro de únicamente los constituyentes de esa área. Moviendo el haz a lo largo de la muestra a posiciones controladas, era posible obtener información acerca de la distribución espacial de los componentes, dando lugar al nacimiento de lo que se conoce como imagen por espectrometría de masas (IMS). De forma parecida funciona la espectrometría de masas de haz de iones secundarios (SIMS), en la cual, un haz de iones de argón, oxígeno, cesio o galio, se dispara sobre la superficie, ablacionando el material y creando iones secundarios sobre su superficie. En

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---

algunos casos, otro haz de electrones se emplea para ionizar las moléculas neutras que pueda haber en la pluma de ablación creada por SIMS.<sup>2</sup>

Por otro lado, en los años 40, la industria del petróleo, que empleaba técnicas espectroscópicas para identificar la concentración de determinadas sustancias en las diferentes fracciones obtenidas de la destilación del petróleo, vio en la espectrometría de masas una herramienta eficaz para aumentar el grado de precisión de sus análisis, limitados a moléculas pequeñas con bandas de absorción donde el resto de componentes fueran transparentes. Mediante espectrómetros de masas equipados con una fuente de ionización electrónica (EI), empezaron a medir mezclas de hidrocarburos gaseosos de forma sencilla. Sin embargo, para hidrocarburos de más de 7 carbonos, la ionización electrónica fragmentaba las moléculas más grandes y la cantidad de isómeros se disparaba, por lo que fue necesario desarrollar métodos algebraicos estandarizados, mediante patrones de fragmentación, para calcular las proporciones de los distintos tipos de compuestos en cada fracción.

En el campo de la biología estructural, no fue hasta los años 80 cuando se empezó a considerar la espectrometría de masas como una herramienta significativamente útil. Los antiguos métodos de ionización, muy agresivos con las muestras, eran un obstáculo a la hora de medir muestras biológicas, en las que las moléculas tienden a ser sensibles al calor, frágiles y polares. Se intentaron métodos de derivatización, en los que se modificaban los analitos para hacerlos volátiles, pero los resultados no fueron satisfactorios, de forma que en 1980, aun era muy complicado medir moléculas con masas moleculares superiores a los 1000 Dalton (Da), a pesar de la frenética actividad en el campo. A finales de los 70 se había introducido la espectrometría de masas por desorción por plasma (PDMS), que permitía ionizar intactas moléculas polares, no volátiles, de miles de Da de masa molecular, directamente de una matriz sólida, abriendo la puerta al estudio de macromoléculas como las proteínas. En 1981 apareció la ionización por bombardeo de átomos rápidos (FAB),<sup>13</sup> que permitía el análisis de una gran cantidad de moléculas, como péptidos y pequeñas proteínas, en una matriz líquida, permitiendo el acoplamiento de sistemas de cromatografía líquida (LC-MS) y de inyección de flujo a la fuente de ionización de los espectrómetros de masas. Además, la fuente FAB podía acoplarse a cualquier espectrómetro contemporáneo. Sin embargo, la gran innovación que revolucionó el campo de la espectrometría de masas fue la ionización por electrospray (ESI),<sup>14</sup> que aunque había sido introducida en 1968, no se desarrolló hasta los años 80 y que le valió el premio Nobel a John Fenn en 2002. ESI permitía detectar proteínas en concentraciones de partes por millón, y que al igual que en FAB, podía acoplarse a cualquier espectrómetro, y medía directamente desde una matriz líquida, por lo que era compatible con LC-MS y otros sistemas de inyección de flujo. Además, a diferencia de la ionización FAB, ESI era capaz de producir iones con múltiples cargas, lo que permitía medir grandes moléculas en espectrómetros cuyo rango de masas fuera más limitado. Simultáneamente, apareció la ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI), de la

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

mano de varios investigadores: Taras y Hilenkamp por un lado y Koichi Tanaka (premio Nobel 2002) por otro. Esta técnica, permitía ionizar moléculas de hasta 300.000 Da, como proteínas u otras macromoléculas biológicas, sin fragmentarlas,<sup>15,16</sup> y no requería que los analitos estuvieran disueltos en una fase líquida, lo que hacía posible medir directamente de la muestra sólida, pudiendo obtenerse la distribución espacial de cada analito sobre la superficie de la muestra, y dándose otro paso así hacia el desarrollo de la actual IMS.<sup>17</sup>

Desde el comienzo del siglo XXI, tras el desarrollo de las llamadas técnicas de ionización suave o *soft ionization*, que abrieron la puerta al estudio de moléculas biológicas cada vez más complejas mediante la espectrometría de masas, la carrera por la evolución de los espectrómetros de masas dedicados a la biomedicina es imparable. Tanto en la etapa de ionización, con nuevas modificaciones de las fuentes de iones ESI y MALDI, como en la etapa de análisis, con espectrómetros cada vez más precisos, con analizadores por transformada de Fourier como el Orbitrap<sup>18</sup> (Thermo Scientific) o el FT-ICR<sup>19</sup> (Bruker), capaces de alcanzar resoluciones en masa de más de 2.000.000 FWHM (anchura a media altura). Cada año surgen nuevas soluciones para los problemas planteados, y cada solución trae consigo nuevos problemas que resolver. A medida que los equipos son mejores y más rápidos, la capacidad de producción de datos se multiplica, por lo que se requiere de programas de análisis estadístico cada vez más potentes y complejos. Algunas técnicas con resolución espacial como la desorción e ionización por electrospray (DESI) o el MALDI-IMS,<sup>17</sup> o los datos de movilidad iónica, precisan además de herramientas específicas que permitan convertir los espectros en imágenes y obtener información de esas imágenes. Todos estos avances recientes han hecho de la espectrometría de masas una técnica de análisis precisa, fiable y muy útil en campos tan diversos como la biomedicina, la medicina forense o la agricultura.<sup>20</sup> Al final del texto, en los apéndices, A-I se muestra una línea cronológica de los avances en la espectrometría de masas.

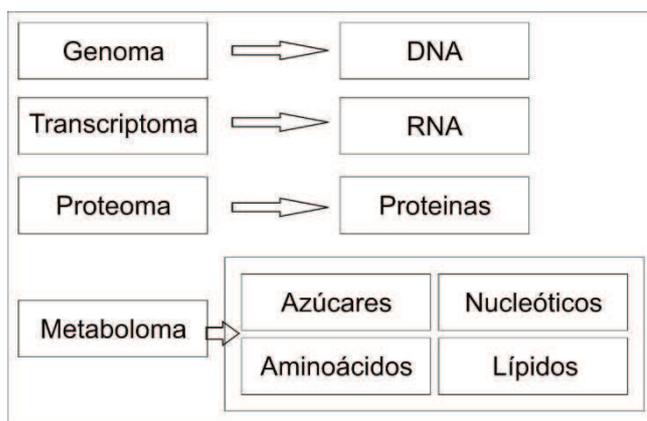


Fig 1.1.3 Esquema de las Ómicas.

Simultáneamente, y gracias en gran medida a los avances en la espectrometría de masas, a finales del siglo XX y comienzos del XXI, tiene lugar un cambio en la concepción del estudio de los sistemas biológicos, pasando a la creación de las denominadas “ómicas”, en las que se contempla la biología celular en su conjunto (Figura 1.1.3). Así, la genómica estudia la expresión de todos los genes en conjunto, y no sólo de uno aislado; la proteómica hace lo propio con las proteínas y la metabolómica con los metabolitos. Esta última abarca el estudio de azúcares, aminoácidos, nucleótidos y lípidos, y a diferencia de la genómica y la proteómica, que son menos sensibles a los cambios de estado, permite obtener información instantánea del estado fisiológico de un organismo.<sup>21-23</sup>

El lipidoma constituye un importante grupo dentro del metaboloma, debido a la cantidad e importancia de sus componentes. Los lípidos no sólo realizan funciones estructurales de las membranas celulares y de almacenamiento de energía, tal y como se consideraba tradicionalmente, sino que están involucrados en procesos tales como en la neurotransmisión, transducción de señal, tráfico vesicular, apoptosis y regulación transcripcional.<sup>23-40</sup> Todo esto convierte la lipidómica en un campo especialmente relevante. Si a la posibilidad de identificar inequívocamente los lípidos en los tejidos, empleando sistemas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray (HPLC-ESI-MS) con fragmentación, se añade la capacidad de la IMS para obtener su distribución directamente sobre los tejidos, es posible estudiar las modificaciones en el lipidoma en diferentes patologías, como lesiones o tumores, dotando a los investigadores y a los médicos de una potente herramienta, tanto en el diagnóstico, como en el seguimiento o el estudio de posibles marcadores.

### 1.2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es, por tanto, contribuir al progreso de la IMS aplicada a lípidos, mediante el desarrollo de métodos experimentales y nuevas herramientas computacionales, todo ello a través del estudio de muestras de diversa procedencia, cada una de las cuales ha supuesto un reto específico para el que se ha necesitado del desarrollo de nuevos algoritmos y protocolos de análisis, y en algunos casos incluso de la modificación de la metodología de preparación de muestra.

Una de las técnicas tradicionales para análisis de lípidos más extendida es la cromatografía líquida en capa fina (TLC), en la que la muestra a analizar es una placa cubierta de material poroso, sílica gel, sobre la que se separa el extracto de lípidos por clase, en función de su polaridad. Esta técnica es rápida, barata y de fácil aplicación, pero los resultados están limitados a la detección y cuantificación de clases de lípidos, sin aportar información sobre su composición acíclica. El desarrollo de un protocolo para el acoplamiento TLC-IMS permitiría recuperar esta información. Sin embargo, el diseño de dicho protocolo conlleva retos tanto metodológicos como de desarrollo de nuevo software. Por ejemplo,

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

es preciso diseñar un proceso de deposición de muestra que permita garantizar la creación de una superficie homogénea y que permita extraer los lípidos del soporte de sílica gel de la placa de TLC. Dado que el resultado buscado en este tipo de estudio es la identificación de las especies que hay en cada clase, es necesario desarrollar un software capaz de localizar cada fracción en la placa, obtener su espectro promedio y dar una asignación, con la mínima intervención de usuario. Este estudio se llevó a cabo en colaboración con los Dres. Ignacio Ruiz y M<sup>a</sup> Begoña Ruiz, del Dpto. de Fisiología (Facultad de Medicina y Odontología, UPV/EHU).

También se ha profundizado en el desarrollo de nuevas metodologías para el cribado masivo de fármacos, sentando las bases para sustituir el marcado con isótopos radiactivos por el análisis por espectrometría de masas, en colaboración con la empresa IMG Pharma Biotech. Esta empresa ha desarrollado unos *arrays* de homogeneizados de membranas, donde las proteínas de membrana están plenamente funcionales, permitiendo de esta manera la miniaturización de los ensayos llevados a cabo tradicionalmente en placas ELISA, con el consiguiente ahorro de reactivo. Nuestra contribución ha consistido en reformular completamente el protocolo de análisis, comenzando por la optimización de las condiciones para la detección de los fármacos por espectrometría de masas, lo que implica adecuar la forma de deposición de la matriz para maximizar la sensibilidad de la detección. Además, fue necesario adecuar el software para la captación de datos, ya que en un *array*, la muestra se encuentra confinada en una superficie predeterminada, siendo necesario realizar el promedio sobre dicha superficie para maximizar la intensidad de la señal y poder realizar cuantificaciones relativas.

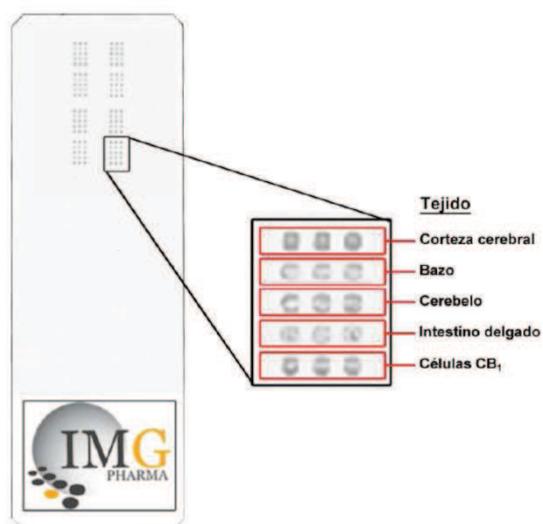


Fig 1.2.1 Ejemplo de Microarray de homogeneizado de membrana de IMG Pharma Biotech.

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---

El tipo de estudio más común en IMS consiste en la comparación entre la composición de un tejido control y un modelo de enfermedad, o entre tejido sano y enfermo dentro de una misma biopsia, o incluso entre muestras de modelos de enfermedad con y sin tratamiento. Para explorar los problemas metodológicos que plantean este tipo de muestras, se han estudiado en colaboración con el Hospital de Paraplégicos de Toledo, FIBAO e Histocell S.L. muestras provenientes de médula de rata control, y de modelos de lesión por desmielinización parcial, general y por contusión. Además se estudiaron muestras de nervio ciático sano y seccionado regenerante. En un segundo paso, el estudio consistió en encontrar las diferencias en el perfil lipídico entre las secciones de médula y de nervio provenientes de los modelos de lesión citados, con y sin tratamientos biológicos. La gran variedad de tipos de muestra implica que fue necesario medir casi 300 secciones de médula espinal y 27 secciones de nervio ciático, generándose una cantidad ingente de información, difícil de procesar y analizar. Para tal fin, se desarrollaron e implementaron nuevos algoritmos de análisis estadístico y de *clusterización*, que permitiesen la comparación de las distribuciones de lípidos no ya a lo largo de una única sección de tejido, sino entre un conjunto creciente de muestras, añadiendo una capa de complejidad a todo el análisis.

Quizá las muestras más complejas a las que nos hemos enfrentado sean las de xenógrafos, ya que a diferencia de las muestras de médula espinal o de nervio ciático, los xenógrafos no presentan una anatomía predefinida, cambiando enormemente su morfología de una muestra a la siguiente o incluso entre muestras seriadas. Además, los xenógrafos, como se demuestra en el capítulo 5.4, presentan al igual que los tumores clínicos, zonas viables en diversos estadios metabólicos entremezclados con zonas necrosadas. Se constató durante el estudio que existen cambios importantes en las relaciones  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  entre dichas zonas, lo que resulta en importantes variaciones en la abundancia relativa de aductos de las especies detectadas en modo de ionización positivo. Dichas diferencias, pueden llegar a enmascarar cualquier otra debido a la aplicación de un tratamiento y apunta a un problema fundamental en la metodología de análisis de datos por IMS. El estudio llevado a cabo consistió en la localización de marcadores fiables que permitiesen identificar las zonas necrosadas de los tejidos para eliminarlos de posteriores análisis estadísticos, para a continuación determinar los cambios en el lipidoma debidos a la administración de ácido 2-hidroxioléico, un candidato a fármaco antitumoral. Mediante varias fases de refinamiento de los datos, se logró un protocolo de análisis que dio resultados en consonancia con los obtenidos en cultivos celulares. Se espera que este estudio, que lidia con cuestiones fundamentales en IMS, sirva para el desarrollo de un protocolo de análisis universal para datos de imagen por espectrometría de masas.

En resumen, todas estas herramientas computacionales deben ser capaces de hacer un pre-procesado de los datos, que reduzca el volumen total de datos sin ocasionar una pérdida de información. Dentro de esta fase de pre-procesado, las

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---

herramientas deben permitir captar, alinear, normalizar los espectros o corregir la línea base de los espectros. Por otro lado, deben permitir al usuario localizar áreas de interés en experimentos de imagen, identificar de forma precisa las moléculas detectadas, creando y gestionando bases de datos de lípidos, y facilitar el manejo de grandes conjuntos de datos mediante métodos de análisis multivariable y otras herramientas estadísticas.

Como resultado de este trabajo y en colaboración con la empresa Noray Bioinformatics S.L. se ha desarrollado un programa con un conjunto de herramientas informáticas orientadas a la imagen por espectrometría de masas de lípidos, capaz de trabajar con los datos generados por los principales fabricantes de espectrómetros de masas como Bruker o Thermo, así como con el formato de datos estandarizado imzxml.<sup>41</sup>

### 1.2.1. Descripción de las muestras

Estas son las muestras que se estudian en este trabajo y el objetivo perseguido en su estudio.

- **Placas de TLC de extractos lipídicos.** Se pretende identificar los lípidos separados mediante TLC.
- **Microarrays de homogeneizado de membrana de múltiples tejidos.** Se pretende desarrollar un método que permita la clasificación de diferentes tejidos impresos en un único microarray. Permitiendo la identificación de muestras desconocidas por comparación.
- **Microarrays de homogeneizado de membrana incubados con fármacos.** Se persigue la optimización de la preparación de las muestras para obtener la suficiente sensibilidad como para detectar un fármaco incubado en concentraciones farmacológicamente relevantes.
- **Médulas de rata en diversos estados de lesión y de recuperación.** Se busca la identificación de marcadores lipídicos que permitan hacer un seguimiento de la fase en la que se encuentra la lesión.
- **Nervio ciático de rata, sano, seccionado y regenerante.** Identificación de marcadores que permitan seguir la evolución de la lesión, como en el caso de las médulas.
- **Xenografos de líneas celulares tumorales de diversos tipos de cáncer, tratados mediante un fármaco experimental y sin tratar.** Identificación de marcadores lipídicos tumorales, así como de la evolución de los tumores tras haber sido tratados.

### 1.2.2. Resumen de los métodos

Optimización de los métodos de preparación de muestra:

- Búsqueda de diferentes matrices y materiales susceptibles de ser empleados como medio para la ionización de lípidos y fármacos, mediante desorción láser.
- Optimización del proceso de deposición de la matriz sobre las muestras para MALDI-IMS.
  - Nebulización
  - Sublimación
  - Sublimación + recristalizado
- Desarrollo de una metodología que permita sustituir la autoradiografía por MALDI-IMS en la detección de fármacos incubados en microarrays de homogeneizado de membrana.
- Desarrollo de una metodología para combinar el MALDI-IMS con TLC.

### 1.2.3. Resumen de las herramientas

Desarrollo de procedimientos de análisis de datos y de herramientas informáticas que faciliten el estudio de la lipidómica mediante MALDI-IMS.

- Herramientas de captación de los espectros.
  - Captación
  - Recalibrado
  - Alineado
  - Corrección de línea base
  - Normalización
- Herramientas de visualización a partir de los datos de un experimento MALDI-IMS.
  - Distribución espacial de analitos
  - Extracción de espectros promedio de áreas concretas
- Herramientas de *clustering* para experimentos MALDI-IMS.
  - Análisis por componentes principales (PCA)
  - *RankCompete*
- Herramientas de análisis multivariable de los resultados.
  - Clasificación de tejidos
  - Identificación de diferencias
- Herramientas de asignación de los canales másicos de los espectros.
  - Bases de datos de lípidos
  - Asignación

---

<sup>1</sup> E. Goldstein, Berl, Ver., 39, 691 (1886).

<sup>2</sup> M.A. Grayson for the American Society for Mass Spectrometry, "Measuring Mass – From positive rays to proteins." Chemical Heritage Press, 2002.

<sup>3</sup> W. Wien, Wied. Ann., 65, 440 (1898).

<sup>4</sup> Tomson, Phil. Mag. 24, 209 (1912).

<sup>5</sup> F.W. Aston. "Isotopes". London: Edward Arnold, 1924.

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---

- <sup>6</sup> F.W. Aston. "Constitution of Thallium and Uranium." *Nature* 128 (1931), 725.
- <sup>7</sup> A.J. Dempster. "Isotopic constitution of Uranium." *Nature* 136 (1935), 180.
- <sup>8</sup> A.O. Nier. "The isotopic constitution of Uranium and the half-lives of the Uranium isotopes." *Physical Review* 55(1939), 150-153.
- <sup>9</sup> S.M. Savin "The history of the earth's surface temperatura during the past 100 million years". *Annual Review of Earth and Planetary Science* 5 (1977), 319-355.
- <sup>10</sup> R. Park; S. Epstein. "Carbon isotope fractionation during photosynthesis." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 21 (1960), 110-126.
- <sup>11</sup> R.S. Gohlke. "Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas Liquid Partition Chromatography" *Analytical Chemistry* 31 (1959), 535-541.
- <sup>12</sup> C.L. Bennett et al. "Radiocarbon dating using electrostatic acelerators: Negative ions provide de key." *Science* 198 (1977), 508-510.
- <sup>13</sup> M. Barber et al. "Fast Atom Bombardment of Solids (FAB): A New Ion Source for Mass Spectrometry." *Journal of the chemical Society, Chemical Communications* 7 (1981), 325-327.
- <sup>14</sup> J.B. Fenn et al. "Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Lague Biomolecules." *Science* 246 (1989), 64-71.
- <sup>15</sup> M. Karas; F. Hillenkamp. "Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceding 10.000 Daltons." *Analytical Chemistry* 60 (1988), 2299-2301.
- <sup>16</sup> K Tanaka, H Waki, Y Ido, S Akita, Y Yoshida, T Yoshida. "Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry". *Rapid Commun Mass Spectrom* (1988) 2 (20): 151-3.
- <sup>17</sup> Spengler B., Hubert M., Kaufmann R. "MALDI ion imaging and biological ion imaging with a new scanning UV-laser microprobe." *Proc. 42nd Annual Conf. Mass Spectrom. and Allied Topics* (Chicago, IL), (1994) p.1041.
- <sup>18</sup> Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M and Graham Cooks R. "The Orbitrap: a new mass spectrometer." *Journal of mass spectrometry* (2005) 40 (4): pp. 430-43.
- <sup>19</sup> Comisarow, M. B., Marshall, A. G. "Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy", *Chem. Phys. Lett.* (1974) 25, 282-283.
- <sup>20</sup> Anne Marie Jacobsen, Bent Halling-Sørensen, Flemming Ingerslev, Steen Honoré Hansen "Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* (2004) 1038, 1-2, 157-170.
- <sup>21</sup> Nicholson JK, Lindon JC. "Systems biology: Metabonomics". (2008). *Nature* 455 (7216): 1054-6.
- <sup>22</sup> Jordan, Kate W.; Nordenstam, Johan; Lauwers, Gregory Y.; Rothenberger, David A.; Alavi, Karim; Garwood, Michael; Cheng, Leo L. "Metabolomic Characterization of Human Rectal Adenocarcinoma with Intact Tissue Magnetic Resonance Spectroscopy". *Diseases of the Colon & Rectum* (2009) 52 (3): 520-525.
- <sup>23</sup> Gerrit van Meer. "Cellular lipidomics" *The EMBO Journal* (2005) 24, 3159-3165.
- <sup>24</sup> Veloso, A.; de San Roman, E. G.; Astigarraga, E.; Barreda-Gome, G.; Manuel, I.; Giralt, M. T.; Ochoa, B.; Fresnedo, O.; Fernandez, J. A.; Rodriguez-Puertas, R.

"Anatomical distribution of lipids in human brain by imaging mass spectrometry". *Chem. Phys. Lip.* (2010), 163, S3.

<sup>25</sup> Eberlin, L. S.; Ifa, D. R.; Wu, C.; Cooks, R. G. "Three-Dimensional Visualization of Mouse Brain by Lipid Analysis Using Ambient Ionization Mass Spectrometry." *Angew Chem. Int Ed.* (2010) 49 (5), 873-876.

<sup>26</sup> Meriaux, C.; Franck, J.; Wisztorski, M.; Salzet, M.; Fournier, I. "Liquid ionic matrixes for MALDI mass spectrometry imaging of lipids." *J. Proteomics* (2010) 73 (6), 1204-1218.

<sup>27</sup> Colsch, B.; Woods, A. S. "Localization and imaging of sialylated glycosphingolipids in brain tissue sections by MALDI mass spectrometry." *Glycobiology* (2010) 20 (6), 661-667.

<sup>28</sup> Goto-Inoue, N.; Hayasaka, T.; Zaima, N.; Kashiwagi, Y.; Yamamoto, M.; Nakamoto, M.; Setou, M. "The detection of glycosphingolipids in brain tissue sections by imaging mass spectrometry using gold nanoparticles." *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* (2010) 21 (11), 1940-1943.

<sup>29</sup> Deeley, J. M.; Hankin, J. A.; Friedrich, M. G.; Murphy, R. C.; Truscott, R. J. W.; Mitchell, T. W.; Blanksby, S. J. "Sphingolipid distribution changes with age in the human lens." *J. Lipid Res.* (2010) 51 (9), 2753-2760.

<sup>30</sup> Veloso, A.; Astigarraga, E.; Barreda-Gomez, G.; Manuel, I.; Ferrer, I.; Giralt, M. T.; Ochoa, B.; Fresnedo, O.; Rodriguez-Puertas, R.; Fernandez, J. A. "Anatomical distribution of lipids in human brain cortex by imaging mass spectrometry." *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* (2011) 22, 329.

<sup>31</sup> Blanksby, S. J.; Mitchell, T. W. "Advances in Mass Spectrometry for Lipidomics." *Annu. Rev. Anal. Chem.* (2010) 3, 433-465.

<sup>32</sup> Sugiura, Y.; Konishi, Y.; Zaima, N.; Kajihara, S.; Nakanishi, H.; Taguchi, R.; Setou, M. "Visualization of the cell-selective distribution of PUFA-containing phosphatidylcholines in mouse brain by imaging mass spectrometry." *J. Lipid Res.* (2009) 50 (9), 1776-1788.

<sup>33</sup> Murphy, R. C.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M. "Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry." *J. Lipid Res.* (2009) 50, S317-S322.

<sup>34</sup> Chan, K.; Lanthier, P.; Liu, X.; Sandhu, J. K.; Stanimirovic, D.; Li, J. J. "MALDI mass spectrometry imaging of gangliosides in mouse brain using ionic liquid matrix." *Anal. Chim. Acta.* (2009) 639 (1-2), 57-61.

<sup>35</sup> Chen, R. B.; Hui, L. M.; Sturm, R. M.; Li, L. J. "Three Dimensional Mapping of Neuropeptides and Lipids in Crustacean Brain by Mass Spectral Imaging." *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2009) 20 (6), 1068-1077.

<sup>36</sup> Wang, H. Y. J.; Post, S. N. J. J.; Woods, A. S. "A minimalist approach to MALDI imaging of glycerophospholipids and sphingolipids in rat brain sections." *Int. J. Mass Spectrom.* (2008) 278 (2-3), 143-149.

<sup>37</sup> Zheng, L.; Mcquaw, C. M.; Ewing, A. G.; Winograd, N. "Sphingomyelin/phosphatidylcholine and cholesterol interactions studied by imaging mass spectrometry." *J. Am. Chem. Soc.* (2007) 129 (51), 15730.

<sup>38</sup> Malmberg, P.; Nygren, H.; Richter, K.; Chen, Y.; Dangardt, F.; Friberg, P.; Magnusson, Y. "Imaging of lipids in human adipose tissue by cluster ion TOF-SIMS." *Microscopy Research and Technique.* (2007) 70 (9), 828-835.

## CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---

<sup>39</sup> Borner, K.; Malmberg, P.; Mansson, J. E.; Nygren, H. "Molecular imaging of lipids in cells and tissues." *Int. J. Mass Spectrom.* (2007) 260 (2-3), 128-136.

<sup>40</sup> M B. Khalil, W Hou, Hu Zhou, F Elisma, L A. Swayne, A P. Blanchard, Z Yao, S A L Bennett, and D Figeys, "Lipidomics era: accomplishments and challenges", Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). (2010). DOI 10.1002/mas.20294.

<sup>41</sup> Julio Font Perez, David Fernández González, Jose Andrés Fernández González, Roberto Antonio Fernández Regueira. "MSI Analyst." (Spain) (2014) N.Solicitud: BI-269-14, Software tools for image mass spectrometry recorded by NorayBio S.L.U.

**CAPÍTULO 2**  
**FUNDAMENTOS**



## 2. FUNDAMENTOS

### 2.1. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica que permite separar especies por su masa, o más bien por su relación masa/carga ( $m/z$ ). Normalmente, consisten en la ionización de las moléculas a medir, la aplicación de una diferencia de potencial para acelerarlas y su separación en un analizador de iones, de forma que a distinta relación ( $m/z$ ) las moléculas llegaran en diferentes tiempos al detector.<sup>1</sup>

Los espectrómetros de masas constan, fundamentalmente, de dos partes: la fuente de iones, donde mediante diversos procedimientos, se ioniza la muestra, y el analizador de iones, donde se obtiene la ( $m/z$ ) de los compuestos ya ionizados. Además, también debe contar con un sistema de entrada de las muestras, un detector de iones y un equipo registrador para poder obtener y visualizar los espectros. (Figura 2.1.1)

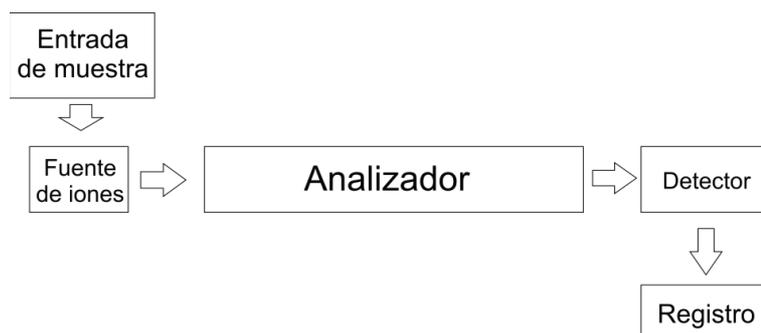


Fig 2.1.1. Esquema de un espectrómetro de masas.

#### 2.1.1. Analizador de iones

En lo que se refiere al análisis de iones, los sistemas más habituales son el tubo de vuelo (TOF), el cuadrupolo y la trampa iónica (IT), que incluye la espectrometría de masas por transformada de Fourier (FTMS), como en el Solarix de Bruker<sup>2</sup> o en el Orbitrap de Thermo.<sup>3</sup> Aunque estos son los elementos básicos, lo normal es que los equipos de última generación estén equipados con una combinación de elementos para aprovechar las ventajas de cada uno de ellos, o para aumentar las posibilidades de análisis. Así por ejemplo, en los equipos para cuantificación es común encontrar combinaciones de tres cuadrupolos, aunque la combinación de cuadrupolo + trampa iónica está progresivamente desplazando esta configuración. También es común encontrar tubos de vuelo equipados con filtros de cuadrupolo para limitar el rango de iones a fragmentar en experimentos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

## CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS

---

### 2.1.1.1. Tubo de vuelo (TOF)

En un sistema TOF<sup>4,5</sup> se aceleran los iones mediante un campo electrostático homogéneo y constante y se envían a través de una zona de vuelo libre de una longitud determinada. Los iones reciben una aceleración en función de su  $m/z$  y la intensidad del campo eléctrico aplicado, por lo que los iones más pesados se aceleran menos que los más ligeros, con lo que se establece una separación a lo largo de la zona de vuelo libre. El tiempo que los iones tardan en recorrer dicha zona, obedece la siguiente ley:

$$t = \left(\frac{2md}{eE}\right)^{\frac{1}{2}} + L\left(\frac{m}{2eV_0}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.1.1)$$

Donde  $m$  es la masa del ión,  $e$  la carga de un electrón,  $E$  el campo electrostático aplicado,  $d$  la longitud de la zona de aceleración,  $L$  la longitud del tubo de vuelo libre de campo y  $V_0$  el potencial de aceleración.

La anchura de los picos en el espectro viene definida por la resolución del analizador y depende de varios factores: la distribución inicial de energía cinética de los iones, el volumen inicial de iones y su geometría, la intensidad de los campos aplicados en la ionización/extracción, el vacío alcanzado en la zona de vuelo libre y la velocidad de digitalización del sistema de recogida de datos. Para mejorar la resolución perdida debido a estos factores se emplean las siguientes soluciones:

La pérdida de resolución debida a la distribución temporal durante la ionización, depende del desfase temporal:

$$\Delta m/m = 2\Delta t/t \quad (2.1.2)$$

Y dado que el desfase temporal  $\Delta t$  es una constante, aumentando el tiempo de vuelo  $t$ , ya sea reduciendo el campo electrostático como aumentando la longitud de la zona de separación libre de campo, se puede mejorar la pérdida de resolución.

La pérdida debida a la distribución de las posiciones iniciales de los iones, se debe al distinto tiempo de aceleración que experimentan los iones en función de su posición con relación a la dirección del campo, en el momento de su aplicación. Este factor se puede corregir hasta cierto punto, mejorando la fase de ionización de la muestra y empleando un reflectrón para corregir la distribución de energías cinéticas iniciales.

Debido al proceso de desorción/ionización, los iones también presentan una distribución de energías cinéticas iniciales, e incluso iones iguales y con la misma energía cinética inicial, podrían presentar diferentes tiempos de llegada en función de la dirección inicial de su movimiento. Esta pérdida de resolución

también se puede minimizar aumentando la longitud de la zona de separación libre de campo electrostático o empleando un reflectrón.

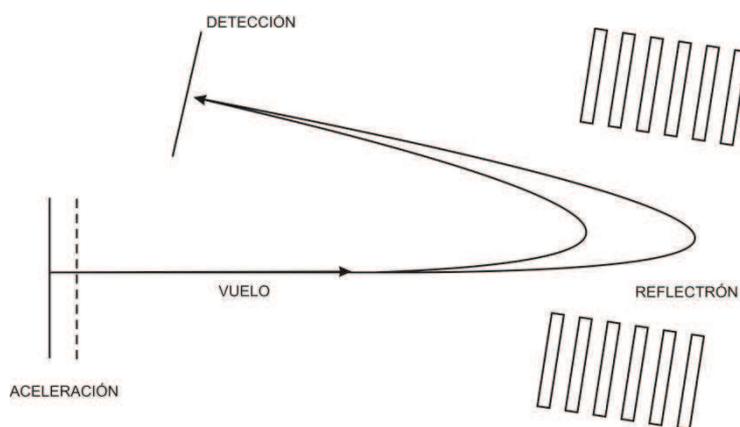


Fig 2.1.2. Esquema de un reflectrón.

El reflectrón<sup>6</sup> es una evolución del analizador tipo TOF, que incorpora un segundo campo y una zona de vuelo libre adicional (Figura 2.1.2). Los iones con mayor energía cinética penetran más en el campo del reflectrón, saliendo reflejados al mismo tiempo que otros iones con la misma masa y menor energía cinética. Ajustando los voltajes del reflectrón, se compensa la distribución inicial de energías cinéticas, mientras que la distribución inicial de posiciones de los iones se corrige aumentando el campo de extracción. El resultado final es un aumento de la resolución

#### 2.1.1.2. Cuadrupolo

Un cuadrupolo es un conjunto de cuatro barras cilíndricas de metal que actúan a modo de electrodos; las barras opuestas están conectadas eléctricamente, un par al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par a la terminal negativa (Figura 2.1.3). Sobre cada par de barras se aplican potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia, desfasados 180 grados. Para que un ion pueda atravesar el cuadrupolo y llegar al detector, debe tener una trayectoria estable en los dos planos formados por cada par de electrodos opuesto; es decir, el ión debe de ser suficientemente pesado para no ser eliminado por el filtro de paso de masa elevada en uno de los planos y lo suficientemente ligero para no ser eliminado por el filtro de masa baja en el otro plano.

Controlando el voltaje y la radiofrecuencia, es posible controlar la trayectoria de los iones, de forma que sólo permita pasar los iones con una  $m/z$  dada hasta el detector, mientras que el resto de iones con distinta  $m/z$ , describirán trayectorias

## CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS

inestables y no alcanzarán el detector. Es decir, un cuadrupolo actúa como un filtro de masas.

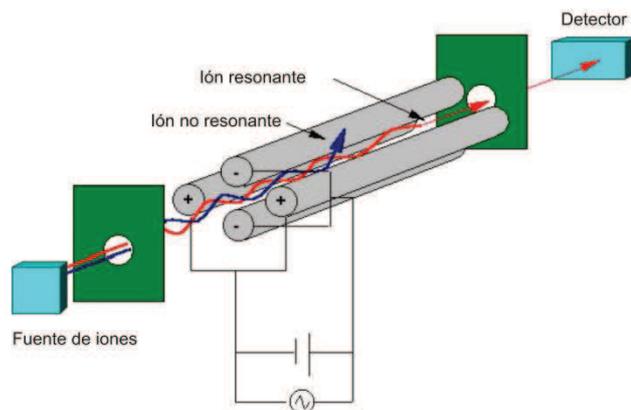


Fig 2.1.3. Esquema de un cuadrupolo.

### 2.1.1.3. Trampa iónica (IT)

Existe una amplia variedad de trampas iónicas, pero en una primera aproximación, se pueden dividir en dos tipos: las trampas lineales y los analizadores de masas por transformada de Fourier.

#### 2.1.1.3.1 Trampa lineal

La trampa iónica (Figura 2.1.4.) es un dispositivo relacionado con el filtro de iones de cuadrupolo, ya que también emplean un campo eléctrico para separar los iones por su  $m/z$ . Consiste normalmente en tres electrodos de superficie hiperbólica. Uno de ellos, el central, es anular, mientras que los otros dos cierran la cavidad en forma de anillo. Sobre los electrodos superior e inferior, se aplica un potencial de radiofrecuencia constante, mientras que sobre el electrodo anular, se aplica un potencial de radiofrecuencia variable, dando lugar a un campo magnético cuadrupolar tridimensional en el que quedan confinados los iones. Alterando la señal de radiofrecuencia del electrodo anular, se desestabiliza la trayectoria de un ión concreto, que es eyectado fuera de la trampa. De esta forma, cambiando gradualmente la amplitud del campo de radiofrecuencia, se vacía la trampa de iones en orden de  $m/z$  creciente, obteniéndose un espectro de masas.<sup>7</sup>

La trampa iónica permite de este modo confinar iones durante largos periodos de tiempo y, por ejemplo, aislar iones concretos, hacerlos colisionar con un gas inerte como He o Ar y medir su espectro de fragmentación, lo que aporta una valiosa información estructural.

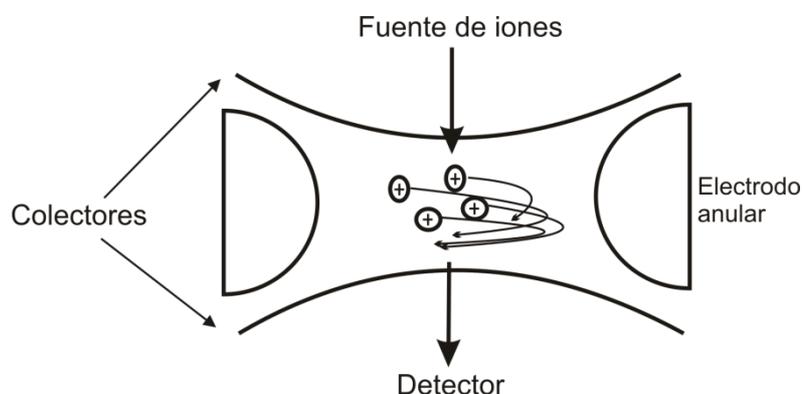


Fig 2.1.4. Esquema de una trampa iónica lineal.

### 2.1.1.3.2. Espectrometría de masas por transformada de Fourier (FTMS)

Va sea *Fourier transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR, Bruker)<sup>2</sup> u Orbitrap (Thermo),<sup>3</sup> la principal y común característica de estos analizadores de masas es la forma en la que se determinan las masas, ya que, en lugar de medir un tiempo de vuelo como en TOF o confinar los iones dentro de un campo eléctrico como en una trampa lineal, en FTMS se hace orbitar los iones dentro de la trampa, registrándose la frecuencia de sus órbitas para posteriormente, mediante una transformada de Fourier (FT), obtener el espectro de frecuencias y de ahí la  $m/z$  de cada ión.

En el caso del FT-ICR<sup>2</sup>, los iones se introducen en un campo magnético y comienzan a girar en el plano perpendicular al campo con una *frecuencia de ciclotrón* ( $\omega_c$ ), que en un campo fijo solo depende de la relación masa-carga del ión.

$$\omega_c = zeB/m \quad (2.1.3)$$

Por otro lado, en el analizador tipo orbitrap,<sup>3</sup> como se aprecia en la figura 2.1.5, los iones entran tangencialmente en un campo eléctrico generado entre un electrodo interno y uno externo, quedando confinados, ya que su atracción electrostática hacia el electrodo interior se ve contrarrestada por la fuerza centrífuga. De esta forma, los iones giran alrededor y a lo largo del eje del electrodo central con forma de huso, describiendo órbitas que son la combinación del giro alrededor del electrodo interno y un desplazamiento desde un extremo del electrodo al otro. La frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la energía y de la distribución espacial de los iones, y es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la  $m/z$ .

Dado que las frecuencias de oscilación se pueden determinar con gran precisión, los espectrómetros de masas por transformada de Fourier alcanzan resoluciones

## CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS

---

muy elevadas, por encima incluso de  $m/\Delta m = 10^6$ . Sin embargo, debido a que la resolución depende del tiempo de adquisición de las órbitas, son analizadores lentos, a diferencia de los analizadores tipo TOF, que registran todo el espectro para cada disparo. Además, la necesidad de confinar los iones para determinar su masa, impone limitaciones en el rango de iones que se pueden medir de una única vez. Normalmente, los analizadores tipo orbitrap y tipo FT-ICR están limitados a masas inferiores a  $m/z \approx 4-5000$ .

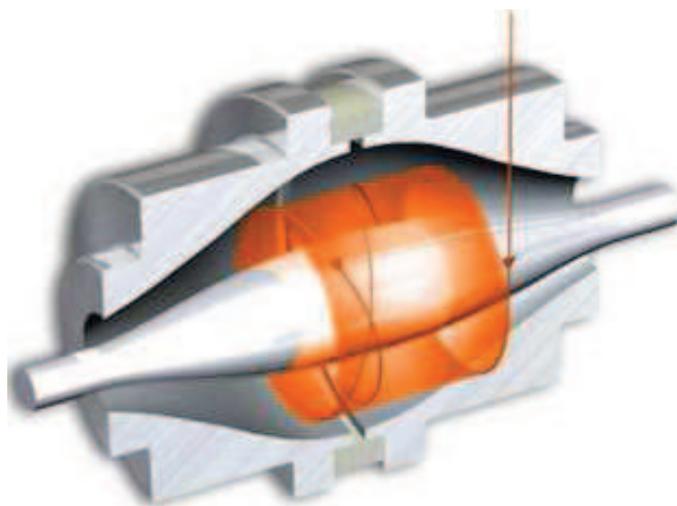


Fig 2.1.5. Orbitrap de Thermo Fisher Scientific.

### 2.1.2. Fuente de iones

Para poder obtener espectros de masas es necesario ionizar previamente las muestras ya que, independientemente del tipo de analizador, todos los espectrómetros de masas trabajan exclusivamente con iones. Existen múltiples formas de ionizar las muestras, dependiendo del estado en que se encuentre ésta y del tamaño de las moléculas a analizar.

Cuando se trata de muestras en fase gas, se suelen bombardear directamente con electrones de alta energía. Las fuentes de *ionización dura*, como el impacto electrónico, transfieren energías muy altas a los iones formados, de manera que se excitan los estados vibracionales y rotacionales, la relajación de los cuales produce gran cantidad de fragmentación y se obtienen espectros de masas muy complejos.

Por el contrario, las fuentes de *ionización blanda*, tales como las fuentes de ionización química y la de desorción asistida por matriz, producen relativamente poca excitación de los iones, de modo que tiene lugar poca fragmentación y los espectros son más limpios. Los métodos de ionización blanda más empleados

son la ionización por electroespray (ESI)<sup>7</sup> y la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI).<sup>4</sup>

### 2.1.2.1. Ionización por electroespray (ESI)

A diferencia de otras técnicas que trabajan en alto vacío, la fuente de iones ESI actúa a presión atmosférica, consiguiendo un altísimo rendimiento y permitiendo acoplar la etapa de entrada de la muestra directamente al flujo procedente de una columna de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, o incluso UHPLC). La muestra, por tanto, se ioniza a presión atmosférica. Durante la ionización, se aplica una tensión entre el capilar de entrada y el contraelectrodo. Debido al intenso gradiente del campo eléctrico presente, la muestra emerge del capilar de entrada en forma de un aerosol de pequeñas gotas, que adquieren una carga eléctrica muy elevada. Al avanzar estas gotas por la cámara de desolvatación el disolvente se va evaporando hasta que las fuerzas de repulsión entre los iones con múltiple carga del interior son capaces de vencer la tensión superficial, provocando una explosión coulombica. Este proceso se conoce como evaporación iónica. Una característica de esta técnica es la producción de iones con múltiples cargas, lo que permite analizar moléculas muy grandes, tales como proteínas, incluso en analizadores tipo trampa iónica.

Al combinar ESI con ionización química (CI) se da lo que se denomina la ionización química a presión atmosférica APci. El procedimiento de formación del spray es el mismo, pero se produce una fuerte descarga en la fuente, que crea un plasma de iones reactivos del disolvente, produciendo la ionización de la muestra, normalmente por adición o cesión de un protón. Este mecanismo, que coexiste con el de evaporación iónica, produce abundantes iones (M+H)<sup>+</sup> positivos, y (M-H)<sup>-</sup> negativos.

#### 2.1.2.1.1. Desorción/ionización por electroespray (DESI)

Un caso particular de ESI permite, inyectando el disolvente mediante un capilar y aplicando una diferencia de potencial, arrastrar los iones directamente de una muestra sólida, e introducirlos a presión atmosférica en un analizador de masas. Esta técnica, posibilita la obtención de imágenes en dos dimensiones, de la distribución de los analitos sobre una muestra, IMS (ver sección 2.1.2.2.1.1.)

### 2.1.2.2. Ionización por desorción láser (LDI)

En la LDI, los analitos se ionizan mediante la absorción de radiación láser a una determinada longitud de onda. Normalmente, la muestra se mezcla con alguna otra sustancia que favorece la absorción de fotones. Dependiendo de la naturaleza del sustrato añadido, existen varios tipos de LDI, tales como desorción/ionización en silicio (DIOS)<sup>9</sup> en superficies nanoestructuradas (NALDI),<sup>10</sup> o desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI).<sup>11</sup>

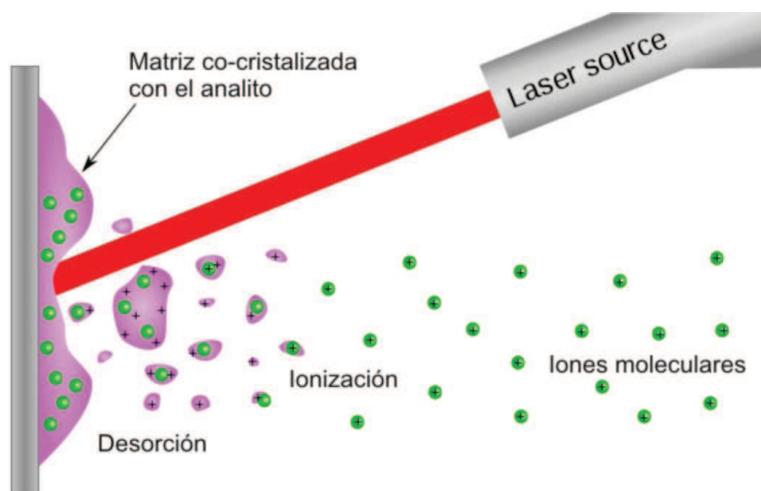


Fig 2.1.6. Esquema del método de ionización MALDI.

### 2.1.2.2.1. MALDI

Es el método LDI más desarrollado y más utilizado. Se trata de un método de ionización blanda, consistente en la co-cristalización junto con el analito de una matriz orgánica con grupos cromóforos capaces de absorber radiación en determinadas longitudes de onda, coincidentes con las de emisión del láser empleado para la desorción. De esta forma, la matriz absorbe la energía del láser, vaporizándose y liberando el analito intacto en fase gas (Figura 2.1.6). Normalmente la matriz es ácida, de manera que durante el proceso de desorción dona protones al analito, que queda cargado y listo para su análisis. Mediante esta técnica, es posible el estudio tanto de moléculas pequeñas como de grandes proteínas intactas, hasta  $m/z$  próximas a los 500.000 Da.

A diferencia de las fuentes ESI, en MALDI es poco frecuente que los analitos presenten más de una carga, positiva o negativa, por lo que los espectros son menos complejos que en ESI. Sin embargo, como contrapartida aparecen en el espectro picos debidos a la matriz, sus fragmentos o incluso de aductos de la matriz con otras moléculas presentes en la muestra, dando lugar en algunos casos a efectos de supresión iónica, capaces de enmascarar la señal de los analitos de interés. Por lo tanto, la clave para la obtención de buenos espectros de masas por MALDI reside en la elección de la matriz adecuada.<sup>12</sup>

#### 2.1.2.2.1.1. MALDI-IMS

MALDI-Imaging mass spectrometry o MALDI-IMS,<sup>13</sup> es una evolución de la técnica MALDI, que aprovecha la posibilidad de obtener espectros directamente de una muestra sólida cubierta de matriz, para obtener la distribución de analitos en un tejido. Es decir, desplazando la ionización a lo largo de toda la

muestra, siguiendo una geometría predefinida y con una separación espacial entre espectros dada, se puede visualizar en dos dimensiones la distribución cada especie a lo largo de la muestra, empleando una escala de colores (figura 2.1.7). De este modo, se añade una nueva dimensión a la información que se obtiene en un experimento: la resolución espacial, que permite generar mapas de distribución de los todos los analitos detectados, a lo largo de la muestra (normalmente, una sección de tejido o de un animal).

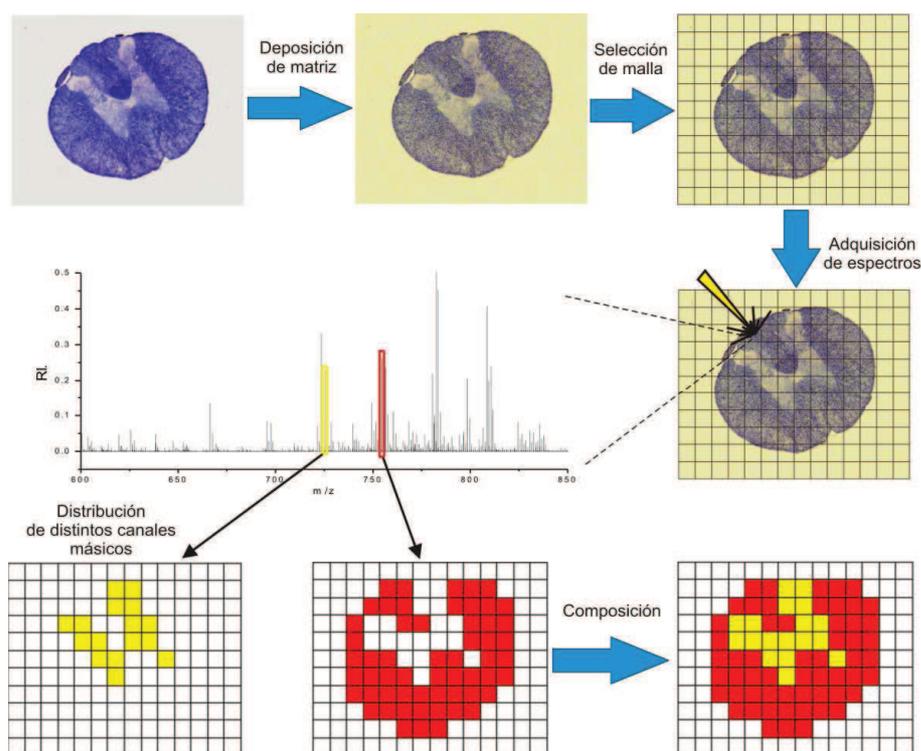


Fig 2.1.7. Esquema de un experimento MALDI-IMS.

### 2.1.2. Fragmentación

En muchas ocasiones, y dado que existen muchas moléculas que pueden tener la misma  $m/z$ , el espectro convencional (MS) de una muestra puede no ser suficiente para una identificación precisa de sus componentes. Para llevar a cabo una asignación más precisa, los espectrómetros de masas modernos cuentan con celdas de colisión, que permiten dividir los analitos en fragmentos reconocibles, aportando una información estructural inestimable para la identificación de las moléculas originales. Por definición, cuanto menor es una molécula o un fragmento, menor es el número de posibles especies cuya masa coincide con la del analito y por tanto, más sencilla es su identificación. Pero además, las moléculas se fragmentan normalmente siguiendo unas reglas bien

## CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS

---

definidas, produciendo fragmentos que, en muchos casos, corresponden con grupos funcionales de la especie original o *parent ion*. Quizá el caso más conocido sea el de las proteínas, que se fragmentan preferentemente por los enlaces peptídicos.

Al igual que en un MS convencional existe una etapa de ionización, tras la cual se seleccionan los iones a fragmentar dentro de un rango de masas, bien utilizando un cuadrupolo como filtro de iones o bien empleando una trampa iónica que solo retenga los iones en un determinado intervalo de masas. A continuación se procederá a la fragmentación de los iones aislados de alguna de las siguientes formas:<sup>14</sup>

- En el sistema de fragmentación *Collision Induced dissociation* (CID),<sup>15</sup> se inyecta en la trampa iónica un gas inerte, generalmente helio o argón, como gas de colisión. Las colisiones de los iones con el gas inerte provocan su fragmentación. Debido a que la disociación tiene lugar en la propia trampa, existe un intervalo de  $m/z$  que la trampa puede contener, que depende de la masa del ión *padre* y de  $q_z$ , y que es proporcional a la amplitud de radiofrecuencia de la trampa. Por tanto, existe un límite inferior para los fragmentos que se pueden analizar, que se denomina el *low mass cut-off* (LMCO).<sup>16</sup> Este problema se resuelve con una modificación del CID denominada *pulsed-Q dissociation* (PQD),<sup>17</sup> en el cual  $q_z$  se reduce durante la fragmentación, permitiendo que los fragmentos más pequeños sean estables dentro de la trampa.
- En la técnica de *Higher-energy collisional dissociation* o *higher-energy C-trap dissociation* (HCD)<sup>18</sup>, que es una modificación del CID específica para el Orbitrap de Thermo Scientific, la fragmentación tiene lugar fuera de la trampa. Los iones se transportan a la celda HCD, que es una celda de colisión de tipo octupolo donde tiene lugar su disociación, y a continuación los fragmentos se devuelven a la trampa para transferencia al Orbitrap, donde se analizan. De esta forma se evita el LMCO del CID y se pueden ver incluso los fragmentos más pequeños.
- En la variante conocida como *Electron-transfer dissociation* (ETD), la disociación se produce empleando aniones para fragmentar cationes. El ETD fragmenta al azar a lo largo de la cadena principal del péptido dejando intactas las cadenas laterales y modificaciones tales como fosforilaciones. La técnica sólo funciona bien para los iones con cargas altas ( $z > 2$ ), sin embargo es una técnica muy buena para la fragmentación de péptidos grandes o incluso proteínas enteras.

### 2.2. Cromatografía líquida

La cromatografía de líquidos,<sup>19</sup> es una técnica que permite separar físicamente los diferentes componentes de una solución, gracias a la adsorción selectiva de los constituyentes de la mezcla sobre una fase estacionaria. La cromatografía líquida consta de dos fases: una fase estacionaria inmisible, la cual se mantiene fija en una columna o lecho cromatográfico, y una fase móvil, que es un líquido o

una mezcla de líquidos que se hace pasar a través de la fase estacionaria. Esta última es un sólido adsorbente de gran área superficial y suele estar formada por alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico. Los centros activos que se sitúan sobre la superficie del sólido interactúan con los grupos funcionales polares de los compuestos de la mezcla y la separación se produce como consecuencia de la distinta intensidad de esas interacciones para los diferentes compuestos.

En función de la polaridad de las fases, se denomina **cromatografía líquida de fase normal** a aquella en la que se emplea una fase móvil relativamente no polar (hexano, éter isopropílico, etc) y una fase estacionaria muy polar, lo cual hace que el analito menos polar sea el primero en migrar y que al aumentar la polaridad de la fase móvil, el tiempo de retención se reduzca. Por otro lado, si se emplea una fase estacionaria no polar y una fase móvil relativamente más polar (H<sub>2</sub>O, MeOH, AcN), se la denomina **cromatografía líquida de fase reversa**. El analito más polar será el primero en aparecer y el tiempo de elución aumentará al aumentar la polaridad de la fase móvil.

### 2.2.1. Cromatografía líquida en capa fina o *Thin layer Chromatography* (TLC)

En el caso de la cromatografía líquida de capa fina o TLC,<sup>20</sup> la fase estacionaria es una capa fina y uniforme de adsorbente sobre una placa. Las muestras a analizar se depositan ("pinchan") con un capilar en la parte inferior de una placa, que se introduce verticalmente en una cubeta que contiene una pequeña cantidad de eluyente o fase móvil. El eluyente ascenderá por capilaridad por la placa, arrastrando consigo la mezcla de compuestos a identificar, que migrarán con mayor o menor velocidad en función de su polaridad, de forma que cuando finalmente la fase móvil se haya evaporado, cada uno de los compuestos a analizar habrá quedado a una altura en la placa, dependiendo de su polaridad.

Para determinar la identidad de los compuestos, se mide la distancia que ha recorrido cada compuesto desde el punto de inyección hasta el centro de la mancha y se escribe como fracción respecto a la distancia que ha recorrido el eluyente:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente}} \quad (2.2.1)$$

Para un mismo eluyente, en las mismas condiciones y con la misma placa, cada  $R_f$  es característico de un tipo de compuesto. Esta técnica es de muy sencilla aplicación y permite obtener resultados rápidos, pero no aporta mucha información sobre la identidad de los compuestos, sobre todo en mezclas complejas, como en el caso de los extractos lipídicos.

## CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS

---

### 2.2.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

En la cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid chromatography*, HPLC),<sup>21</sup> la fase estacionaria se encuentra confinada dentro de una columna cilíndrica, por la que se hace circular la fase móvil y la mezcla de compuestos a analizar. Esta configuración permite aumentar la presión sobre el eluyente, aumentando así su velocidad lineal, minimizando efectos de difusión y aumentando su resolución cromatográfica.

Además, esta técnica permite variar la composición de la fase móvil a lo largo del análisis, de forma que se consiguen separar primero compuestos más afines a uno de los componentes de la fase móvil y después los más afines al otro. El tiempo que tarda en eluir cada compuesto o tiempo de retención  $t_r$  es característico de dicho compuesto, en las condiciones exactas en las que se ha hecho el análisis.

Los detectores más habituales para la detección de los analitos eluidos en un sistema HPLC son de UV/Vis o fluorescencia, pero también es posible acoplar la salida de la columna, directamente a un espectrómetro de masas equipado con una fuente ESI y obtener el espectro de masas para cada punto (tiempo de retención) del cromatograma. Es decir, mediante un sistema acoplado HPLC-MS es posible separar primero los compuestos por su polaridad en la columna cromatográfica y después obtener el espectro por separado de cada uno de ellos, obteniendo por separado el espectro de compuestos con la misma masa pero distinto tiempo de retención y facilitando su identificación y la selección de los *parent* para estudios de fragmentación MS/MS o MS<sup>E</sup>.

### 2.3. Lipidómica

Los lípidos son biomoléculas orgánicas hidrófobas o anfipáticas, formadas por carbono e hidrógeno y generalmente también oxígeno (aunque en menor proporción). Además pueden contener también fósforo, nitrógeno y azufre.<sup>22</sup> Habitualmente son ésteres de ácidos monocarboxílicos, acompañados de una o más cadenas hidrocarbonadas largas, que les aporta su carácter generalmente apolar e hidrófobo. En las células vivas, las membranas están compuestas por lípidos polares y no polares que forman una bicapa. Los lípidos neutros o apolares (ésteres de esteroides, glicerolípidos, carbohidratos y carotenoides) participan en interacciones no covalentes con otros lípidos y con las regiones hidrófobas de las proteínas, formando la grasa del tejido adiposo, complejos ácido graso-albumina, etc.<sup>22</sup> Los lípidos polares (glicerofosfolípidos, esfingolípidos y lípidos esteroideos) interactúan con las proteínas formando enlaces de hidrógeno y mediante fuerzas electrostáticas o hidrófobas, por ejemplo en la membrana celular, en las mitocondrias, en el retículo endoplasmático o en los complejos de lipoproteínas del suero.<sup>22</sup> Los ácidos grasos, los ácidos hidroxílicos y los ácidos complejos ramificados se unen covalentemente como ésteres, amidas o glicósidos a polisacáridos, como por

ejemplo a los lipopolisacáridos de la membrana celular bacteriana.<sup>22,23</sup> En la interfase lípido/agua, las fuerzas predominantes son los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas entre las cabezas polares. En el interior de la bicapa, sin embargo, son las interacciones hidrófobas las que gobiernan.<sup>23</sup>

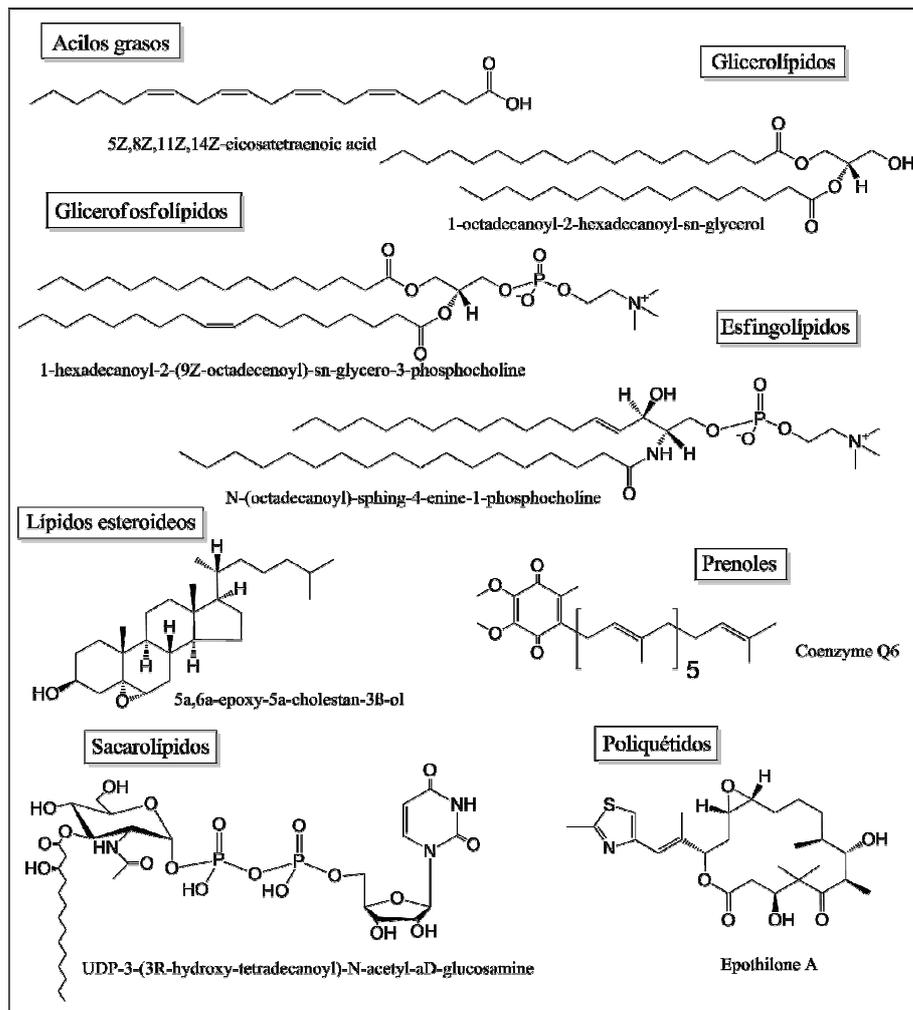


Fig 2.3.1. Ejemplos de las ocho categorías principales de lípidos.<sup>23</sup>

El sistema de clasificación universal para los lípidos, que incluye lípidos de mamíferos, plantas, bacterias y hongos, divide los lípidos en 8 grandes categorías: acilos grasos (fatty acyls), glicerolípidos (glycerolipids), glicerofosfolípidos (glycerophospholipids), esfingolípidos (sphingolipids), lípidos esteroideos (sterol lipids), prenoles (prenol lipids), sacarolípidos (saccharolipids) y poliQUÉTIDOS (polyketides), tal y como se recoge en la figura 2.3.1 y la tabla 2.3.1.

## CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS

Tabla 2.3.1. Las 8 categorías de lípidos y sus abreviaturas.

Categoría (Español)	Categoría (Inglés)	Abreviatura
Acilos grasos	Fatty acyls	FA
Glicerolípidos	Glycerolipids	GL
Glicerofosfolípidos	Glycerophospholipids	GP
Esfingolípidos	Sphingolipids	SP
Lípidos esteroideos	Sterol Lipids	ST
Lípidos prenóles	Prenol Lipids	PR
Sacarolípidos	Saccharolipids	SL
Poliquétidos	Polyketides	PK

El estudio de los lípidos es una tarea compleja, debido a la enorme abundancia de especies presentes en la célula en un instante determinado de su ciclo metabólico, a la proximidad entre sus masas y a las diferencias físico-químicas que la cabeza polar les confiere. Además, es un campo poco explorado, por lo que las bases de datos de lípidos están muy lejos de contener todas las especies existentes.

### 2.3.1. Acilos Grasos

Hay 14 clases de acilos grasos: ácidos grasos y conjugados, octadecanoides, eicosanoides, docosanoides, alcoholes grasos, aldehídos grasos, ésteres grasos, amidas grasas, nitrilos grasos, éteres grasos, hidrocarburos, hidrocarburos oxigenados, acilos grasos glicosilados y otros acilos grasos (Figura 2.3.2).

Los ácidos grasos consisten generalmente en un ácido carboxílico unido a una larga cola alifática, hidrófoba y sin ramificar, y vienen a ser los bloques con los que se construyen los lípidos más complejos. Se nombran en función de la longitud de la cadena, el número y la posición de las insaturaciones, la conformación isomérica *cis-trans* y la presencia de grupos funcionales. Hay 17 subclases de ácidos grasos en la naturaleza, estando la mayor parte de los ácidos grasos en su forma esterificada y compuestos por un número par de carbonos. Aunque en bacterias, plantas y, de forma mucho más extraña, en animales se pueden encontrar ácidos grasos con un número impar de carbonos, estos siempre son mucho menos abundantes que los que tienen un número par de carbonos.

### 2.3.2. Glicerolípidos

Esta categoría (figura 2.3.3) engloba a todos los lípidos que contienen un glicerol, y que no tienen un grupo fosfato, siendo los acilgliceroles (MAG, DAG, TAG) los más conocidos.<sup>23,24</sup> Existen además los gliceroglicanos, caracterizados por la presencia de un azúcar, y los lípidos de éteres macrocíclicos presentes en las membranas de la *archaebacteria*.<sup>25</sup>

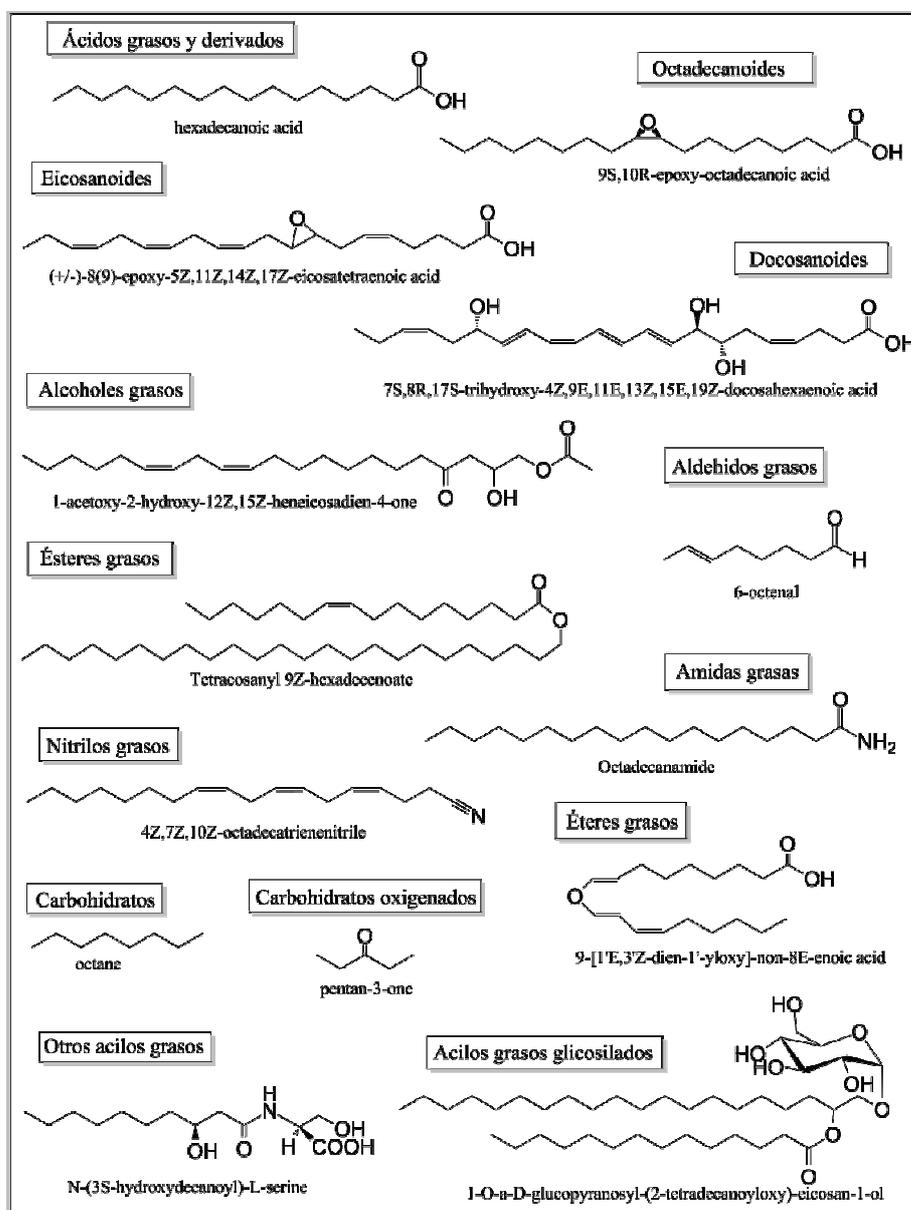


Fig 2.3.2. Ejemplos de las catorce subcategorías principales de acilos grasos.<sup>23</sup>

### 2.3.3. Glicerofosfolípidos

Los glicerofosfolípidos (figura 2.3.4) son los lípidos más abundantes de la naturaleza y son componentes clave de las membranas celulares, donde sirven de punto de unión para las proteínas celulares y extracelulares. También actúan como segundos mensajeros en la proliferación y apoptosis de lesiones

## CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS

celulares.<sup>23</sup> Los glicerofosfolípidos son derivados del ácido *sn*-glicero-3-fosfórico y contienen al menos un O-acil, O-alquil o un O-alquil-1'-enil unido a un glicerol y una cabeza polar, que puede ser una base nitrogenada, un glicerol o un inositol, entre otros. A los acilos grasos sustituidos en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol se los conoce como grupos radilo. Cuando al lípido le falta uno de sus grupos radilo se añade *liso* al nombre del glicerofosfolípido.

En función de la composición del grupo polar del glicerofosfolípido, los más importantes se agrupan en: ácidos glicerofosfatídicos o ácidos fosfatídicos (PA), glicerofosfocolinas o fosfatidilcolinas (PC), glicerofosfoetanolaminas o fosfatidiletanolaminas (PE), glicerofosfoinositoles o fosfatidilinositoles (PI), glicerofosfogliceroles o fosfatidilgliceroles (PG y PGP), glicerofosfoserinas o fosfatidilserinas (PS) y glicerofosfoglicerofosfogliceroles o cardiolipinas (CL).

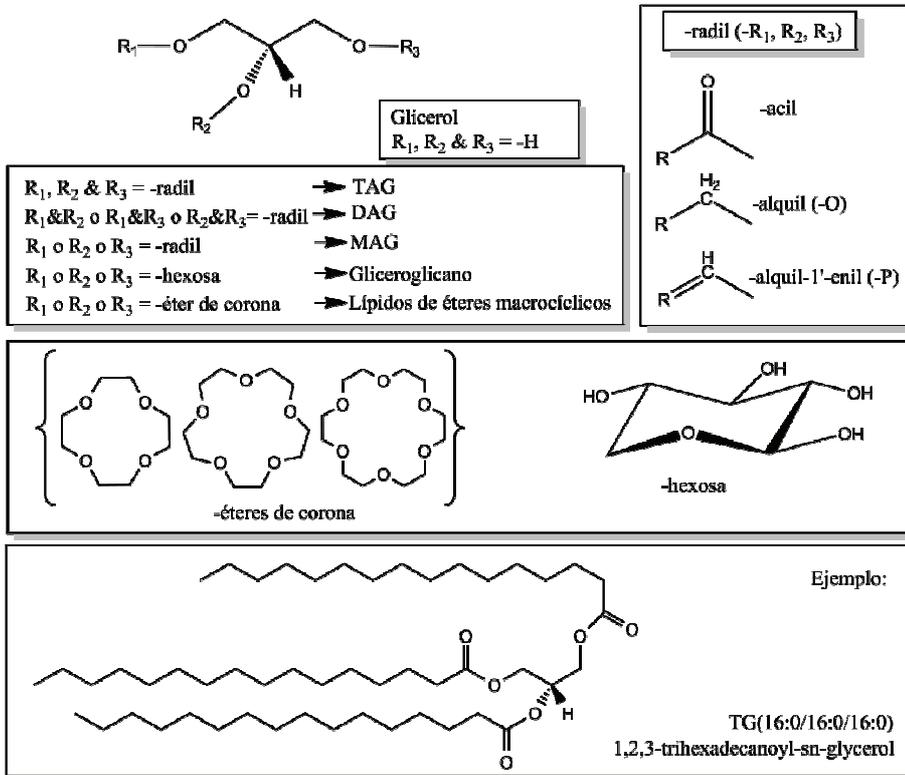


Fig 2.3.3. Glicerolípidos.<sup>23</sup>

A excepción de las PE poliinsaturadas, los glicerofosfolípidos tienden a formar bicapas en condiciones fisiológicas. Casi todas las clases (PE, PS, PA, PG y PI) tienen carga negativa en condiciones de pH 7, mientras que las PC son zwitteriónicas; es decir, tienen carga neta neutra, pero contienen un grupo con carga negativa y otro con carga positiva.<sup>23</sup>

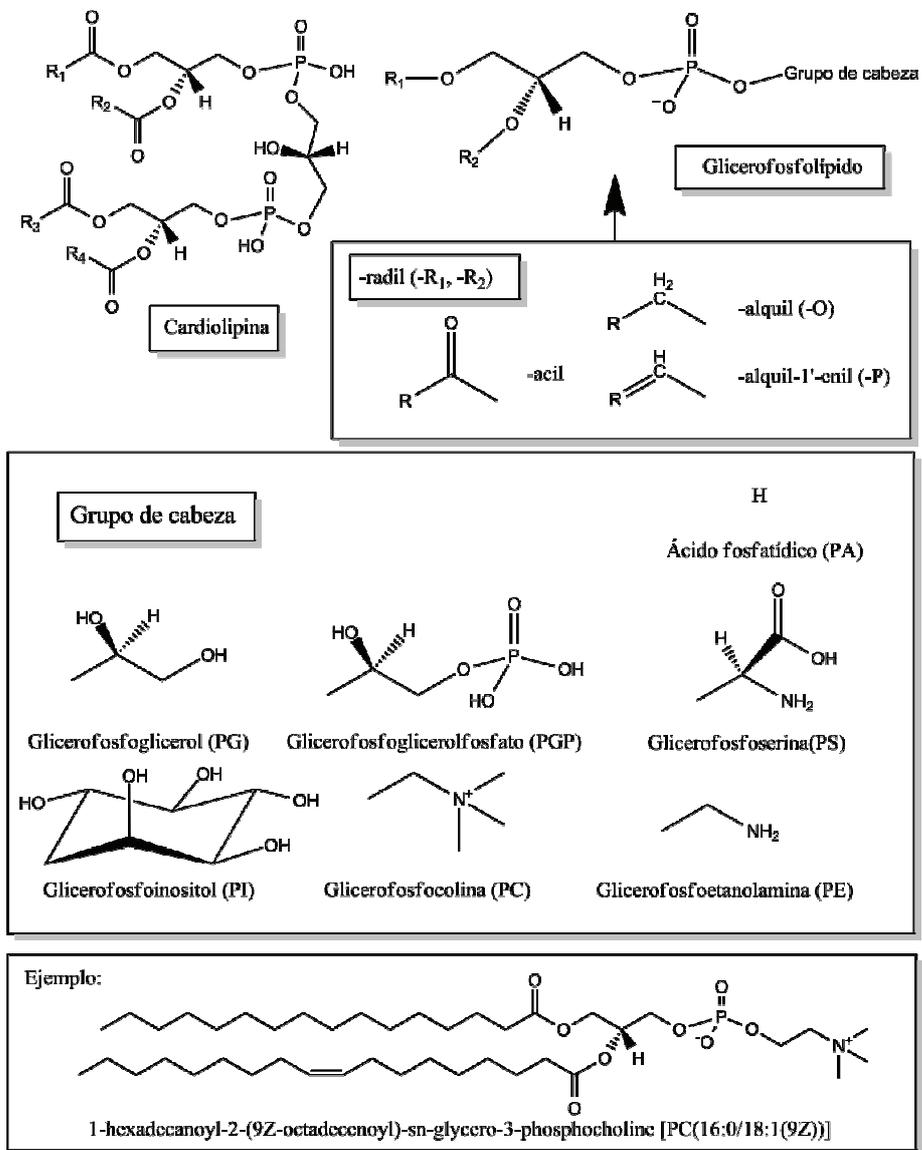


Fig 2.3.4. Las 7 clases de glicerofosfolípidos.<sup>23</sup>

### 2.3.3. Esfingolípidos

Los esfingolípidos se encuentran a menudo en tejidos del sistema nervioso, ya que juegan un papel importante en la transducción de señal y en el reconocimiento celular. Derivan del amino-alcohol alifático esfingosina o de la esfinganina (figura 2.3.5). Dentro de esta categoría se incluyen las clases:

## CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS

ceramidas, fosfoesfingolípidos como las esfingomielinas, glicosfingolípidos como los cerebrósidos o los gangliósidos y algunos aductos de proteínas.<sup>26,27</sup>

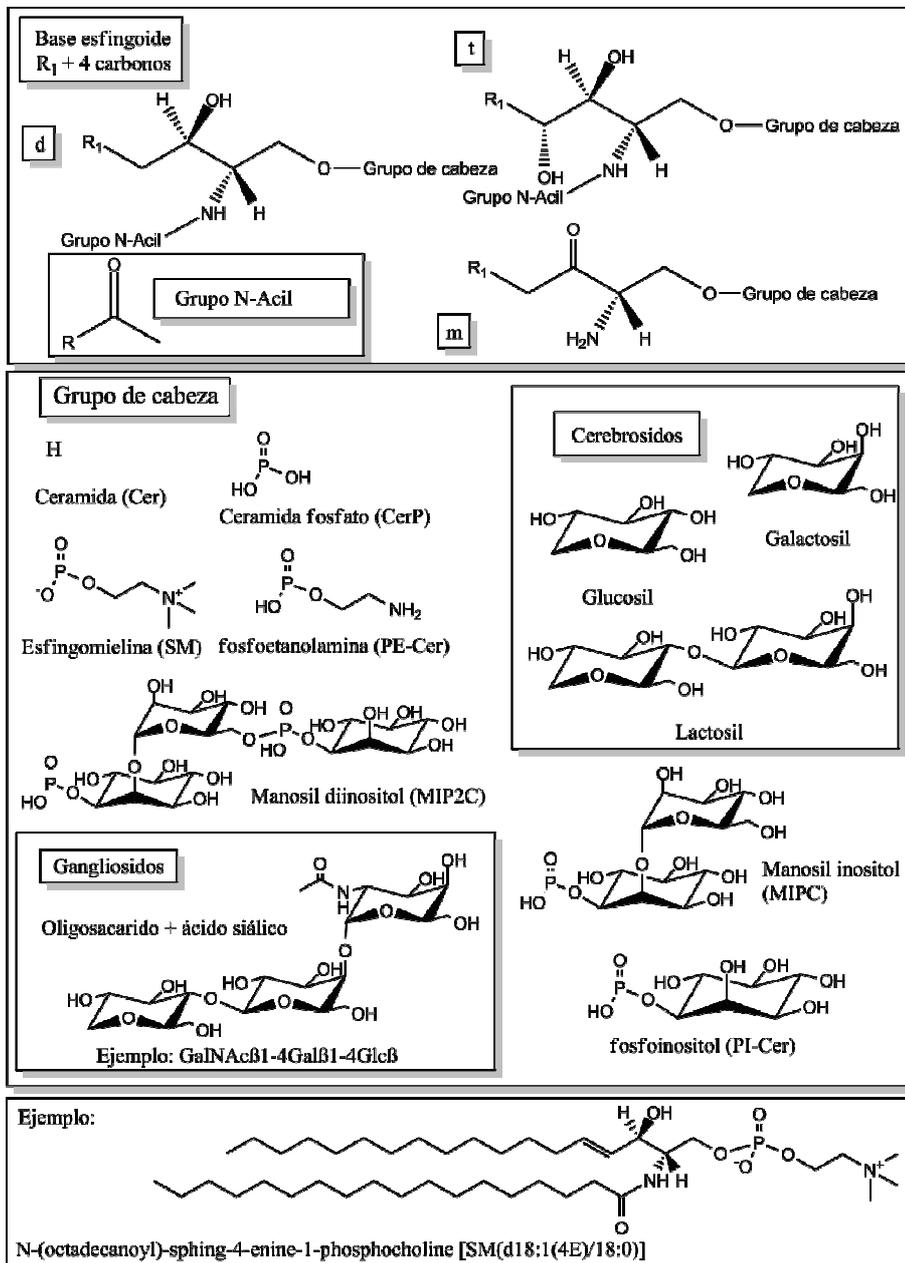


Fig 2.3.5. Esfingolípidos.<sup>23</sup>

Las ceramidas, están formadas por una esfingosina unida por la amida a un acilo graso, tienen típicamente longitudes de cadena entre 14 y 26 carbonos y una o ninguna insaturación. Es muy común también la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 2. En mamíferos, las ceramidas son los precursores habituales de los fosfoesfingolípidos, uniéndose por el O- de la columna vertebral de la ceramida a un grupo de cabeza cargado, como la etanolamina, la serina o la colina. En función del resto de carbohidratos que incorporan, los glicoesfingolípidos se clasifican como glicoesfingolípidos neutros, que contienen un azúcar sin carga, ácidos, que contienen un grupo fosfato o sulfato unido a un azúcar cargado o neutro, y gangliósidos que contienen uno o más residuos de ácido siálico.<sup>28</sup>

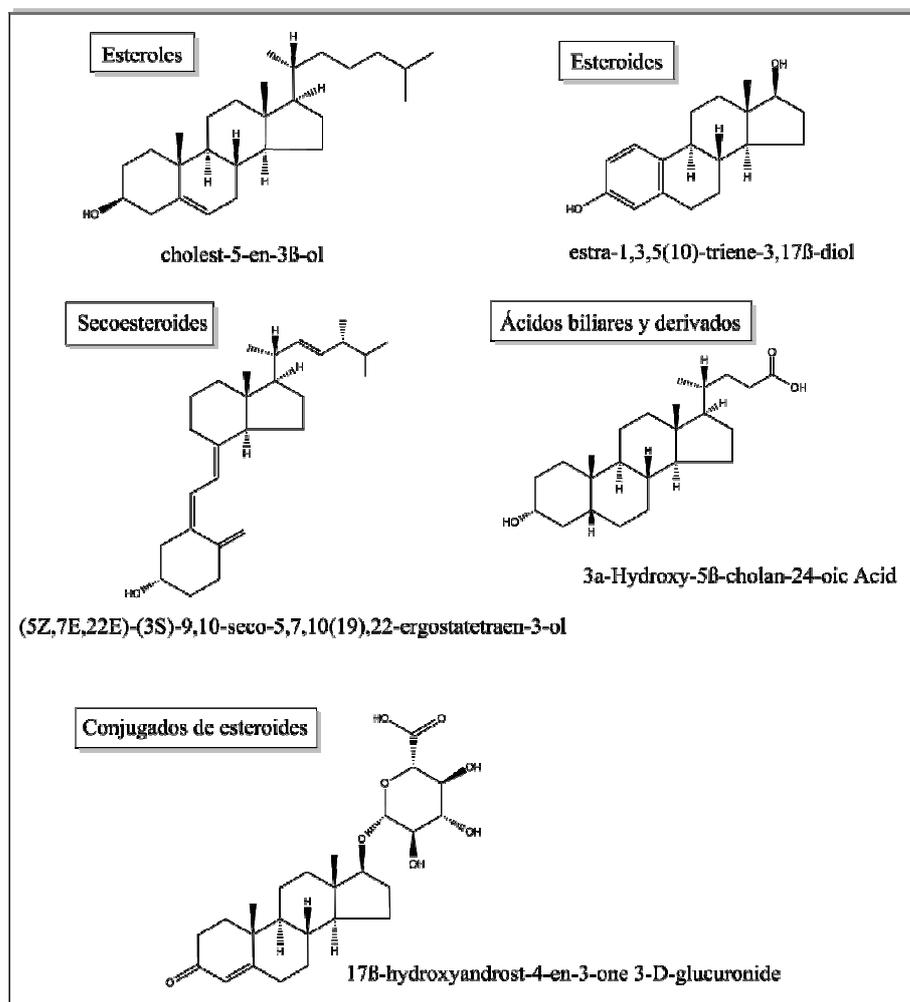


Fig 2.3.6. Lípidos esteroideos.<sup>23</sup>

## **CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS**

---

### **2.3.4. Lípidos Esteroideos**

La categoría de los lípidos esteroideos se subdivide en cinco clases, de acuerdo a su función biológica (Figura 2.3.6). El colesterol y sus derivados son los lípidos más ampliamente estudiados en mamíferos. Los lípidos esteroideos, junto a los glicerofosfolípidos y las esfingomielinas, son componentes importantes de la membrana celular.<sup>29</sup> Los lípidos esteroideos, además, participan en procesos biológicos como moléculas de señalización y hormonas, como por ejemplo, el esteroide C18 en estrógenos, el esteroide C19 en andrógenos o los secoesteroideos en la vitamina D.

### **2.3.5. Prenoles**

Los prenoles son lípidos esenciales para la supervivencia celular en todo tipo de organismos, y son sintetizados a partir de las unidades de construcción de 5 carbonos: isopentenil difosfato y dimetilalil difosfato.<sup>30</sup> Los Carotenos, por ejemplo, tienen importantes funciones como precursores de la vitamina A y como antioxidantes. Otra clase biológicamente importante dentro de los prenoles, son las quinonas y las hidroxiquinonas, como la vitamina E, la vitamina K2 (menaquinona) o la coenzima Q (ubiquinona), que contienen una cadena isoprenoide unida a un núcleo quinonoide no isoprenoide<sup>31</sup>. Los poliprenoles juegan un papel importante en el transporte de oligosacáridos a través de las membranas.

### **2.3.6. Sacarolípidos**

Los sacarolípidos son lípidos en los cuales los ácidos grasos van directamente unidos a un azúcar, en lugar de a un glicerol como en los glicerolípidos y en los glicerofosfolípidos. Pueden existir como glicanos o como derivados fosforilados, principalmente en bacterias, en 6 clases: acilaminoazucares, acilaminoazucarglicanos, aciltrehalosas, aciltrehalosaglicanos, otros acil azucares acílicos y otros sacarolípidos.<sup>23</sup>

### **2.3.7. Poliquétidos**

Los poliquétidos son sintetizados a partir de la propionil-CoA y la metilmalonil-CoA por poliquétido-sintasas. Los diferentes tipos de sintasas producen una gran diversidad de estructuras naturales. La mayoría de los agentes antimicrobianos, antiparásitos o anticáncer empleados habitualmente son poliquétidos o derivados de los poliquétidos,<sup>32</sup> como las eritromicinas, las tetraciclinas o las epotilonas antitumorales. En la figura 2.3.7 se muestra la epotilona A. Otros tipos de poliquétidos incluyen potentes toxinas.

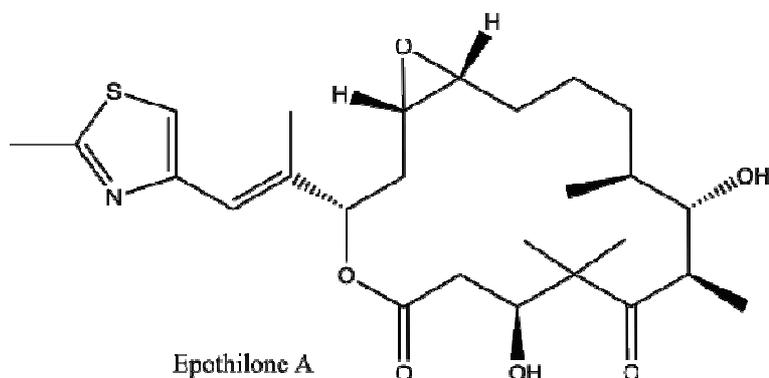


Fig 2.3.7. Ejemplo de poliquétido, Epothilona A<sup>23</sup>.

<sup>1</sup> Sparkman, O. David "Mass spectrometry desk reference." Pittsburgh: Global View Pub. (2000) ISBN 0-9660813-2-3.

<sup>2</sup> Comisarow, M. B, Marshall, A. G. "Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy", Chem. Phys. Lett. (1974) 25, 282-283.

<sup>3</sup> Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M and Graham Cooks R. "The Orbitrap: a new mass spectrometer". Journal of mass spectrometry (2005) 40 (4), 430-43

<sup>4</sup> Karas M, Hillenkamp F. "Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10.000 Daltons." Analytical Chemistry 60 (1988), 2299-2301

<sup>5</sup> Stephens, W. E., "A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion", Phys. Rev. (1946) 69, 691

<sup>6</sup> Mamyrin, B. A., Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A., "The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution", Sov. Phys. JETP. (1973) 37, 45

<sup>7</sup> Douglas D. J, Frank AJ, Mao D. "Linear ion traps in mass spectrometry." Mass Spectrom Rev. (2005) 24(1), 1-29.

<sup>8</sup> Yamashita, Masamichi, Fenn, John B. "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme". The Journal of Physical Chemistry (1984) 88 (20), 4451-4459

<sup>9</sup> Peterson D. S, "Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry". Mass Spectrom Rev. (2007) 26(1), 19-34

<sup>10</sup> Gandhi A, Kumar A, Sarkar P, Aghav A, Lal D, "NALDI-TOF MS: Applications in Dairy and Related Sectors". Research and Reviews: Journal of Dairy Science and Technology (2013) 2, 2, 2319-3409

<sup>11</sup> Fuchs B, and Schiller J, "Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Apolar Compounds". Current Organic Chemistry. (2009) 13, 16, 1664-1681(18)

<sup>12</sup> Astigarraga E, Barreda-Gomez G, Lombardero L, Fresnedo O, Castano F, Giralt M. T, Ochoa B, Rodriguez-Puertas R, and Fernandez J. A. "Profiling and Imaging of Lipids on Brain and Liver Tissue by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

## CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS

---

*Mass Spectrometry Using 2-Mercaptobenzothiazole as a Matrix.* Analytical Chemistry (2008) 80, 23, 9105-9114.

<sup>13</sup> Spengler B, Hubert M., Kaufmann R. "MALDI ion imaging and biological ion imaging with a new scanning UV-laser microprobe." Proc. 42nd Annual Conf. Mass Spectrom. and Allied Topics (Chicago, IL), (1994) p.1041

<sup>14</sup> Shen Y, Tolić N, Xie F, Zhao R, Purvine S. O, Schepmoes A. A, Ronald J. M, Anderson G.A and Smith R. D, "Effectiveness of CID, HCD, and ETD with FT MS/MS for degradomic-peptidomic analysis: comparison of peptide identification methods". J Proteome Res. (2011) 10(9): 3929–3943.

<sup>15</sup> Cooks R. G. "Collision-induced dissociation: Readings and commentary." J. Mass Spectrom. (1995) 30, 1215–1221.

<sup>16</sup> Cunningham Jra C, Glisha G. L, Burinskyb D. J, "High Amplitude Short Time Excitation: A Method to Form and Detect Low Mass Product Ions in a Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer". JASMS. (January 2006), Pages 81–84

<sup>17</sup> Guo T, Sian Gan C, Zhang H, Zhu Y, Oi Lian Kon and Kwan Sze S, "Hybridization of Pulsed-Q Dissociation and Collision-Activated Dissociation in Linear Ion Trap Mass Spectrometer for iTRAQ Quantitation". J. Proteome Res., (2008) 7 (11), 4831-4840

<sup>18</sup> Olsen J. V, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. "Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis". Nat. Methods (2007) 4 (9): 709–12.

<sup>19</sup> Tswett, M. S. "On a new category of adsorption phenomena and on its application to biochemical analysis." Proceedings of the Warsaw Society of Naturalists. Biology Section, (1905) 14, 6, 20–39

<sup>20</sup> Lewis H. W and Moody C. J. "Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice" (Illustrated ed.). WileyBlackwell. (1989) 159–173

<sup>21</sup> Snyder L. R, Kirkland J. J, and Dolan J. W, "Introduction to Modern Liquid Chromatography." John Wiley & Sons, New York, (2009).

<sup>22</sup> Spener F, Lagarde M, Géoên A, Record M. "Editorial: What is lipidomics?" Eur J Lipid Sci Technol (2003) 105, 481–482.

<sup>23</sup> Khalil M. B, Hou W, Hu Zhou, Elisma F, Swayne L A, Blanchard A P, Yao Z, Bennett S. A. L, and Figeys D, "Lipidomics era: accomplishments and challenges", Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). (2010). DOI 10.1002/mas.20294

<sup>24</sup> Coleman R. A, Lee D. P. "Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation." Prog Lipid Res (2004) 43, 134–176.

<sup>25</sup> Cronan J. E. "Bacterial membrane lipids: Where do we stand?" Annu Rev Microbiol (2003) 57, 203–224

<sup>26</sup> Merrill A. H Jr, Sandhoff K. "Sphingolipids: Metabolism and cell signaling. In: Vance DE, Vance JE, editors. New comprehensive biochemistry: Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes." New York: Elsevier Science. (2002) 373–407

<sup>27</sup> Taniguchi N, Honke K, Fukuda M. "Handbook of glycosyltransferases and related genes." Tokyo: Springer-Verlag. (2002)

<sup>28</sup> Chester M. A. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). "Nomenclature of glycolipids-recommendations." *Eur J Biochem* (1998) 257, 293–298.

<sup>29</sup> Bach D, Wachtel E. "Phospholipid/cholesterol model membranes: Formation of cholesterol crystallites." *Biochim Biophys Acta* (2003) 1610, 187–197.

<sup>30</sup> Rodriguez-Concepcion M. "The MEP pathway: A new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs." *CurrPharm Des* (2004) 10, 2391–2400.

<sup>31</sup> Ricciarelli R, Zingg J. M, Azzi A. "Vitamin E: Protective role of a Janus molecule." *FASEB J* (2001) 15, 2314–2325.

<sup>32</sup> Reeves C. D. "The enzymology of combinatorial biosynthesis." *Crit Rev Biotechnol* (2003) 23, 95–147.



## **CAPÍTULO 3**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

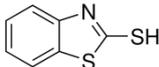
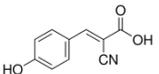
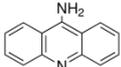
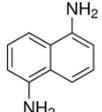


### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MALDI-MS

En los experimentos incluidos en este trabajo se emplearon principalmente cuatro matrices: CHCA, MBT,<sup>1</sup> 9-AA<sup>2,3</sup> y DAN<sup>4</sup> (Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103, Tabla 3.1.1), aunque también se probaron DHB y DHA, siendo estas últimas descartadas, ya que se obtuvo con ellas una relación señal/ruido (S/R) significativamente inferior. En las pruebas de detección de fármacos se utilizaron principalmente CHCA y MBT, que en todos los casos presentaron una muy superior sensibilidad que el DHA y el DHB. Para la detección de lípidos en extractos, se emplearon CHCA y MBT en modo positivo, mientras que en modo negativo se usaron DAN y 9-AA. Por último, para los experimentos de MALDI-IMS de lípidos se utilizó MBT sublimado en modo positivo y DAN, también sublimado, en modo de ionización negativo. En los apéndices A-II y A-III se muestran los picos más importantes del DAN en negativo y del MBT en positivo.

Tabla 3.1.1. Matrices utilizadas en este trabajo, con su masa monoisotópica, el disolvente con el que se preparan y los modos de ionización para los que se usan.

		Masa Monoisotópica	Disolventes	Uso
2-mercaptobenzotiazol (MBT)		166.986 Da	MeOH; MeOH/H <sub>2</sub> O(1:1); Etanol	(+) y (-)
Ácido $\alpha$ -cyano-4-hydroxicinámico (CHCA)		189.043 Da	AcN/H <sub>2</sub> O (4:1)	(+)
9-aminoacridina (9-AA)		194.084 Da	2-propanol	(-)
1,5-diaminonaftaleno (DAN)		158.084 Da	AcN/H <sub>2</sub> O (1:1)	(-)

##### 3.1.1. Muestras para MALDI-MS

MALDI es una técnica desarrollada para ionizar muestras sólidas o en disolución y la preparación de las muestras es relativamente sencilla. Consiste en la deposición de una alícuota de la muestra (entre 0.5 y 2  $\mu$ l) en una placa metálica y su cocrystalización con una matriz adecuada.

En función del tipo de molécula que se pretende detectar, principalmente si es electrófila, nucleófila o neutrófila, se debe elegir la matriz que potencie su detección en modo de ionización positivo/negativo. En este trabajo se emplearon 9-AA y DAN como matrices para modo de ionización negativo, CHCA para modo de ionización positivo y MBT para ambos, ya que las pruebas iniciales

## CAPÍTULO 3 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

demonstraron que son las matrices que permiten alcanzar una mayor intensidad de señal para el análisis de muestras lipídicas. Otro factor importante es la elección de un disolvente para suspender la matriz, que sea compatible con la muestra. Con algunas matrices es conveniente añadir algún ácido como el ácido trifluoroacético (TFA) para potenciar la donación de protones durante la desorción, o alguna sal para aportar cationes en la ionización y desplazar la formación de aductos hacia un catión concreto.

Hay varias técnicas de preparación de la muestra, pero la más habitual consiste en mezclar una alícuota de muestra con una disolución saturada de matriz en relación 1:10 o 1:50 (v:v), y pipetear la mezcla sobre la placa MALDI, dejando que se evapore el disolvente (método *dried droplet*). También se puede depositar la muestra y después cubrirla con matriz o depositar matriz primero y la muestra por encima (método *thin layer*) o alternar capas matriz-muestra-matriz en una configuración de tipo *sandwich*.

Para encontrar la matriz y la preparación óptimas para cada tipo de muestra, se prepararon mezclas muestra/matriz a diferentes concentraciones, con diferentes matrices y disolventes y con o sin sal o TFA, explorando el máximo número de posibilidades y se eligieron aquellas condiciones que permitieron alcanzar las mayores resoluciones, sensibilidades y mejores relaciones señal/ruido (S/R).

### 3.1.2. Muestras para MALDI-IMS

Los espectrómetros empleados para hacer imagen por espectrometría de masas disponen de adaptadores que permiten introducir muestras sólidas depositadas sobre portamuestras de vidrio o metal del tamaño de portas de microscopio estándar. Si el analizador de masas es un tubo de vuelo, es preciso emplear portamuestras conductores, bien de vidrio con la superficie tratada para conducir la electricidad (normalmente con recubrimiento de ITO, óxido de cinc-indio) o bien simplemente metálicos. Sin embargo, en los analizadores en los que los iones generados en la fase de ionización entran al sistema por una guía de iones (por ejemplo, en las trampas iónicas), no se requiere que los portamuestras sean conductores.

Las muestras sólidas que se analizan por imagen por espectrometría de masas son generalmente, como en el caso de este trabajo, muestras de tejido o superficies sobre las que se espera encontrar una distribución determinada para algún analito, como por ejemplo una placa de TLC.

Las muestras de tejido se cortan en un microtomo criostatizado en secciones de entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  y se colocan en el portamuestras aplicando calor para que se adhieran.

Existen diversas formas para depositar la matriz sobre las muestras para MALDI-IMS.

### 3.1.2.1. Inmersión

Es el procedimiento más simple, pero menos empleado, ya que limita enormemente la resolución espacial alcanzable. Se emplea exclusivamente en la preparación de muestras en las que no se precise de una resolución espacial elevada o en las que se el analito se encuentra fijado de algún modo, como por ejemplo una placa de TLC. Para este último caso, en el presente trabajo se utilizó el siguiente procedimiento: se prepararon 20 ml de una disolución saturada de matriz en el disolvente adecuado, que se depositaron en un recipiente plano. Con ayuda de unas pinzas se sumergió la placa de TLC en la disolución durante unos segundos, en posición horizontal y con la superficie adsorbente hacia abajo, y a continuación se dejó secar, tras lo que se repitió la operación una o dos veces, hasta conseguir un recubrimiento uniforme de toda la placa.

### 3.1.2.2. Aplicación por nebulización

Se prepararon 20 ml de disolución saturada de matriz en el disolvente adecuado y mediante un espray (DESAGA Starsted-Gruppe SG1) o un aerógrafo (HANSA 481) se depositó la disolución de matriz en capas consecutivas, exponiendo la superficie de la muestra a la acción del spray durante 2 segundos a intervalos de entre 3 y 6 minutos, en función del disolvente empleado. El proceso se repitió durante una hora, tratando de obtener una capa de matriz sobre la muestra lo más homogénea posible.



Fig 3.1.1. Espray DESAGA (izda) y aerógrafo HANSA (dcha).

### 3.1.2.3. Sublimación

A diferencia de la aplicación por nebulización y de la inmersión, el método de sublimación evita el empleo de disolventes, lo que resulta en resoluciones espaciales significativamente mejores.<sup>4-6</sup>

### CAPÍTULO 3 - MATERIALES Y MÉTODOS

El portamuestras se sujetó con la muestra hacia abajo en el dedo frío del sublimador (Ace Glass™ 8023), y se cerró el sistema dejando la muestra suspendida sobre una pequeña cantidad de matriz a una separación inferior a 1 cm. El brazo frío se rellenó con agua y hielo para mantener la superficie del portamuestras fría. Se conectó entonces el sistema a una bomba de vacío capaz de bajar la presión a  $\sim 10^{-2}$  mbar y se encendió la placa calefactora sobre la que se situó el sublimador, programándola a una temperatura entre 125 °C y 175 °C y durante un tiempo entre 8 y 20 minutos, dependiendo de la matriz.<sup>6</sup> En estas condiciones, la matriz sublima y se deposita preferentemente sobre la superficie fría de la muestra. De esta forma, regulando la temperatura y el tiempo, es posible depositar una cantidad controlada de matriz sobre la muestra, en forma de una capa uniforme. Normalmente, se depositaron densidades de matriz de 0.17 y 0.15 mg/cm<sup>2</sup> para MBT y DAN respectivamente.



Fig 3.1.2. Proceso de sublimación.

Un aspecto positivo de esta técnica es la homogeneidad de la distribución de la matriz a lo largo de toda la muestra, que permite alcanzar resoluciones espaciales mejores y se minimiza la pérdida de resolución en masa debida a la distribución espacial inicial de los iones en un tubo de vuelo (ver 2.1.1.1). Por otro lado, el proceso de sublimación es en cierta forma, un proceso de purificación. Por tanto, con este procedimiento es posible eliminar impurezas menos volátiles

que la sustancia empleada como matriz. Al no requerir de disolventes también hay un menor riesgo de deslocalización de los analitos. Como desventaja, las moléculas de la matriz no están cocrystalizadas con las moléculas de analito, lo que reduce en parte la sensibilidad, pues el proceso de desorción es menos eficiente. Por lo tanto, la cantidad óptima de matriz a depositar es un fino equilibrio entre alcanzar una mejor resolución espacial o una mayor sensibilidad.

Si bien en el estudio de los lípidos hay una disminución de la sensibilidad evidente pero no catastrófica, que permite determinar la distribución de la mayor parte de las especies, en el caso de las proteínas es necesaria la presencia de un disolvente para extraerlas del tejido, cocrystalizarlas con la matriz y posibilitar su detección. También en lípidos, si la pérdida de sensibilidad es demasiado elevada, por ejemplo por haber depositado una cantidad excesiva de matriz, es posible todavía realizar las medidas introduciendo una etapa de **recristalización** de la matriz, aunque a costa de empeorar la resolución espacial.<sup>7</sup>

El proceso de recristalización empleado en este trabajo es muy sencillo, y fue desarrollado y probado por el Grupo de Espectroscopía.<sup>8</sup> Empleando una placa de petri, se adhirió el portamuestras a la tapa con la muestra cubierta por la matriz hacia abajo. Se añadió 1 ml de disolvente en un papel de filtro en la base de la placa, se selló el conjunto con cinta y se depositó sobre la placa calefactora a una temperatura y durante un tiempo variable, en función del disolvente utilizado (Tabla 3.1.2).

Tabla 3.1.2. Parámetros óptimos para MALDI-Imaging de lípidos comprobados en el laboratorio.

	T <sup>a</sup> Sub (°C)	t Sub (min)	Recristalización	Disolvente	T <sup>a</sup> (°C)	t (min)
MBT	-125	10	Opcional	Etanol	40	1
CHCA	-150	12	Si	Etanol, AcN	40	1
9-AA	-175	12	Si	2-propanol	40	1
DAN	-125	8	Opcional	Etanol	40	1

### 3.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA HPLC

Todas las muestras medidas por HPLC-MS en este trabajo, se prepararon en concentraciones entre 10 y 20 µg/ml en viales de vidrio y empleando como disolvente una mezcla cloroformo/metanol (2:1v/v).

Se preparó una mezcla cloroformo/metanol (2:1v/v) en un recipiente de vidrio y se tapó con parafilm para evitar evaporaciones que modificaran las concentraciones. Se diluyó cada muestra, hasta alcanzar la concentración deseada en viales de vidrio con tapón de rosca. Se vertió entre 100 µl y 300 µl de cada muestra y del disolvente en viales de máxima recuperación Waters (Milford, MA, USA).

## **CAPÍTULO 3 - MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **3.3. MALDI**

#### **3.3.1. Experimentos con el Tubo de vuelo**

Parte de las medidas se realizaron con un tubo de vuelo modelo Reflex IV (Bruker, Billerica, MA, USA) del que dispone el Grupo de Espectroscopía y Espectrometría de Masas. Todo el sistema está en alto vacío a  $6 \times 10^{-6}$  mbar de presión, producido por dos bombas turbomoleculares y tres bombas rotatorias, una para producir un vacío de  $6 \times 10^{-2}$  mbar en la precámara de entrada de muestras y dos para producir un pre-vacío de  $3 \times 10^{-2}$  mbar que permita funcionar a las dos bombas turbomoleculares. La fuente MALDI está equipada con un láser de  $N_2$  (337 nm), que suministra pulsos con una energía de 300  $\mu$ J regulables mediante un filtro neutro de densidad variable y con una frecuencia de disparo de 10 Hz. Los iones producidos en la fuente se aceleran aplicando una diferencia de potencial de 20 kV antes de entrar en el tubo de vuelo dotado de reflectrón. Además, se deben optimizar la intensidad del láser y la ganancia del reflectrón (en caso de usar el modo reflectrón) para cada tipo de matriz para alcanzar la máxima relación S/R.

##### **3.3.1.1. Extractos lipídicos en disolución**

Siguiendo el proceso descrito en el punto 3.1.1, se pipetearon entre 1 y 1.5  $\mu$ l, de mezclas de extracto con matriz, solo la matriz y una mezcla buffer/matriz (blancos) sobre una placa de acero con 384 pocillos (Figura 3.3.1.b) y se introdujeron en el equipo. Se definió un método de trabajo, que normalmente incluyó el empleo del equipo en modo reflectrón, para un rango de masas y una vez optimizada la relación S/R, con el software de control Flexcontrol, se programaron los experimentos para que fueran captados automáticamente, tomando y promediando 300 espectros al azar dentro de cada pocillo.

##### **3.3.1.2. Secciones de tejido**

Se adhirió una sección de papel milimetrado por detrás del portamuestras conductor, y se marcó el punto central de la muestra y la distancia desde ese punto hasta los extremos en los ejes x e y. Se introdujo el portamuestras en el equipo utilizando un adaptador que permite la introducción de dos portas (muestras) simultáneamente (Figura 3.3.1.c) y, empleado la cámara interna del equipo, se buscó el punto central marcado en el papel y se definió en el programa de control (Flexcontrol) una geometría rectangular, mediante las distancias hasta los extremos. Se extrajo la muestra del equipo y mediante el método de nebulización descrito en el punto 3.1.2.2, se cubrió de matriz y se introdujo nuevamente en el equipo.<sup>9</sup>

Se definió un método de trabajo, normalmente en modo reflectrón, para el rango de masas apropiado, y una vez optimizada la relación S/R, se programó el experimento para que captase los datos automáticamente, definiendo la

distancia entre cada punto (entre 50  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ ), promediando 30 disparos para cada espectro de masas y desplazándose en modo rejilla, de izquierda a derecha y de arriba abajo.<sup>i</sup>

### 2.3.1.3. Placas de TLC

Empleando un lápiz, se delimitaron las calles sobre las que se realizó la separación cromatográfica, se midieron y anotaron las posiciones. Una vez montada en el soporte para placas TLC (Figura 3.3.1.d), mediante un programa desarrollado en Mathematica por el Grupo de Espectroscopía,<sup>10</sup> se definió el área de barrido sobre la placa de TLC, empleando como parámetros de entrada las medidas anotadas previamente y la distancia entre puntos, o resolución, generalmente entre 150  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ . con esta información se genera un archivo con las posiciones en formato ASCII. Se procedió entonces a recubrir la placa de TLC con matriz mediante el procedimiento de inmersión descrito en 3.1.2.1, y se introdujo en el equipo. Se definió entonces un método de trabajo, que podía ser en modo lineal o en modo reflectrón, para un rango de masas, y una vez optimizada la relación S/R, se cargó el archivo ASCII con las posiciones barrido en el programa de control Flexcontrol y se escaneó promediando 30 disparos por punto.

### 3.3.1.4. Obleas de silicio nanoestructuradas

Sobre una placa soporte mecanizada para rebajar su superficie (Figura 3.3.1.e), se sujetó la oblea sobre la que se pipetearon los diferentes patrones sin matriz, anotando su posición. Se introdujo la placa en el espectrómetro, se definió un método de trabajo, y una vez optimizada la relación S/R, se buscó con la cámara del espectrómetro los puntos en que se había depositado la muestra, que se escanearon manualmente con el programa de control Flexcontrol promediando 300 disparos por muestra para obtener el espectro.



Fig 3.3.1. Material de Bruker a) Espectrómetro de masas Reflex IV, b) Placa de 384 pocillos, c) Placa soporte para portamuestras, d) Placa soporte para TLC, e) Placa soporte para Obleas nanoestructuradas.

<sup>i</sup> Las condiciones específicas para cada muestra se describen en el capítulo de resultados.

## CAPÍTULO 3 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.3.2. Experimentos con la trampa iónica

El equipo empleado, un analizador LTQ-Orbitrap XL (Thermo Inc., Waltham, USA) es parte del equipamiento disponible en el servicio general de análisis de la Universidad del País Vasco, SGIker. Todo el sistema está en alto vacío,  $\sim 10^{-10}$  mbar de presión, producido por cinco bombas turbomoleculares y tres bombas rotativas, una para producir un vacío de  $10^{-3}$  mbar en la precámara de entrada de muestras y dos para producir un prevacío que permita funcionar a las bombas turbomoleculares. La fuente MALDI está equipada con un láser de  $N_2$  (337 nm), que produce pulsos de 100  $\mu$ J, regulables mediante un filtro de neutro de densidad variable y con una frecuencia de disparo de 60 Hz. Los iones producidos en la fuente se transportan mediante una guía de iones de octupolo hasta la trampa iónica, donde se enfrían y se acumulan antes de ser enviados al orbitrap o medidos directamente en la trampa.

Con el software de control Thermo Tune Plus se optimizó la intensidad del láser, el tipo de barrido, con o sin *automatic gain control* (AGC), y, en el caso de no usar AGC, el número de disparos por microbarrido y el número de microbarridos por punto para el experimento. Todos estos parámetros se guardaron en un archivo de configuración (\*.tune).

Con el software de análisis y control Xcalibur suministrado por el fabricante, se generó un método en el que se cargó el archivo de configuración y se definió:

- El modo de barrido; *raster*, *espiral*, *CPS* o *tissue imaging*.
- El tipo de detección: trampa iónica (IT) u Orbitrap (FT).
- La resolución en masa de los espectros: hasta 100.000 en FT.
- El rango de masas a medir.
- Una *lock-mass* para recalibrar internamente las masas.
- La polaridad (modo de ionización positiva o negativa).
- En los experimentos de fragmentación,  $MS^n$ .
  - o La masa de los precursores.
  - o La ventana del filtro de masas.
  - o El tipo de fragmentación, HCD, PQD o CID.
  - o La energía de colisión.

Todo se guardó en un archivo de métodos (\*.method).

#### 3.3.2.1. Extractos lipídicos en disolución

Siguiendo el proceso descrito en el punto 3.1.1 entre 0.5  $\mu$ l y 1.5  $\mu$ l de las mezclas extracto/matriz se pipetearon sobre una placa de acero con 384 o 96 pocillos (Figura 3.3.2.b) y se introdujeron en el equipo. Se definieron el archivo de configuración y el método y, en el programa de análisis y control Xcalibur, se creó una secuencia en la que se introdujo el nombre de cada muestra, la posición en la placa, la ubicación del archivo de método y la ruta de salida donde se

guardarían los espectros. Se lanzó la secuencia y Xcalibur tomó el control del equipo, llevó a cabo la secuencia programada y acumuló los resultados.

### 3.3.2.2. Microarrays de homogeneizado de membrana

Se digitalizó la imagen del microarray montado sobre el adaptador (Figura 3.3.2.c) empleando el escáner conectado al ordenador de control y se guardó. Para la deposición de la matriz se ensayaron dos métodos: la sublimación y la impresión mediante un robot conjuntamente con la muestra durante la confección del array. En el primer caso, fue necesario escanear el array antes de proceder a la deposición de la matriz.

Se introdujo entonces el array en el equipo y mediante el programa de control Thermo Tune Plus se cargó la imagen digitalizada previamente de la muestra en la placa, se definió el área donde se encontraba la muestra y se guardó en un archivo de posición (\*.maldipos). Se definieron el archivo de configuración, sin AGC y con 10 disparos por microbarrido, y el método, con modo de exploración *tissue imaging*. En el programa de análisis y control Xcalibur, se creó una secuencia en la que se introdujo el nombre de cada muestra, la ubicación del archivo de posición, la ubicación del archivo de método y la ruta de salida donde se guardarían los espectros<sup>ii</sup>.

### 3.3.2.3. Secciones de tejido

Se marcó, con un rotulador indeleble y por detrás del portamuestras, la posición de la muestra. Se digitalizó la imagen de la muestra montada sobre el adaptador para portamuestras de vidrio (Figura 3.3.2.c) y se guardó la imagen. Empleando el método de sublimación descrito en el punto 3.1.2.3, se cubrió la muestra con matriz y se introdujo en el equipo.<sup>11</sup>

Mediante el programa de control Thermo Tune Plus se cargó la imagen digitalizada de la muestra en la placa, se definió el área a medir y se guardó en un archivo de posición. Se definieron el archivo de configuración, sin AGC y con 10 disparos por microbarrido, y el método, con modo de barrido *tissue imaging*. En el programa de análisis y control, Xcalibur, se creó una secuencia en la que se introdujeron el nombre de cada muestra, la ubicación del archivo de posición, la ubicación del archivo de método y la ruta de salida donde se guardarían los espectros<sup>ii</sup>.

---

<sup>ii</sup> Las condiciones específicas para cada muestra se describen en el capítulo de resultados.

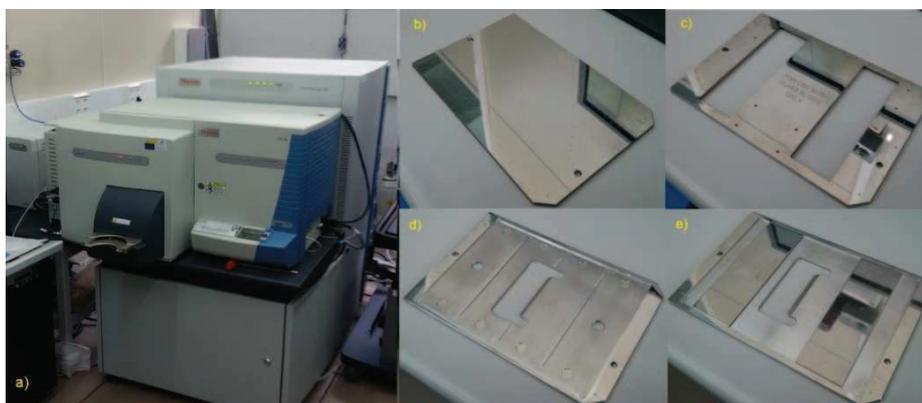


Fig 3.3.2. Material de Thermo, a) Espectrómetro LTQ Orbitrap XL con fuente de ionización MALDI, b) Placa de 96 pocillos, c) Placa soporte para portamuestras de vidrio, d) Placa soporte magnetizada para portamuestras metálicos, e) Placa soporte magnetizada adaptable (empleada con TLC).

### 3.4. UHPLC

También se empleó un equipo tipo qTOF (SYNAPT G2 HDMS, Waters, Milford, MA, USA), disponible en el servicio general de análisis de la Universidad del País Vasco, SGIker, y que es operado por los técnicos del servicio. El equipo, configurado con un sistema acoplado de cuadrupolo y tiempo de vuelo (qTOF), está equipado con una fuente dual de ionización por electrospray (ESI) y de ionización por MALDI. La primera puede emplearse tanto en modo positivo como negativo. El voltaje del capilar se fija a 0,7 kV (ESI+) o 0,5 kV (ESI-). Se utiliza nitrógeno como gas de desolvatación y de cono, a velocidades de flujo de 900 y 30 l/h, respectivamente. La fuente está a una temperatura de 120 °C, mientras que la temperatura de desolvatación es de 400 °C.

Antes del análisis, el espectrómetro de masas se calibró con una solución de formiato sódico 0,5 mM. Todos los espectros adquiridos se corrigieron automáticamente durante la adquisición usando una *lock-mass*. Como calibrante interno se utilizó una solución de leucina-encefalina (2 ng/l) en acetonitrilo:agua (50:50 (v/v) + ácido fórmico al 0,1%) empleando como *lock-mass* los iones con  $m/z = 556.2771$  y  $278.1141$ ,  $554.2615$  y  $236.1035$ , dependiendo del modo de ionización. Se controló a los 0,3 s de tiempo de muestreo, y en intervalos de 10 s y se promedió cada 3 muestras, utilizando una ventana de masas de  $\pm 0,5$  Da. El resto de las condiciones fueron: voltaje de capilar a 2,0 y 2,5 kV y una energía de colisión 21 y 30 eV en ESI+ y ESI- respectivamente. El calibrante interno se introdujo en el spray de *lock mass* a un caudal constante de 10 l/min.

Se prepararon las disoluciones siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.2 y a continuación se inyectó cada alícuota en la columna (Acquity UPLC HSS T3 1.8  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2.1 mm, Waters, Milford, MA, USA) que se calentó a 65 °C. Las

fases móviles que empleadas fueron acetonitrilo y agua con acetato de amonio 10 mM (40:60, v/v, fase A) y acetonitrilo e isopropanol con acetato de amonio 10 mM (10:90, v/v, fase B).<sup>7</sup>



3.4.1. Equipo SYNAPT G2 HDMS Waters (Milford, MA, USA).

El tiempo de elución de la muestra fue de 13 min bajo las siguientes condiciones: 0-10 min, gradiente lineal de 40% a 100% de B; 10-11 min, 100% de B; y finalmente, re-equilibrado del sistema con 40% de B (v/v) durante 2 min antes de la siguiente inyección. Se empleó una tasa de flujo de 0,5 ml/min y un volumen de inyección de 5 ml. Todas las muestras se mantuvieron a 4 ° C durante el análisis.

La adquisición de datos se llevó a cabo en el rango de masas 50-1200 Da a una resolución de ~20.000 con un tiempo de muestreo de 0,5 s y un retardo entre cada adquisición de 0.024 s. El espectrómetro operó en modo de adquisición MS<sup>E</sup> continuo para ambas polaridades. En este método de adquisición, el primer cuadrupolo Q1 funciona únicamente en modo RF de banda ancha, permitiendo que todos los iones entren en la celda de colisión *T-wave*. Se crean automáticamente dos funciones de adquisición discretas e independientes,

### CAPÍTULO 3 - MATERIALES Y MÉTODOS

---

intercaladas: la primera función, de baja energía, se fija en 6 eV y permite obtener el espectro de las especies no fragmentadas, mientras que la segunda función, de alta energía, proporciona los datos de fragmentación mediante el uso de una rampa de energía de colisión de 15 a 40 eV. En ambos casos, se utiliza gas Ar para la fragmentación CID.

<sup>1</sup> Astigarraga E, Barreda-Gomez G, Lombardero L, Fresnedo O, Castano F, Giralt M T, Ochoa B, Rodriguez-Puertas R, and Fernandez J. A. "Profiling and Imaging of Lipids on Brain and Liver Tissue by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Using 2-Mercaptobenzothiazole as a Matrix", *Analytical Chemistry* 80 (23):9105-9114, 2008.

<sup>2</sup> Rachal L. Vermillion-Salsbury and David M. Hercules. "9-Aminoacridine as a matrix for negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization" *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. (2002) 16, 16, 1575–1581.

<sup>3</sup> Fuchs B, Bischoff A, Süß R, Teuber K, Schürenberg M, Suckau D and Schiller J. "Phosphatidylcholines and -ethanolamines can be easily mistaken in phospholipid mixtures: a negative ion MALDI-TOF MS study with 9-aminoacridine as matrix and egg yolk as selected example." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2009) 395, 8, 2479-2487.

<sup>4</sup> Thomas A, Charbonneau J. L, Fournaise E and Chaurand P, "Sublimation of new matrix candidates for high spatial resolution imaging mass spectrometry of lipids: enhanced information in both positive and negative polarities after 1,5-diaminonaphthalene deposition.", *Anal Chem*. 2012 Feb 21;84(4):2048-54.

<sup>5</sup> Hankin J. A, Barkley R. M, and Murphy R. C. "Sublimation as a Method of Matrix Application for Mass Spectrometric Imaging", *American Society for Mass Spectrometry*, 2007, 1044-0305.

<sup>6</sup> Murphy R. C, Hankin J. A, Barkley R. M and Zemski Berry K. A. "MALDI imaging of lipids after matrix sublimation/deposition". *Biochimica et Biophysica Acta* 1811 (2011) 970–975.

<sup>7</sup> Junhai Yang and Caprioli R M, "Matrix Sublimation/Recrystallization for Imaging Proteins by Mass Spectrometry at High Spatial Resolution", *Anal Chem*. 2011 July 15; 83(14): 5728–5734.

<sup>8</sup> Fernández R, Carriel V, Lage S, Garate J, Díez-García J, Ochoa B, Castro B, Alaminos M and Fernández J.A. "Deciphering the Lipid Architecture of the Sciatic Nerve Using Imaging Mass Spectrometry" enviado a *ACS Chem. Neuroscience*

<sup>9</sup> Veloso A, Fernández R, Astigarraga E, Barreda-Gómez G, Manuel I, Giralt M T, Ferrer I, Ochoa B, Rodríguez-Puertas R and Fernández J. A, "Distribution of lipids in human brain", *Anal Bioanal Chem* (2011) 401:89– 101.

<sup>10</sup> Astigarraga Arribas E. "Desarrollo de nuevas herramientas para la caracterización de proteínas mediante espectrometría de masas." Tesis Doctoral en el departamento de Química-Física de la Universidad del País Vasco (2009)

<sup>11</sup> Fernández R, Lage S, Abad-García B, Barceló-Coblijn G, Terés S, López D. H, Guardiola-Serrano F, Martín M L, Escribá P. V and Fernández J. A, "Analysis of the Lipidome of Xenografts Using MALDI-IMS and UHPLC-ESI-QTOF", *J Am Soc Mass Spectrom*. 2014 Jul; 25(7):1237-46.

**CAPÍTULO 5**  
**RESULTADOS**



**SECCIÓN 5.1.**

**TLC IMAGING – RANKCOMPETE**



## **5.1. TLC IMAGING – RANKCOMPETE**

### **5.1.1. Objetivo**

El objetivo de estos experimentos fue el desarrollo de un método que permitiera combinar la separación por cromatografía líquida de capa fina (TLC) con la imagen por espectrometría de masas, facilitando la identificación de las especies lipídicas presentes en un extracto. Para ello fue necesario en primer lugar, optimizar el método de preparación de la muestra, en este caso la placa TLC con los lípidos ya separados en su superficie, y en segundo lugar, desarrollar un algoritmo que permitiera obtener automáticamente los espectros promedio de cada conjunto de lípidos en la placa, donde presumiblemente se encontraban agrupados por clase, separados por sus diferentes polaridades (ver 2.2).

### **5.1.2. Métodos experimentales**

Para contar con un experimento control, en el que los resultados fueran conocidos, y comprobar la eficacia del software, se depositaron, en posiciones controladas a lo largo de una calle en una placa TLC (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> MERCK), cinco muestras de patrones lipídicos diferentes (LPC, PC, PE, SM y PS) y una mezcla de calibrante (polietilenglicol (PEG) (600 uma – 1000 uma)), ver figura 5.1.1.

Se ensayaron diversas metodologías para la aplicación de la matriz sobre la placa de TLC. Tal y como se describe en el apartado 3.1.2.2, se intentó por nebulización, pero debido a la porosidad de la placa de TLC el proceso requería de un tiempo de preparación extremadamente largo, siendo complicado depositar una cantidad de matriz suficiente sobre la placa. Se ensayaron a continuación varios protocolos de preparación por inmersión: introduciendo la placa vertical u horizontalmente, en una única inmersión o en varias, secando con un flujo de aire o permitiendo el secado espontáneo. Finalmente el método óptimo elegido es el método de inmersión que se describe en el punto 3.1.2.1, introduciendo la placa horizontalmente, dejando secar y haciendo una segunda inmersión.

Una vez seca la placa, se instaló en el portamuestras y se introdujo en el tubo de vuelo (Reflex IV, Bruker, Bremen, Alemania) con la metodología descrita en el punto 3.3.1.3 para las placas de TLC. Se definió un área de barrido a una resolución de 250  $\mu\text{m}$  y unas dimensiones de 110 x 7 puntos. Es decir 770 espectros, cada uno de los cuales era el resultado de 30 disparos promediados, con una potencia de láser al 50% y una ganancia de 6 en modo reflectrón positivo.



Fig 5.1.1. Distribución en la placa de las muestras. De izquierda a derecha: LPC, PC, PE, SM, PS y PEG.

A lo largo del experimento, el programa de control (Flexcontrol Bruker, Bremen, Alemania), generó un conjunto de carpetas, una por coordenada, con los archivos necesarios para reconstruir los espectros de cada punto como se describe en el punto 4.1.1.

### 5.1.3. Análisis de los resultados

Para analizar los resultados se diseñó un programa capaz de captar los espectros desde el formato de Bruker, y convertirlos en un formato manejable en Matlab. El programa debía permitir recalibrar, alinear, corregir la línea base y normalizar los espectros, además de representar la distribución espacial de las especies y extraer el espectro promedio de áreas seleccionadas por el usuario. El programa se describe en los puntos 4.1.1, 4.2 y 4.3.

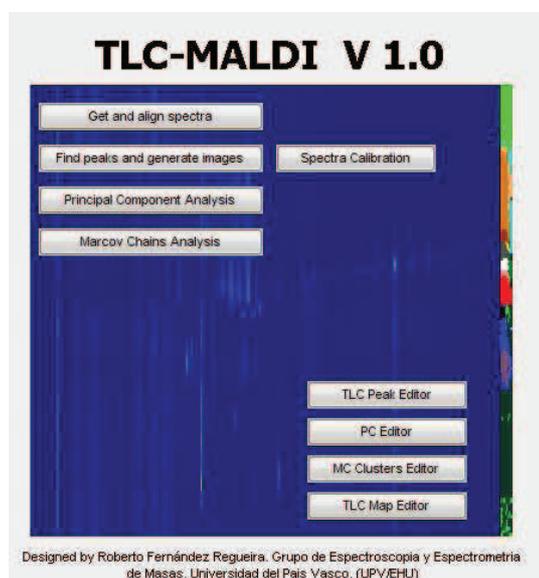


Fig 5.1.2. Interfaz del programa TLCMALDI.

Un segundo programa, debía permitir la localización de las zonas en las que se sitúa cada clase de lípido separada sobre la placa TLC. Se diseñó un software capaz de hacer clustering sobre los experimentos mediante dos algoritmos

diferentes: PCA y RankCompete. Las funciones y diseño de este programa se describen en los puntos 4.4.1.1 y 4.4.2.1. El programa desarrollado, TLC-MALDI, figura 5.1.2, es un paquete de programas que integra todas estas herramientas de captación, alineado, calibrado y normalización de espectros, además de las herramientas de visualización y de clustering.

### 5.1.3.1. Análisis por componentes principales

Para este experimento y habiendo seleccionado para el análisis un total de 130 picos entre 500 y 1000 Da, se obtuvieron los siguientes 15 primeros componentes principales (figura 5.1.3), que explicaban un 73,95% de la varianza del sistema y que permitían distinguir varios de los clusters o estructuras donde se sitúan los diferentes patrones. Concretamente, (figura 5.1.3) se distinguían bien la LPC (zona más oscura del componente 5), la PC (zona más oscura del componente 4), la SM (zona amarilla del componente 14) y el PEG (zona más brillante del componente 1).

Como el PCA resultó inconcluyente, pues no era capaz de localizar todas las clases de lípidos, se repitió el análisis empleando el algoritmo RankCompete.

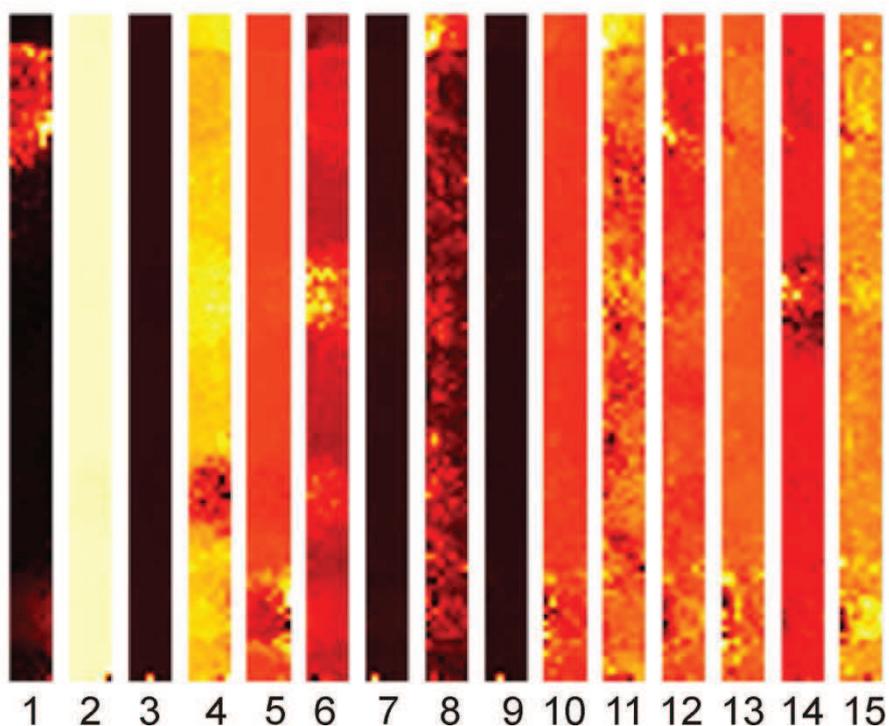


Fig 5.1.3. Los 15 primeros componentes principales del experimento.

### 5.1.3.2. Análisis por RankCompete

En este experimento, el programa fue capaz de diferenciar los grupos de espectros que se muestran en la figura 5.1.4, que coincidían espacialmente con la posición de las especies en la calle de la placa TLC analizada.



Fig 5.1.4. Separación por similitud que ha hecho el programa. Donde en Rojo está el LPC, en marrón el PC, en beige el PE, en amarillo el SM, en verde el PS y en azul el PEG.

Una vez localizados los espectros correspondientes a cada especie, fue posible obtener los espectros promedios (Figuras 5.1.5-5.1.10).

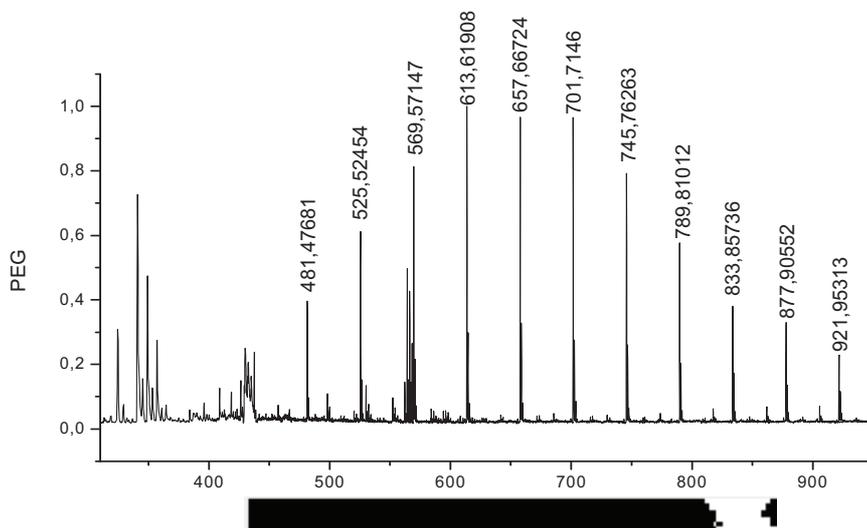


Fig 5.1.5. Espectro promedio del PEG.

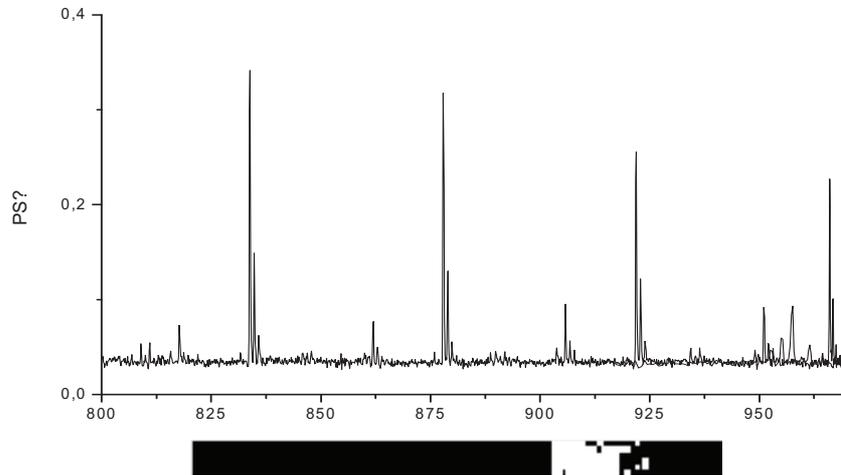


Fig 5.1.6. Espectro promedio de la PS, no se observa PS en modo positivo, de modo que el programa ha localizado en realidad una zona en la que solo ve matriz y contaminación de PEG, que probablemente se ha desplazado durante la inmersión.

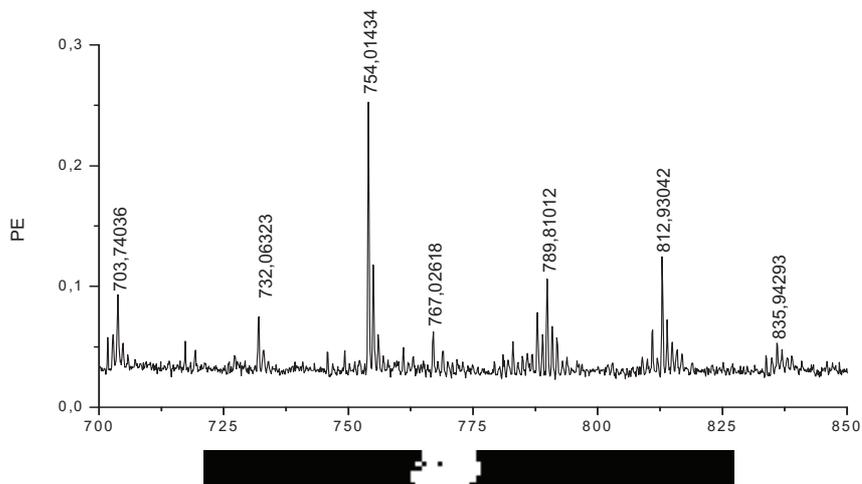


Fig 5.1.7. Espectro promedio de PE.

**CAPÍTULO 5 – RESULTADOS – 5.1. TLC IMAGING – RANKCOMPETE**

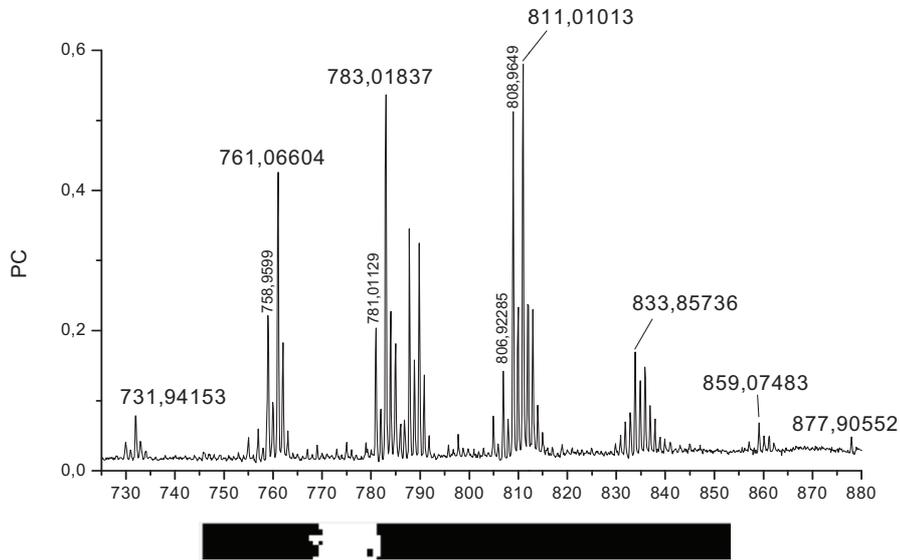


Fig 5.1.8. Espectro promedio de PC

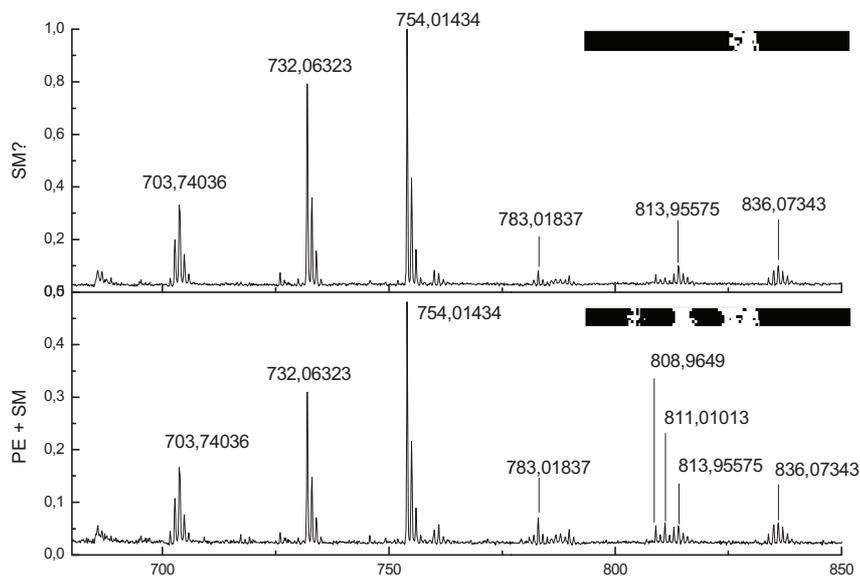


Fig 5.1.9. Espectro promedio de SM, en el inferior aparece mezclado con PE.

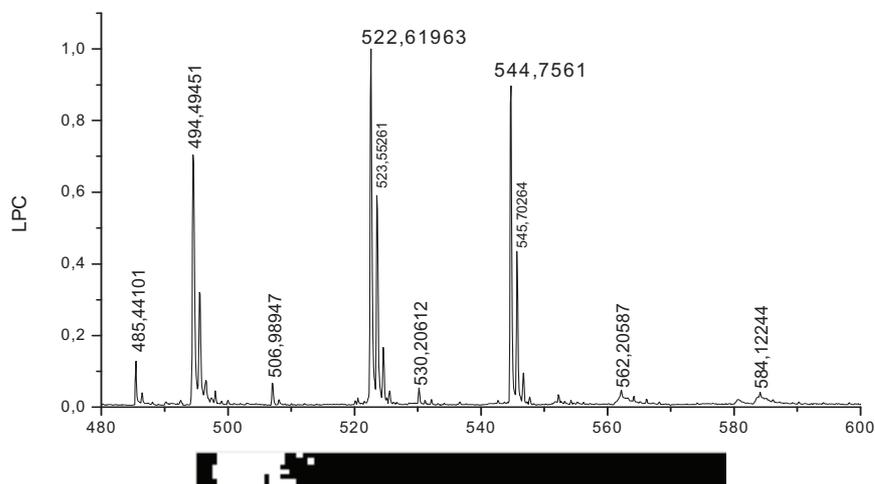


Fig 5.1.10. Espectro promedio de LPC.

Se observa que el software fue capaz de localizar y agrupar todos los tipos de muestra depositadas sobre la placa de TLC, lo cual demuestra que puede ser una herramienta muy útil a la hora de identificar especies en extractos lipídicos.

#### 5.1.4. Conclusiones

Para minimizar el desplazamiento de los lípidos por la superficie, debida a su solubilidad en el disolvente de la matriz, es recomendable sumergir la placa de TLC horizontalmente en la disolución de matriz.

El algoritmo de clústering RankCompete permite obtener una mejor distinción de las diferentes áreas de interés en experimentos en los que éstos no solapan, ya que es un algoritmo excluyente.

El software diseñado demuestra ser una herramienta útil en el estudio de los lípidos ya que permite combinar la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) con la imagen por espectrometría de masas (IMS), proporcionando una dimensión extra para la identificación de lípidos a partir de extractos. Otras pruebas con TLCs reales y preparados se incluyen en el CD de material suplementario, CD-II.1)



## CAPÍTULO 5 - RESULTADOS - 5.3. MICROARRAY DE MÚLTIPLES TEJIDOS.

Para comprobar el segundo punto, se obtuvo la imagen de una sección sagital de cerebro de rata y se obtuvo el espectro promedio de dos aéreas con diferente composición lipídica: el cortex y la médula oblonga. Paralelamente, se obtuvo el espectro promedio de los spots de membrana, correspondientes a los tejidos de esas mismas áreas y se compararon.

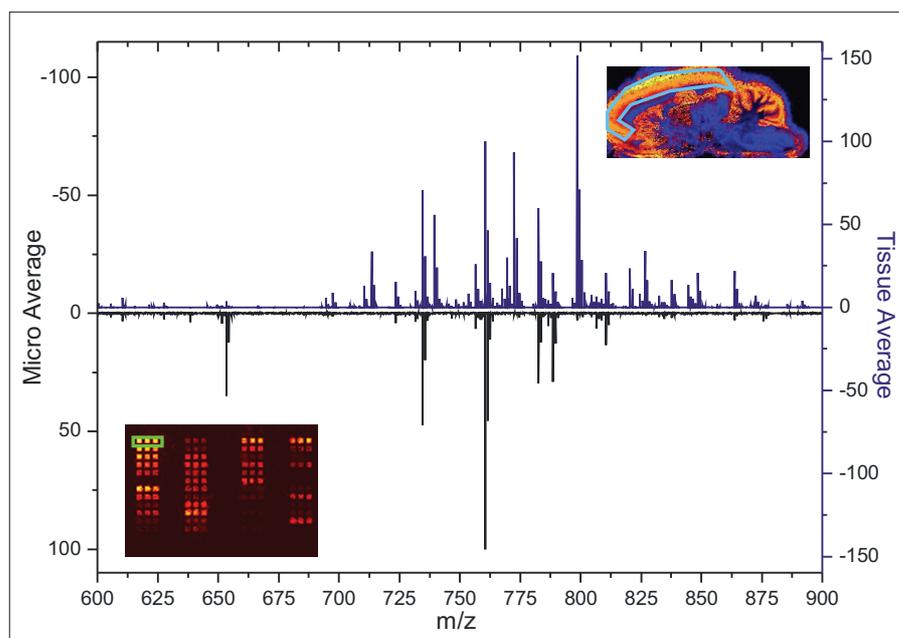


Fig 5.3.3 Comparación entre el espectro promedio de corteza de rata en tejido y en microarray de homogeneizado de membrana. La imagen muestra la localización de los spots de corteza en el array.

La figura 5.3.3 muestra la comparación entre el espectro promedio obtenido en el tejido (traza superior) y el obtenido en el microarray (traza inferior y panel insertado). A simple vista los espectros son muy diferentes. Sin embargo, tras hacer la asignación, se comprobó que estas diferencias se debían principalmente al ratio entre los diferentes aductos para cada especie, predominando las especies protonadas en el microarray mientras que en el tejido, predominaban los aductos con sodio y potasio. En la figura 5.3.4 se muestra cómo al sumar las intensidades de todos los aductos de cada especie, los espectros de corteza obtenidos sobre el tejido directamente y de los spots del array son similares y lo mismo ocurre con los espectros de médula oblonga. Además, las diferencias en la abundancia relativa de especies en corteza y médula oblonga se mantiene en el espectro obtenido del array, demostrando por un lado que la extracción de lípidos ha sido exhaustiva y por otro, que ha sido proporcional entre todas las especies detectadas, a excepción de la PC 34:1, que es significativamente más abundante en tejido, probablemente porque es el lípido estructural de membrana por excelencia. Las diferencias observadas entre los dos conjuntos de espectros (los obtenidos en tejido y los obtenidos en el array, se pueden deber a

## CAPÍTULO 5 - RESULTADOS - 5.3. MICROARRAY DE MÚLTIPLES TEJIDOS.

que mientras los espectros obtenidos directamente del tejido son de un único animal, los obtenidos del array son el promedio de diez animales.

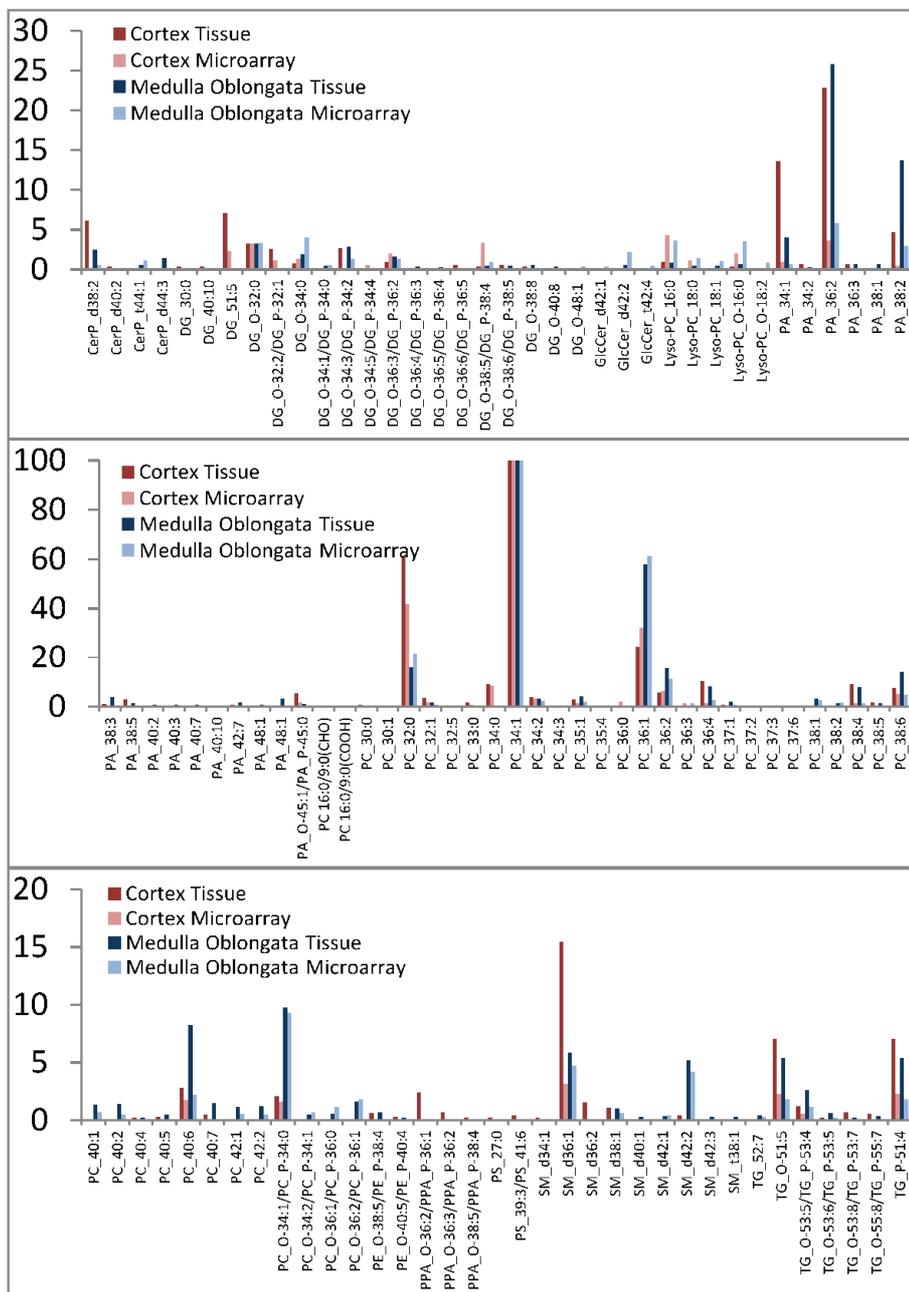


Fig 5.3.4 comparación entre las especies lipídicas detectadas en corteza y médula oblonga en arrays secciones de tejido normalizadas respecto a la PC 34:1.

## CAPÍTULO 5 - RESULTADOS - 5.3. MICROARRAY DE MÚLTIPLES TEJIDOS.

### 5.3.4. Identificación de los tejidos en el array

La simple inspección ocular de las distribuciones de lípidos en los diversos tejidos del array indica que mientras algunas de las especies están presentes en todos los tejidos, otras son específicas de un único tejido o de un número muy reducido de tejidos.

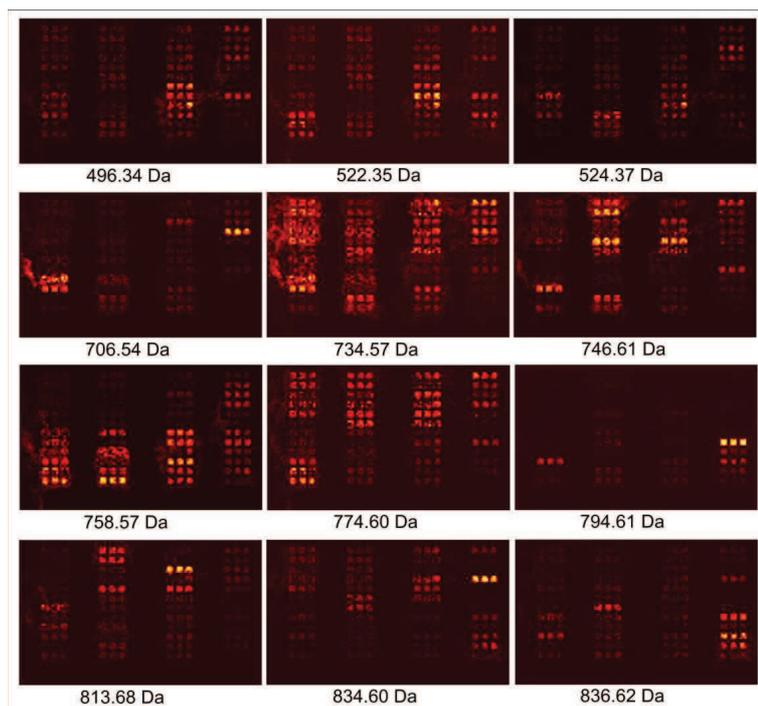


fig 5.3.5 Distribución espacial de algunos picos del microarray

Como se ve en la figura 5.3.5, en algunos experimentos se observó cierta deslocalización de algunas especies lipídicas sobre la superficie del array, pero en general los lípidos permanecieron en el spot donde fueron depositados. Experimentos posteriores demostraron que el problema de la deslocalización puede estar relacionado con la condensación de agua durante el proceso de congelación/descongelación y que se evita en parte almacenando los arrays en una atmósfera de nitrógeno.

Con objeto de realizar un análisis estadístico que confirmase la posibilidad de identificar cada tejido en función de su huella lipídica, se obtuvo el espectro promedio de cada spot/tipo de tejido, empleando el programa descrito en 4.5.2. Dado que en cada microarray hay tres réplicas por cada tejido y se midieron 5 microarrays, se dispuso de 15 replicas de cada tipo de tejido para hacer el análisis. Para eliminar ruido y maximizar la información útil de cada espectro, se diseñó un programa para alinear todos los espectros promedio, descrito en el

## **CAPÍTULO 5 - RESULTADOS - 5.3. MICROARRAY DE MÚLTIPLES TEJIDOS.**

---

punto 4.5.1, de forma que se pudiesen reducir los datos a una única lista de m/z, común a todos los tejidos.

Para poder comparar de algún modo entre distintos experimentos y tejidos fue necesario normalizar los datos (ver 4.2.3). Este paso no es trivial, ya que puede dar lugar a múltiples artefactos. En este caso, se optó por normalizar a la intensidad del pico más abundante, correspondiente a la  $[PC\ 34:1 + H]^+$ , ya que se encontraba uniformemente distribuido por todos los tejidos, pero además, como la intensidad total de los espectros puede ser un dato útil para la identificación de los tejidos, ya que es una medida directa de la cantidad total de lípidos por muestra de tejido, cada espectro se multiplicó por el TIC promedio de todas las réplicas de ese tipo de tejido..

Además, mediante la aplicación informática creada para el análisis de datos, se eliminó la lista de picos debidos a la matriz, que habían sido identificados previamente y añadidos a una base de datos y de forma aproximada los picos correspondientes a la distribución isotópica, asumiendo que las distribuciones isotópicas de los lípidos siguen un perfil muy similar.

Por último se descartaron aquellas especies cuya intensidad presentase un error respecto al promedio de ese tipo de tejido, mayor que la desviación estándar. El proceso se repitió hasta que todos los datos quedasen dentro de la desviación estándar. Una vez se tuvieron los datos procesados se procedió a hacer un análisis manual para determinar si la composición lipídica de las membranas constituía la huella digital de los tejidos.

Como se ve en la figura 5.3.6, con tan solo cuatro lípidos, es posible distinguir los tejidos del sistema nervioso central (SNC) de los del resto de tejidos, gracias a la relación que presentan entre la PC32:0 y la PC 36:2 y a la escasa abundancia de PC 34:2. Sin embargo, para poder diferenciar entre los distintos tejidos del SNC es necesario emplear un número mayor de lípidos. En la figura 5.3.8 se muestra la distribución de diez especies seleccionadas en los 14 tipos de tejidos provenientes de SNC incluidos en el microarray. Claramente, cada tejido tiene una relación única de dichas especies, o lo que es lo mismo, la abundancia de esas diez especies debería en principio permitir diferenciar entre los 14 tipos de tejido.

A pesar de los alentadores resultados mostrados en las figuras 5.3.7 y 5.3.8, no fue posible una clasificación de todos los tejidos en un mismo análisis mediante componentes principales, o algoritmos de clústering como RankCompete, como se ve en la figura 5.3.9, ya que o bien se añadían todos los picos característicos de todos los tejidos, disminuyendo la precisión en la separación al introducir demasiados picos no relevantes para algunos tejidos, o bien se seleccionaban picos que solo eran capaces de distinguir unos pocos tejidos de los demás, o se requiere de la proyección en más de tres componentes a la vez, lo que no es posible de visualizar en una superficie plana.

**CAPÍTULO 5 - RESULTADOS - 5.3. MICROARRAY DE MÚLTIPLES TEJIDOS.**

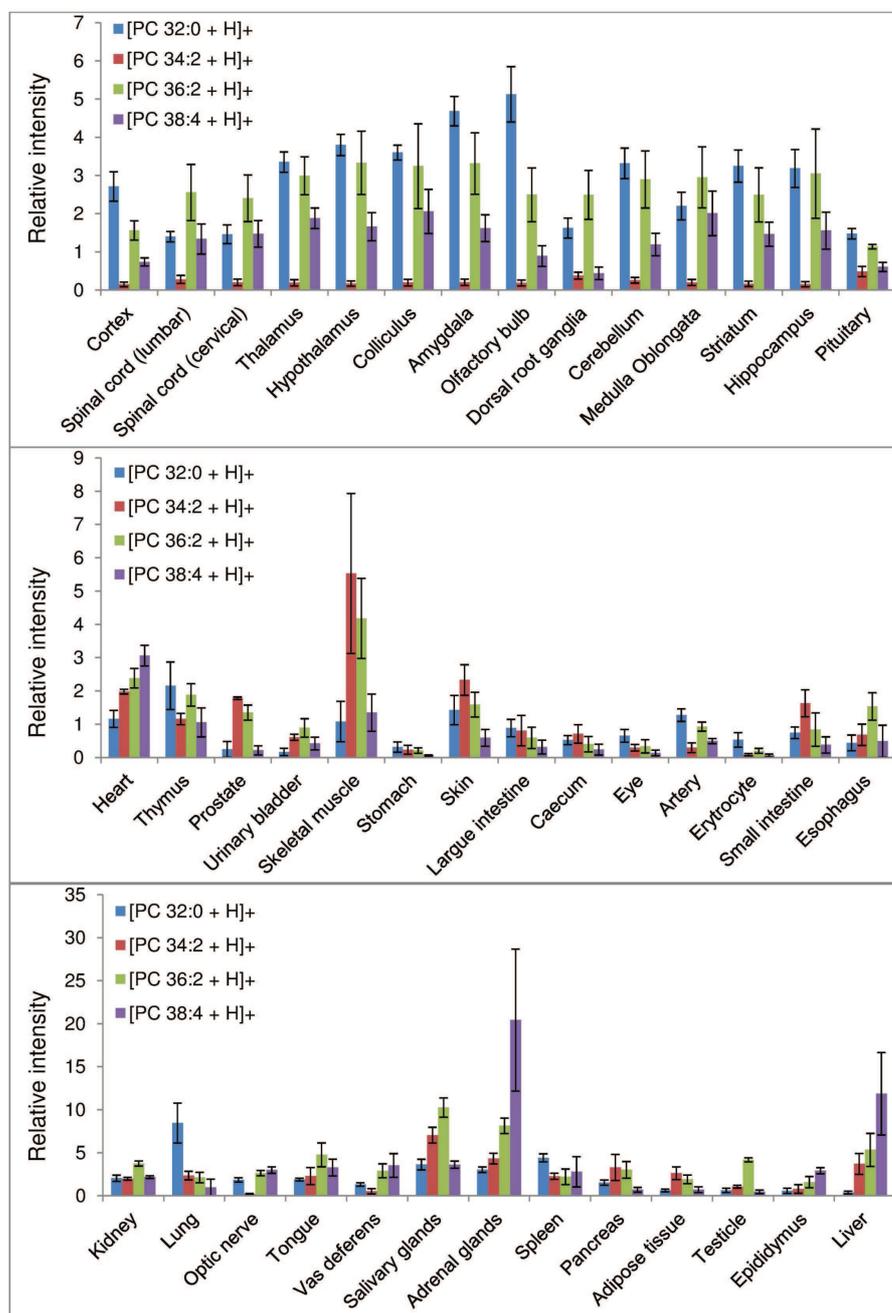


Fig 5.3.6 Comparación de la abundancia de cuatro especies seleccionadas en los tejidos del microarray. Se observa que para todos los tejidos correspondientes al sistema nervioso central, la relación entre estos cuatro picos es muy similar y al mismo tiempo muy diferente de la del resto de tejidos.

**CAPÍTULO 5 - RESULTADOS - 5.3. MICROARRAY DE MÚLTIPLES TEJIDOS.**

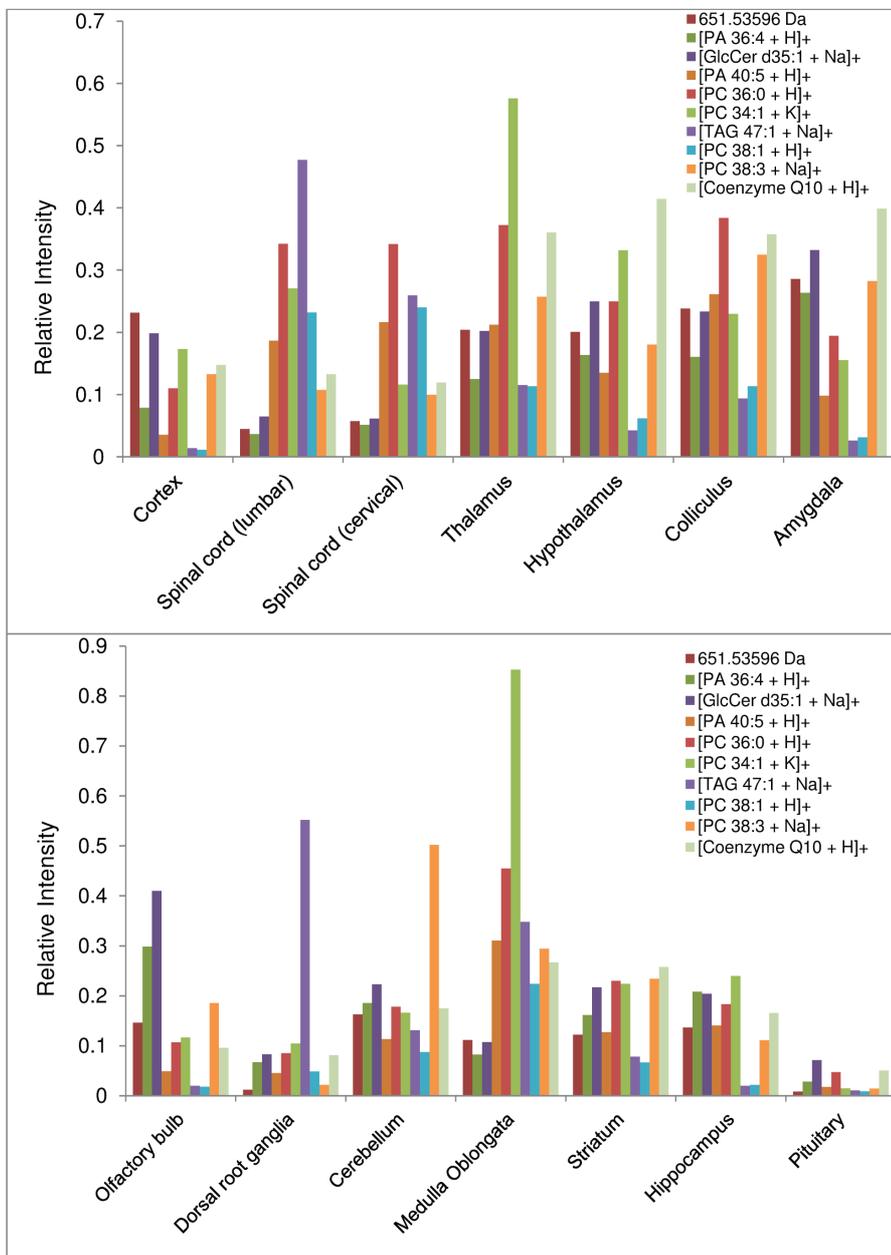


Fig 5.3.8 Comparación entre los distintos tejidos de sistema nervioso central empleando 10 picos seleccionados manualmente por su distribución espacial.

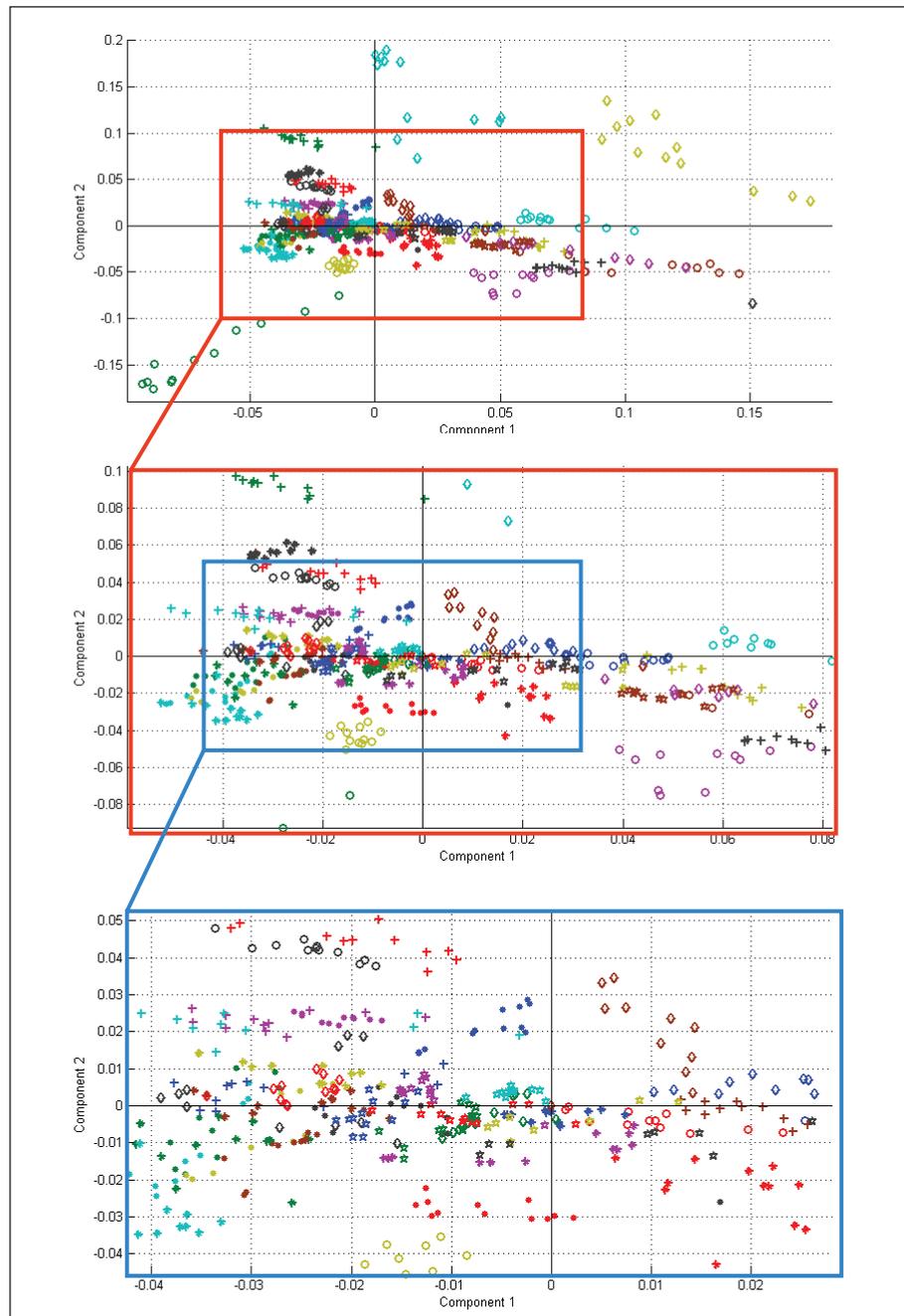


Fig 5.3.9 Análisis por componentes principales de los 48 tejidos presentes en el microarray. Probablemente se requieren tres o más componentes para la separación de todos los tejidos.

Se demuestra que es necesario hacer una selección personalizada para cada separación; es decir, no es posible obtener una buena separación de, por

## CAPÍTULO 5 - RESULTADOS - 5.3. MICROARRAY DE MÚLTIPLES TEJIDOS.

ejemplo, próstata y glándulas salivares empleando los mismos picos que para distinguir cerebelo de hígado. Se necesita por tanto un algoritmo que dependa de la naturaleza de los tejidos a separar y que contenga un árbol de decisión, de este modo, como se muestra en la figura 5.3.10, es posible diferenciar cada tejido de todos los demás.

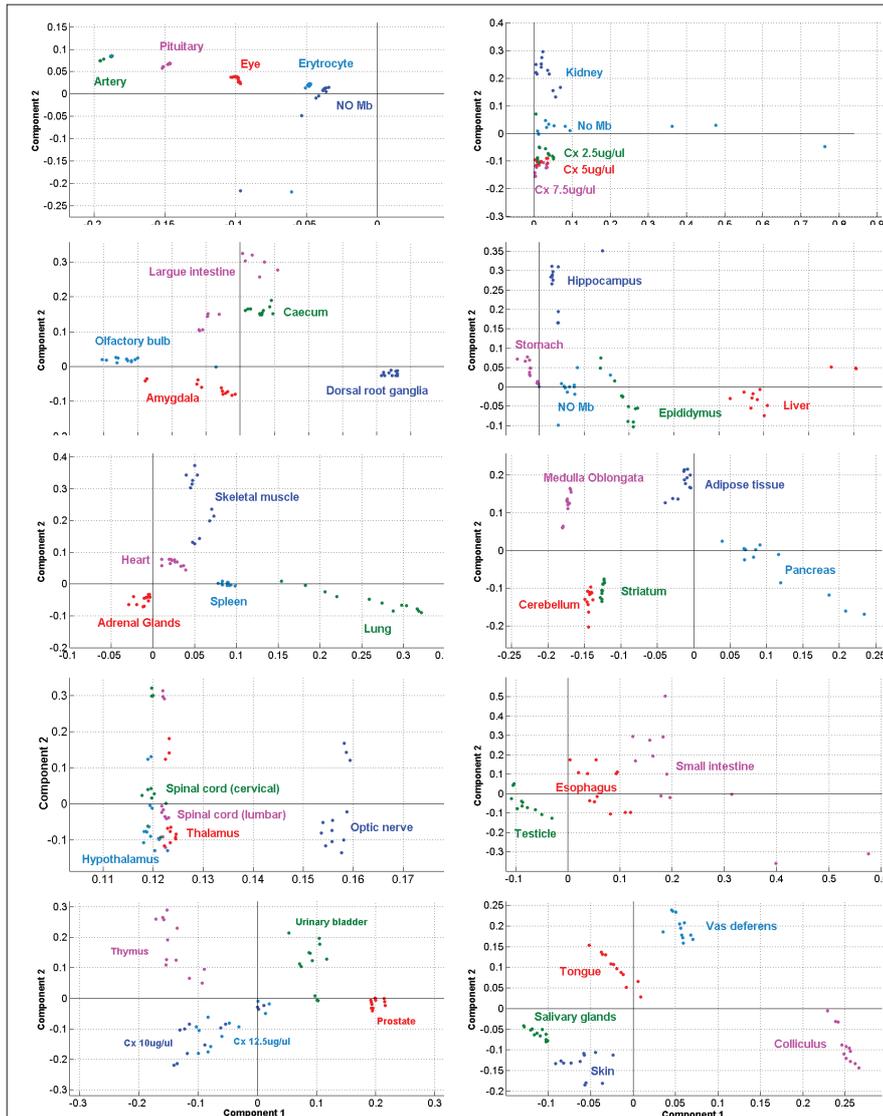


Fig 5.3.10 Análisis por componentes principales de los 48 tejidos en grupos de 5 en 5 tejidos. Para cada conjunto de 5 tejidos el programa ha seleccionado los 8 picos más adecuados con los que hacer el análisis.

El programa empleó el algoritmo RankCompete sobre todos los picos de la lista común a todos los tejidos, agrupándolos por la similitud de su distribución

## **CAPÍTULO 5 - RESULTADOS - 5.3. MICROARRAY DE MÚLTIPLES TEJIDOS.**

espacial sobre el microarray. El algoritmo permite la separación del conjunto total de picos en dos grupos que presentan las distribuciones más diferentes y a continuación separar cada grupo en dos más, de forma que para tres pasos se obtienen ocho grupos distintos, dieciséis para cuatro y así sucesivamente. El programa selecciona el pico de cada grupo que presenta una mayor varianza entre los distintos tejidos. Esta lista, de  $2^n$  picos, fue empleada posteriormente para distinguir unos tejidos de otros. De esta forma, es posible distinguir todos los tejidos, aunque en conjuntos más pequeños.

### **5.3.5. Conclusiones**

Empleando los espectros completos para hacer el PCA no es posible conseguir una buena clasificación de tejidos, ya que hay muchos picos poco reproducibles que introducen ruido estadístico en el análisis. Es necesario, por tanto hacer una buena selección de los canales másicos para hacer el análisis.

Se propone hacer una selección previa de los canales másicos más reproducibles en todas las réplicas de cada tipo de tejido. Para ello se puede calcular la desviación estándar de cada canal másico y descartar aquellos en los cuales sea superior al promedio del pico.

Con estos datos, hay que seleccionar aquellos que sean reproducibles en todos los tejidos por separado y hacer una clasificación de los canales mediante el algoritmo RankCompete, empleando la distribución espacial como dato. A continuación seleccionar el pico que presente una mayor varianza entre todos los tejidos dentro de cada grupo en el que los ha clasificado el algoritmo. Finalmente hacer un PCA con todas las réplicas de todos los tejidos.

Muchos de los tejidos quedarán bien separados pero en otros muchos casos no será fácil distinguir unos de otros, por tanto, es necesario utilizar un algoritmo iterativo sobre esos tejidos, recalculando los picos adecuados para separar tejidos concretos. Los casos más complejos pueden requerir de varias iteraciones, reduciendo el número de tejidos a clasificar en cada ocasión.

En el caso de la clasificación de un tejido problema por comparación con el resto de los tejidos en el microarray, el procedimiento debería ser similar, seleccionando en cada paso el conjunto de tejidos que más próximos queden en la representación de las dos primeras componentes principales del PCA.

En el futuro, se pretende desarrollar un programa, capaz de hacer automáticamente todas estas iteraciones, seleccionando en cada paso los grupos de tejidos que necesitan una nueva iteración para distinguirse del tejido problema hasta conseguir su correcta clasificación. Para ello, podría emplear, o bien la posición de los promedios de cada tipo de tejido, o bien el centroide de la posición de todas las réplicas de cada tejido en la representación de las dos primeras componentes principales.



**SECCIÓN 5.4.**  
**XENOGRAFOS**



## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

### 5.4. XENOGRAFOS

El injerto de xenógrafos de líneas celulares tumorales en ratas o ratones inmunodeprimidos es un modelo muy popular para el estudio del desarrollo del cáncer y para probar nuevos fármacos. Entre otros parámetros, el estudio de las variaciones en el lipidoma es un buen indicador de cambios en el metabolismo celular.

En colaboración con la universidad de las islas Baleares se analizaron por MALDI-Imaging-MS y por UHPLC-ESI-QTOF-MS<sup>E</sup> un conjunto de muestras consistentes en líneas celulares de tumores inyectadas subcutáneamente en ratas, o xenógrafos. En el caso de la línea celular A549, las ratas recibieron un tratamiento y para estas muestras el objetivo fue por tanto la búsqueda de diferencias en el lipidoma entre las muestras inyectadas en ratas control y en ratas tratadas. En el resto de líneas celulares se caracterizó el lipidoma y la distribución de las diferentes especies.

#### 5.4.1. Preparación y análisis de muestras

##### MALDI-IMS:

Las secciones de los xenógrafos se cubrieron con las matrices MBT y 9-AA empleando la técnica de sublimación descrita en el punto 2.1.2.3 del capítulo Materiales y Métodos. A continuación se midieron por MALDI-IMS, tal y como se describe en el punto 2.3.2.3 del capítulo Materiales y Métodos, utilizando los siguientes parámetros en el equipo LTQ Orbitrap XL.

Tabla 5.4.1. Muestras de xenógrafos analizadas.

Sección	Matriz	Resolución espacial ( $\mu\text{m}$ )	Modo de ionización	Energía Láser ( $\mu\text{J}$ )	Resolución en masa	Rango de masas (Da)
NCI 1.2.	MBT	150	+	17	100000	400-1200
NCI 1.2.	MBT	150	-	17	100000	300-1100
NCI 1.3.	MBT	150	+	50	100000	500-1200
NCI 1.3.	MBT	150	-	50	100000	400-1200
NCI 2.1.	MBT	100	+	10	100000	350-1200
NCI 2.1.	MBT	100	-	10	100000	500-1200
NCI 2.3.	MBT	100	+	10	100000	450-1200
NCI 2.3.	MBT	100	-	10	100000	450-1200
A549 C1 5.1	MBT	150	+	37	100000	500-1000
A549 C3 5 $\mu\text{m}$	MBT	150	+	25	100000	500-1000
A549 C2 2.2	MBT	150	+	37	100000	500-1000

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

A549 C1 3.1	MBT	100	+	10	100000	500-900
A549 C1 3.1	9AA	100	-	10	100000	200-1000
A549 C3 3.1	MBT	100	+	10	100000	500-900
A549 C3 3.1	MBT	100	-	10	100000	300-1000
A549 C1 1.1	MBT	150	+	60	60.000	480-1100
A549 C1 2.1	MBT	150	+	60	60.000	480-1100
A549 C3 1.1	MBT	150	+	60	60.000	480-1100
A549 C2 3.1	MBT	150	+	60	60.000	480-1100
A549 C2 5µm	MBT	150	+	60	60.000	480-1100
A549 T1 2.1	MBT	150	+	37	100000	500-1000
A549 T3 5µm	MBT	150	+	25	100000	500-1000
A549 T2 2.1	MBT	150	+	37	100000	500-1000
A549 T3 1.1	MBT	100	+	10	100000	500-900
A549 T3 1.1	MBT	100	-	10	100000	300-1000
A549 T3 2.1	MBT	150	+	60	60.000	480-1100
A549 T3 3.1	MBT	150	+	60	60.000	480-1100
A549 T4 1.2	MBT	150	+	60	60.000	480-1100
A549 T4 2.1	MBT	150	+	60	60.000	480-1100
A549 T4 3.1	MBT	150	+	60	60.000	480-1100
A549 T4 5µm	MBT	150	+	60	60.000	480-1100
HT29 1 1	MBT	150	+	17	100000	400-1000
HT29 1 1	MBT	150	+	17	100000	400-1100
HT29 1 2	MBT	150	+	17	100000	400-1000
HT29 1 2	MBT	150	+	17	100000	400-1100
HT29 1 3	MBT	150	+	15	100000	480-950
HT29 1 3	MBT	150	+	15	100000	550-1000
U87 1 1	MBT	150	+	17	100000	400-1000
U87 1 1	MBT	150	-	17	100000	400-1100
U87 1 3	MBT	150	+	10	100000	450-1200
U87 1 3	MBT	150	-	10	100000	450-1200
U87 2 2	MBT	200	+	15	100000	450-1600
U87 2 2	MBT	200	-	15	100000	450-1600
BX 1 2	MBT	150	+	17	100000	400-1000
BX 1 2	MBT	150	-	17	100000	400-1100
BX 1 3	MBT	150	+	15	100000	450-1600

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

BX 13	MBT	150	-	15	100000	450-1600
-------	-----	-----	---	----	--------	----------

Los datos se trataron y analizaron empleando el software dedicado (MSIAnalyst, NorayBioinformatics S. L.) seleccionando los picos cuya intensidad superaba el 1% de la intensidad máxima en el espectro promedio, realineando los espectros mediante el método Xiong<sup>1</sup> asumiendo un desalineado máximo de 0.02 Da y normalizando todos los espectros frente a su TIC tal y como se describe en el punto 3.2.3.1 del capítulo HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS PARA LIPIDÓMICA.

Se llevó a cabo un análisis multivariable de los datos con el objetivo de encontrar diferentes áreas de interés en los tejidos mediante PCA, descrito en el punto 3.4.1.1 del capítulo de HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS PARA LIPIDÓMICA, y mediante el algoritmo de clústering k-means<sup>2</sup> que incorpora el software MSIAnalyst.

Empleando una base de datos de lípidos generada en Matlab, tal y como se describe en el punto 3.5.3 del capítulo HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS PARA LIPIDÓMICA, se llevó a cabo la asignación preliminar de las posibles especies detectadas mediante MALDI-Imaging y que posteriormente se confirmaron mediante UHPLC-MS<sup>E</sup>.

### UHPLC-ESI-MS<sup>E</sup>:

Partiendo de extractos de lípidos de los xenografos de 1 mg/ml disueltos en cloroformo se prepararon alícuotas de 150 µl en cloroformo/metanol (1:2), tal y como se describe en el punto 2.2 de Materiales y métodos, que se inyectaron en la columna UHPLC acoplada al espectrómetro de masas SYNAPT G2 HDMS. Se adquirió, tal y como se explica en el punto 2.4.1.1 de Materiales y métodos mediante una función de baja energía el *full scan* o espectro de los precursores no fragmentados para cada tiempo de retención en el rango entre 50 y 1200 Da y en ambas polaridades. Por otro lado, mediante una función de alta energía con una rampa de energías de colisión, se recogieron los espectros de fragmentación de las especies en las dos polaridades.

Los datos obtenidos por UHPLC-ESI-MS<sup>E</sup> se analizaron empleando el software de identificación de lípidos SimLipid y comparando con estándares de PC, LPC, PE, PI, PA, PS, PG, DAG, TAG, SM (Avanti Polar Lipids, Inc.) y preparados de la misma forma que el extracto. Para facilitar el trabajo se redujo la lista preliminar a una sola especie por cada clase de lípido, m/z, aducto iónico formado y tiempo de retención, mediante un programa escrito en MatLab. Las tablas de asignación se incluyen en el CD de material suplementario, CD-II.4.1 al CD-II.4.10.

## **CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS**

---

### **5.4.2. Caracterización del xenografo NCI H-1975**

Podría suponerse que los xenografos, al ser líneas celulares homogéneas, presentarían una distribución también homogénea de los lípidos a lo largo del tejido. Por tanto, el estudio de la distribución espacial de los mismos mediante MALDI-IMS no debería aportar nueva información que no se pueda obtener por UHPLC-ESI-MS. Sin embargo, al haber sido inyectados en un animal, es posible que zonas del xenografo en distinto estado metabólico presenten diferencias o incluso que haya zonas de tejido lipídico procedentes del animal huésped. Para ello, en este estudio, se eligió uno de los xenografos, el de adenocarcinoma de pulmón humano, NCI H-1975, y se caracterizó por MALDI-Imaging-MS y por UHPLC-ESI-MS<sup>E</sup> simultáneamente para comprobar las diferencias entre ambas técnicas.

En este apartado, se midieron por MALDI-IMS las muestras NCI 1.2, NCI 1.3, NCI 2.1, y NCI 2.3 todas en modo de ionización positivo y negativo tal y como se describe en la tabla 5.4.1 y por UHPLC-ESI-MS<sup>E</sup> un extracto lipídico del mismo tipo de xenografo.

#### **5.4.2.1. Resultados**

Como se observa en la figura 5.4.1, en la que se muestra la distribución de algunos canales másicos en el xenografo NCI 2.1, existen tres distribuciones o áreas de interés dentro del tejido. Por tanto se confirma que, pese a tratarse de un tejido homogéneo, las líneas celulares inyectadas en el huésped evolucionan formando diferentes zonas con distinta composición.

Empleando k-means, ver figura 5.4.2, y PCA se definieron las tres áreas de interés en todos los cortes y se obtuvieron los espectros promedio para su análisis. Se observa que el clúster 3 representa todo el borde exterior del xenógrafo. En él la intensidad general es mucho más baja que en el resto de clústeres y hay una mayor presencia de triacilgliceroles (TAG) lo que indica que este área corresponde a una película de tejido conectivo formada por el huésped para protegerse del tejido extraño. Las otras dos áreas, cabía esperar que se correspondieran con tejido vascularizado y con tejido necrótico dentro del tumor.

**CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS**



*Fig 5.4.1. Distribución espacial de algunos canales máxicos en modo de ionización positivo para la muestra NCI 2.1.*

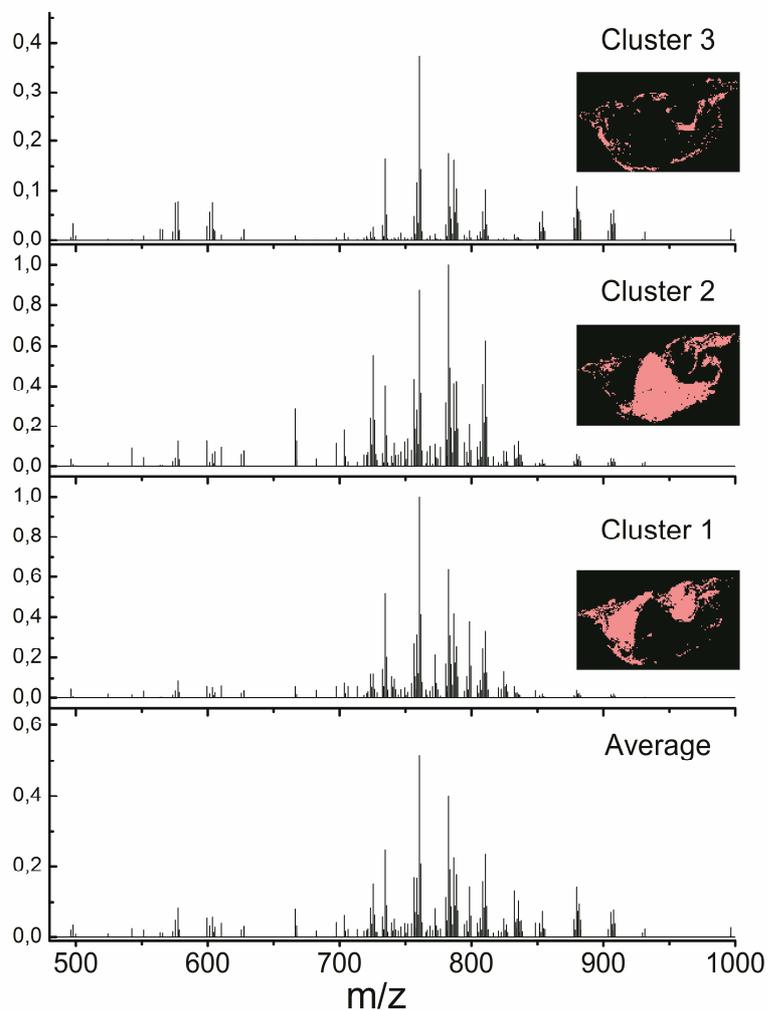


Fig 5.4.2. Comparación entre los espectros promedio de las tres áreas de interés y el promedio total para el corte NCI2.1.

La matriz empleada, MBT, tiene unas características óptimas para el modo de ionización positivo, pero no tiene un comportamiento óptimo en negativo. Por ello el número de especies detectadas en modo de ionización negativo es menor que en modo de ionización positivo, donde se detectan muchos PCs, LPCs, SMs, DAGs y TAGs. Es habitual que la variedad de clases de lípidos detectados en modo de ionización negativo sea mayor, detectándose PAs, PEs, PGs, PSs, Pls o sulfátidos entre otros. Sin embargo parece que gran parte de estas especies no están presentes con la suficiente abundancia como para ser detectadas en un experimento MALDI-IMS con MBT como matriz.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

En UHPLC-ESI-MS, a diferencia de MALDI-MS, se introduce una fase de separación previa a la espectrometría de masas: una columna de cromatografía que separa las distintas clases de lípidos por su polaridad, obteniendo tiempos de retención distintos en función de su clase, como se ve en la figura 5.4.3. Esto facilita la identificación de las especies, ya que, comparando con los tiempos de retención de los estándares, es posible saber a qué clase de lípido pertenece cada especie detectada por espectrometría de masas. Además, al hacer el espectro sobre cada clase de lípido por separado es posible, por un lado ganar mayor sensibilidad para especies que en MALDI-MS quedaban suprimidas en presencia de iones mucho más abundantes y por otro hacer espectros de fragmentación más precisos en los que la molécula precursora esté mejor aislada y permitiendo la detección aislada de varias especies isobáricas en caso de haberlas.

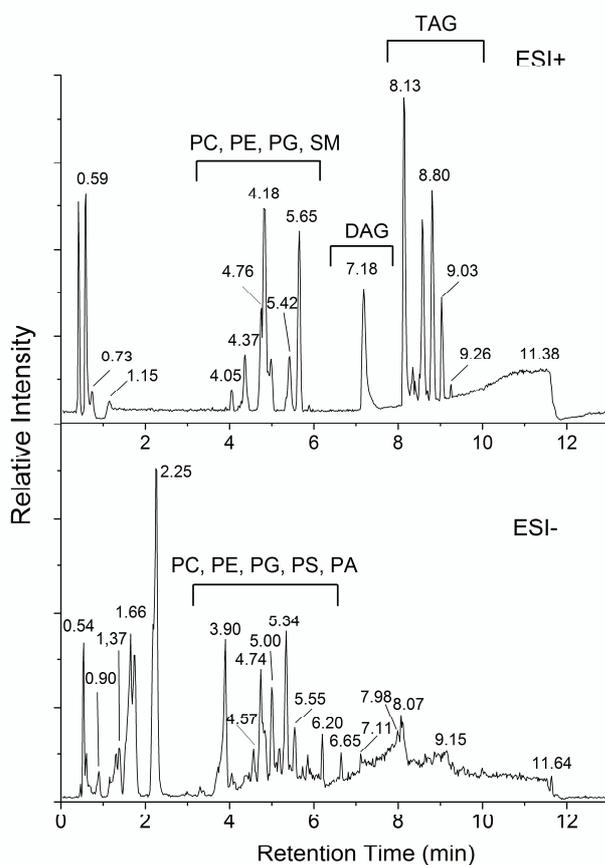


Fig 5.4.3. Cromatograma UHPLC-MS de lípidos de un extracto del xenografo NCI H-1975 en modo de ionización positivo, arriba, y negativo, debajo.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

A continuación, en las tablas de la 5.4.2 a la 5.4.10, se muestran las asignaciones de las especies detectadas en MALDI y en ESI, así como los aductos que han formado al ionizarse por una u otra técnica.

**Tabla 5.4.2. Comparación entre las especies de PCs detectadas por MALDI y ESI. "/" entre dos especies significa que ambas tienen la misma m/z, "," separa varios aductos de la misma especie y los subíndices de números entre paréntesis indican a cuál de los tres clústeres que se muestran en la figura 5.4.2 corresponde su distribución espacial.**

Especies	Aductos		Estructura tentativa
	MALDI	ESI	
30:0	+ H <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	PC(14:0/16:0)/ PC(16:0/14:0)
O-32:1	+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+ H <sup>+</sup>	
32:1	+ H <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	PC(16:0/16:1)
O-32:0	+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+ H <sup>+</sup>	
32:0	+ H <sup>+</sup> <sub>(1+2)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> <sup>a</sup>	+ H <sup>+</sup> , + Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	PC(16:0/16:0)
33:1	+ H <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup> , + Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	
O-34:2/P-34:1	+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> / + H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+ H <sup>+</sup> / + H <sup>+</sup>	
P-34:0	+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+ H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	PC(P-16:0/18:0)
34:2	+ H <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2+3)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> <sup>b</sup>	+ H <sup>+</sup> , + Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	PC(16:0/18:2)
34:1	+ H <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup> , + Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	PC(16:0/18:1)
34:0	+ H <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup> , + Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	PC(16:0/18:0)
O-36:5/P-36:4	+ H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2+3)</sub> / + H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> / + Na <sup>+</sup> <sub>(2+3)</sub>	+ H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> / + H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	
O-36:4/P-36:3	+ H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> / + H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+ H <sup>+</sup> / + H <sup>+</sup>	
O-36:3/P-36:2	+ H <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> / + H <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ H <sup>+</sup> / + H <sup>+</sup>	
O-36:2/P-36:1	+ H <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> , +Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>c</sup> / + H <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> , +Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>c</sup>	+ H <sup>+</sup> / + H <sup>+</sup>	
O-36:1	+ Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>d</sup>		
36:4	+ H <sup>+</sup> <sub>(2+3)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup> , + Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	PC(16:0/20:4)
36:3	+ H <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2+3)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup> , + Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	PC(16:0/20:3)
36:2	+ H <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup> , + Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	PC(18:0/18:2)
36:1	+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2+3)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup> , + Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	PC(18:0/18:1)
O-38:5/P-38:4	+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> / + H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	+ H <sup>+</sup> / + H <sup>+</sup>	
O-38:4/P-38:3	+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> / + H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+ H <sup>+</sup> / + H <sup>+</sup>	
38:6	+ K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup>	
38:5	+ H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	PC(16:0/22:5)
38:4	+ H <sup>+</sup> <sub>(2+3)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>	+ H <sup>+</sup> , + Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	PC(16:0/22:4)
38:3	+ H <sup>+</sup> <sub>(1+2)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	PC(18:0/20:3)
38:2	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>		
40:6	+ H <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ H <sup>+</sup>	

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

40:5	+ H <sup>+</sup> (3)	
40:4	+ H <sup>+</sup>	PC(18:0/22:4)

<sup>a</sup> Coincide con: [PE (O-38:6) + Na]<sup>+</sup>

<sup>b</sup> Coincide con: [PE (P-40:7) + H]<sup>+</sup>/[PE-NMe (36:2) + K]<sup>+</sup>/[PE (37:2) + K]<sup>+</sup>

<sup>c</sup> Asignación alternativa: [PE (P-39:1) + Na]<sup>+</sup>

<sup>d</sup> Asignación alternativa: [PE (O-39:1) + Na]<sup>+</sup>/[PE (P-39:0) + Na]<sup>+</sup>

Sorprendentemente, como se muestra en la tabla 5.4.2 se pudieron asignar más especies de PC en MALDI-MS que en ESI-MS: 29 frente a 27, probablemente debido al excelente comportamiento de la matriz MBT en la detección de glicerofosfolípidos en modo de ionización positivo.

**Tabla 5.4.3. Comparación entre las especies de PEs detectadas por MALDI y ESI. “/” entre dos especies significa que ambas tienen la misma m/z, “,” separa varios aductos de la misma especie y los subíndices de números entre paréntesis indican a cuál de los tres clústeres que se muestran en la figura 5.4.2 corresponde su distribución espacial.**

Especies	Aductos		Estructura tentativa
	IMS	ESI	
PE-NMe <sub>2</sub> (34:1)		+AcO <sup>-</sup>	
PE-NMe <sub>2</sub> (32:0)/34:0	-H <sup>+</sup> (2)/-H <sup>+</sup> (2)	-H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> /-H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	
O-34:4/P-34:3	+ Na <sup>+</sup> (2)		
P-34:2		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(P-16:0/18:2)
P-34:1		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(P-16:0/18:1)
34:1		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(16:0/18:1)
35:2		+AcO <sup>-</sup>	
35:0	+ Na <sup>+</sup> (1+2+3)	+AcO <sup>-</sup>	
P-36:4		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(P-16:0/20:4)
P-36:2		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(P-18:0/18:2)
P-36:1		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(P-18:0/18:1)
36:3/34:0	+ H <sup>+</sup> (1)/+ Na <sup>+</sup> (1)	-H <sup>+</sup> /-H <sup>+</sup>	
36:2	-H <sup>+</sup> (2)	-H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	PE(18:0/18:2)
36:1	-H <sup>+</sup> (2)	+H <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	PE(18:0/18:1)
37:4/35:1	+ H <sup>+</sup> (3)/+ Na <sup>+</sup> (3)	+AcO <sup>-</sup> /+AcO <sup>-</sup>	
O-38:6	Na <sup>+</sup> (1) <sup>a</sup>	-H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(O-16:0/22:6)
P-38:6		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(P-16:0/22:6)
		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup> /+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(P-18:0/20:4)/ PE(P-16:0/22:4)
P-38:4			PE(16:0/22:6)
38:6		-H <sup>+</sup>	PE(18:0/20:4)
38:4		+ H <sup>+</sup> , + Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	
38:2/ PE-NMe <sub>2</sub> (36:2)	-H <sup>+</sup> (2)/-H <sup>+</sup> (2)	+AcO <sup>-</sup> /+AcO <sup>-</sup>	
38:1	-H <sup>+</sup> (1+2)	+AcO <sup>-</sup>	
O-39:1/P-39:0	+ Na <sup>+</sup> (2) <sup>d</sup> /+ Na <sup>+</sup> (2) <sup>d</sup>		
P-39:1	+ Na <sup>+</sup> (2) <sup>b</sup>		
O-40:6		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(O-18:0/22:6)
P-40:7	+ Na <sup>+</sup> (1) <sup>c</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(P-18:1/22:6)
P-40:6		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(P-18:0/22:6)
P-40:4		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(P-18:0/22:4)
40:6		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(18:0/22:6)
40:4	+ H <sup>+</sup> (2)	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PE(18:0/22:4)
41:2	+ Na <sup>+</sup> (2+3)		

<sup>a</sup> Coincide con: [PC 32:0) + K]<sup>+</sup>

<sup>b</sup> Asignación alternativa: [PC (O-36:2) + Na]<sup>+</sup>

<sup>c</sup> Coincide con: [PC (34:2) + K]<sup>+</sup>

<sup>d</sup> Asignación alternativa: [PC (O-36:1) + Na]<sup>+</sup>

Debido a la naturaleza de la matriz, la mayor parte de las PEs detectadas en MALDI-MS lo fueron en modo de ionización positivo, lo que es inusual, ya que las PEs se detectan mejor en modo de ionización negativo.<sup>3,4</sup> Sin embargo, en ESI-

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

MS, además de en modo de ionización positivo, casi todas las especies se detectan también en modo de ionización negativo.

Se observa una anormal cantidad de éteres de PCs y PEs, ya que mientras que en la literatura<sup>5</sup> se describe una contribución de un 1% al número total de PCs detectadas en pulmón, en este trabajo se detecta un 13% principalmente localizados en el clúster 2. Similares cantidades de plasmalogenos se describen en otros trabajos sobre líneas celulares de adenocarcinoma de colon,<sup>6</sup> de glioma maligno<sup>7</sup> y en pacientes con cáncer de mama, pulmón y próstata.<sup>8</sup> Por tanto, esta abundancia de plasmalogenos podría ser característica de la presencia de tumores, abriendo la puerta a la identificación de biomarcadores lipidos.

**Tabla 5.4.4. Comparación entre las especies de PIs detectadas por MALDI y ESI. "/" entre dos especies significa que ambas tienen la misma m/z, "," separa varios aductos de la misma especie y los subíndices de números entre paréntesis indican a cuál de los tres clústeres que se muestran en la figura 5.4.2 corresponde su distribución espacial.**

Especies	Aductos		Estructura tentativa
	IMS	ESI	
P-28:0	+ H <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> <sup>a</sup>		
P-30:1	+ H <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> <sup>b</sup>		
O-30:1/P-30:0	+ H <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> <sup>c</sup> , + Na <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> <sup>d</sup>		
34:2	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	-H <sup>+</sup>	PI(16:0/18:2)/ PI(18:2/16:0)
34:1	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	-H <sup>+</sup>	PI(16:0/18:1)/ PI(18:1/16:0)
36:4	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	-H <sup>+</sup>	PI(16:0/20:4)/ PI(20:4/16:0)
36:3	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>		
36:2	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	-H <sup>+</sup>	PI(18:0/18:2)/ PI(18:2/18:0)
36:1	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	-H <sup>+</sup>	PI(18:0/18:1)
38:5	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	-H <sup>+</sup>	
38:4	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	-H <sup>+</sup>	PI(18:0/20:4)
38:3	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	-H <sup>+</sup>	PI(20:3/18:0)/ PI(18:0/20:3)
40:6	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	-H <sup>+</sup>	PI(18:2/22:4)
40:5	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	-H <sup>+</sup>	
40:4	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>	-H <sup>+</sup>	PI(22:4/18:0)/ PI(18:0/22:4)

<sup>a</sup> Asignación alternativa: [PA (38:5) + K]<sup>+</sup>

<sup>b</sup> Asignación alternativa: [PA (38:3) + K]<sup>+</sup>

<sup>c</sup> Asignación alternativa: [PA (38:2) + K]<sup>+</sup>

<sup>d</sup> Asignación alternativa: [PA (40:5) + K]<sup>+</sup>

Como cabe esperar, las PIs dominan el espectro en modo de ionización negativo empleando ambas técnicas.

**Tabla 5.4.5. Comparación entre las especies de PAs detectadas por MALDI y ESI. "/" entre dos especies significa que ambas tienen la misma m/z, "," separa varios aductos de la misma especie y los subíndices de números entre paréntesis indican a cuál de los tres clústeres que se muestran en la figura 5.4.2 corresponde su distribución espacial.**

Especies	Aductos		Estructura tentativa
	IMS	ESI	
O-33:0	+ H <sup>+</sup> <sub>(2+3)</sub>		
34:1	-H <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>		
O-36:3/P-36:2	+ Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>a</sup> /+ Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>a</sup>		
O-36:2/P-36:1	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> <sup>b</sup> /+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> <sup>b</sup>		
O-36:1/ P-36:0	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2)</sub>		
O-36:0	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2)</sub>		
36:4	+ H <sup>+</sup> /		
36:3	+ K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> , + Na <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub>		

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

36:2	-H <sup>+</sup> <sub>(1+2)</sub> , + K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>		
36:2	+ Na <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>		
36:1	-H <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>		
36:1/38:4	+ Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> /+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>		
37:0	+ K <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>d</sup>		
O-38:6/P-38:5	+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>a</sup> /+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>a</sup>		
O-38:5/P-38:4	+ H <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> <sup>b</sup> , + Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> <sup>c</sup> /+ H <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> <sup>b</sup> , + Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> <sup>c</sup>		
38:6	+ H <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> <sup>e</sup>		
38:5	+ H <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> <sup>f</sup> , + K <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> <sup>e</sup>		
38:3	+ K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> <sup>f</sup> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>h</sup>		
38:2	+ K <sup>+</sup> <sub>(1)</sub> <sup>g</sup> , + Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>i</sup>		
O-40:6/P-40:5	+ Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>d</sup> /+ Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>d</sup>		
O-40:1/P-40:0	+ K <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> <sup>h</sup> /+ K <sup>+</sup> <sub>(1+2+3)</sub> <sup>h</sup>		
40:6	+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>h</sup>		
40:5	+ H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>i</sup>		
40:5	+ K <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>j</sup>		
42:4		-H <sup>+</sup>	PA(22:0/20:4)
43:6		-H <sup>+</sup>	PA(21:0/22:6)
43:4			
44:5		-H <sup>+</sup>	PA(22:1/22:4)/ PA(22:4/22:1)

<sup>a</sup> Asignación alternativa: [DG (40:6) + K]<sup>+</sup>

<sup>b</sup> Asignación alternativa: [DG (40:5) + K]<sup>+</sup>

<sup>c</sup> Asignación alternativa: [DG (42:8) + K]<sup>+</sup>

<sup>d</sup> Asignación alternativa: [DG (44:9) + K]<sup>+</sup>

<sup>e</sup> Asignación alternativa: [PI (P-28:0) + Na]<sup>+</sup>

<sup>f</sup> Asignación alternativa: [PI (P-30:1) + H]<sup>+</sup>

<sup>g</sup> Asignación alternativa: [PI (O-30:1) + H]<sup>+</sup>/[PI (P-30:0) + H]<sup>+</sup>

<sup>h</sup> Asignación alternativa: [TG (42:6) + K]<sup>+</sup>

<sup>i</sup> Asignación alternativa: [TG (42:5) + K]<sup>+</sup>

<sup>j</sup> Asignación alternativa: [PI (O-30:1) + Na]<sup>+</sup>/[PI (P-30:0) + Na]<sup>+</sup>

Entre las especies minoritarias, PAs, PGs y PSs, las PAs son las únicas que parecen detectarse en una cantidad significativa. No obstante, si se observa la tabla 5.4.5, se aprecia que ninguna de las especies asignadas en MALDI-MS se detecta y se identifica en ESI-MS, además, muchas de las asignaciones en MALDI-MS presentan otra posible asignación, todo esto sugiere tomar con precaución estas asignaciones.

**Tabla 5.4.6. Comparación entre las especies de PGs detectadas por MALDI y ESI. "/" entre dos especies significa que ambas tienen la misma m/z, "," separa varios aductos de la misma especie y los subíndices de números entre paréntesis indican a cuál de los tres clústeres que se muestran en la figura 5.4.2 corresponde su distribución espacial.**

Especies	Aductos		Estructura tentativa
	IMS	ESI	
P-32:1		+ AcO <sup>-</sup>	
32:0		+H <sup>+</sup>	PG(16:0/16:0)
O-34:2/P-34:1		+ AcO <sup>-</sup> /+ AcO <sup>-</sup>	
O-34:1/P-34:0	+K <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>		
O-34:0		+ AcO <sup>-</sup>	
34:1		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	PG(16:0/18:1)
34:0		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	PG(16:0/18:0)/ PG(18:0/16:0)
36:2		-H <sup>+</sup>	
36:1		+H <sup>+</sup>	PG(18:0/18:1)
41:0	+H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>a</sup>		

<sup>a</sup> Asignación alternativa: [TG (49:5) + Na]<sup>+</sup>

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

Tabla 5.4.7. Comparación entre las especies de PSs detectadas por MALDI y ESI. "/" entre dos especies significa que ambas tienen la misma  $m/z$ , "," separa varios aductos de la misma especie y los subíndices de números entre paréntesis indican a cuál de los tres clústeres que se muestran en la figura 5.4.2 corresponde su distribución espacial.

Especies	Aductos		Estructura tentativa
	IMS	ESI	
34:0	+Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>		
36:3	+H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>		
36:2	+H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	-H <sup>+</sup>	PS(18:0/18:2)
36:1	-H <sup>+</sup> <sub>(1)</sub>		
38:4		-H <sup>+</sup>	PS(18:1/20:3)
38:3		-H <sup>+</sup>	PS(18:1/20:2)/ PS(20:2/18:1)
42:8		-H <sup>+</sup>	

Al igual que en las PAs, en las PGs y en las PSs, las especies detectadas en MALDI-MS no se corresponden con las identificadas en ESI-MS, por tanto es mejor considerar estas asignaciones como algo provisional además de dudoso.

Tabla 5.4.8. Comparación entre las especies de SMs detectadas por MALDI y ESI. "/" entre dos especies significa que ambas tienen la misma  $m/z$ , "," separa varios aductos de la misma especie y los subíndices de números entre paréntesis indican a cuál de los tres clústeres que se muestran en la figura 5.4.2 corresponde su distribución espacial.

Especies	Aductos		Estructura tentativa
	IMS	ESI	
34:2	+Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+H <sup>+</sup>	SM(d16:1/18:1)/ SM(d18:1/16:1)/ SM(d18:2/16:0)
34:1	+H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , +Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , +K <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	SM(d18:1/16:0)
34:0	+H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , +Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+H <sup>+</sup>	SM(d18:0/16:0)
36:1	+Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+H <sup>+</sup>	SM(d18:0/18:1)
40:0	+Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>		
40:1	+Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+H <sup>+</sup>	SM(d18:1/22:0)
42:3	+H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , +Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+H <sup>+</sup>	SM(d18:2/24:1)
42:2	+H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , +Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+H <sup>+</sup>	SM(d18:1/24:1)/ SM(d18:2/24:0)
42:1	+H <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> , +Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub>	+H <sup>+</sup>	SM(d18:1/24:0)/ SM(d18:0/24:1)
42:0		+H <sup>+</sup>	SM(d18:0/24:0)

En las SMs detectadas, existe un buen acuerdo entre MALDI-MS y ESI-MS. Además, todas las detectadas en ESI-MS tienen la suficiente intensidad como para permitir identificar sus cadenas acílicas mediante fragmentación. Es particularmente llamativo el hecho de que todas las SMs detectadas en MALDI-MS poseen la distribución espacial correspondiente al clúster número 2.

Tabla 5.4.9. Comparación entre las especies de DAGs detectadas por MALDI y ESI. "/" entre dos especies significa que ambas tienen la misma  $m/z$ , "," separa varios aductos de la misma especie y los subíndices de números entre paréntesis indican a cuál de los tres clústeres que se muestran en la figura 5.4.2 corresponde su distribución espacial.

Especies	Aductos	
	IMS	ESI
P-32:1	+Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+H <sup>+</sup>
30:0		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
32:0		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
34:3	+Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	
O-34:1	+Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+Na <sup>+</sup>
34:1		+Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

36:4		+ H <sup>+</sup>
36:2		+ K <sup>+</sup>
36:1		+ K <sup>+</sup>
40:7/38:4		+ H <sup>+</sup> /+Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
40:6	+ K <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>a</sup>	
40:5	+ K <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>b</sup>	
42:8	+ K <sup>+</sup> <sub>(3)</sub> <sup>c</sup>	
44:9	+ K <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>d</sup>	

<sup>a</sup> Asignación alternativas: [PA (O-38:6) + H]<sup>+</sup>/[PA (P-38:5) + H]<sup>+</sup>/[PA (O-36:3) + Na]<sup>+</sup>/[PA (P-36:2) + Na]<sup>+</sup>

<sup>b</sup> Asignación alternativas: [PA (O-38:5) + H]<sup>+</sup>/[PA (P-38:4) + H]<sup>+</sup>/[PA (O-36:2) + Na]<sup>+</sup>/[PA (P-36:1) + Na]<sup>+</sup>

<sup>c</sup> Asignación alternativas: [PA (O-38:5) + Na]<sup>+</sup>/[PA (P-38:4) + Na]<sup>+</sup>

<sup>d</sup> Asignación alternativas: [PA (37:0) + K]<sup>+</sup>/[PA (O-40:6) + Na]<sup>+</sup>/[PA (P-40:5) + Na]<sup>+</sup>

**Tabla 5.4.10. Comparación entre las especies de TAGs detectadas por MALDI y ESI. “/” entre dos especies significa que ambas tienen la misma m/z, “,” separa varios aductos de la misma especie y los subíndices de números entre paréntesis indican a cuál de los tres clústeres que se muestran en la figura 5.4.2 corresponde su distribución espacial.**

Especies	Aductos	
	IMS	ESI
42:6	+ K <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>a</sup>	
42:5	+ K <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>b</sup>	
46:1		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
46:0		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
48:3		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
48:2		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
48:1		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
49:5	+ Na <sup>+</sup> <sub>(2)</sub> <sup>c</sup>	
49:2		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
49:1		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
49:0		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
50:4		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
50:3	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
50:2	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
50:1	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
50:0	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
51:3		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
51:2		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
51:1		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
51:0		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
52:6		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
52:5		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
52:4	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
52:3	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
52:2	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
52:1	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
52:0	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
53:4		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
53:3		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
53:2		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
53:1		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
54:7		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
54:6		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
54:5	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
54:4	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
54:3	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
54:2	+ Na <sup>+</sup> <sub>(3)</sub>	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
54:1		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
54:0		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
55:5		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
55:4		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
55:3		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
55:2		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

56:8		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
56:7	+ Na <sup>+</sup> (3)	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
56:6	+ Na <sup>+</sup> (3)	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
56:5	+ Na <sup>+</sup> (3)	+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
56:4		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
56:3		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
56:2		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
56:1		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
56:0		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
58:10		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
58:9		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
58:8	+ Na <sup>+</sup> (2)	+ Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
58:7		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
58:6		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
58:5		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
58:4		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
58:3		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
58:2		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
58:1		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
59:6		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
60:11		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
60:10		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
60:9		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
60:8		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
60:7		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
60:5		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
60:4		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
60:3		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
60:2		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + K <sup>+</sup>
60:1		+ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>

<sup>a</sup> Asignación alternativa: [PA (40:6) + H]<sup>+</sup>/[PA (38:3) + Na]<sup>+</sup>

<sup>b</sup> Asignación alternativa: [PA (40:5) + H]<sup>+</sup>/[PA (38:2) + Na]<sup>+</sup>

<sup>c</sup> Asignación alternativa: [PG (P-41:0) + H]<sup>+</sup>

Tanto en ESI-MS como en MALDI-MS se detecta una gran cantidad de TAGs en comparación con las DAGs, de las cuales muchas de las asignaciones en MALDI-MS son, cuanto menos, dudosas. Particularmente en ESI-MS se detectan muchas más TAGs, pero de las detectadas mediante MALDI-MS casi todas se hallan presentes en el clúster número 3, que correspondería al tejido conectivo y adiposo que ha formado el animal alrededor del tejido tumoral.

Un examen cuidadoso de la distribución espacial de cada especie identificada en las tablas pone de manifiesto que hay lípidos que se distribuyen por todo el tejido, mientras que otros se encuentran exclusivamente en el clúster 1. Además, en este clúster se localizan preferencialmente los aductos de potasio. Estudios previos en secciones de modelos de lesión en cerebro de rata<sup>9</sup> encontraron una mayor abundancia de aductos de Na<sup>+</sup> en las áreas dañadas del cerebro y lo interpretan como un cambio en la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.

### 5.4.2.2. Conclusiones

Al estudiar la composición lipídica del xenografo de adenocarcinoma de pulmón humano, NCI H-1975, mediante MALDI-IMS y mediante UHPLC-ESI-MS<sup>E</sup> se demostró la utilidad de emplear una técnica con resolución espacial, ya que se demostró la existencia de al menos tres regiones con una composición de lípidos característica y diferente. En la primera de estas regiones, el clúster número 1, se encontró una menor cantidad de especies y una mayor proporción de aductos

## **CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS**

---

de  $K^+$ . Por otro lado, en el clúster número 2 se encontraron la mayor parte de las SMs y los éteres de PC. Estas clases de lípidos, como se describe en la literatura, es habitual encontrarlas en grandes proporciones en tumores o líneas celulares de tumores, lo cual abre la puerta a la búsqueda de biomarcadores de cáncer entre los éteres de PCs y PEs. La tercera región, el clúster número 3, parece definir una fina película alrededor del tejido, rica en TAGs, correspondiente al tejido conectivo que forma el animal para protegerse del xenografo.

Cuando se comparó la sensibilidad MALDI-MS y UHPLS-ESI-MS, se encontró que para PCs, PEs, SMs y Pls las especies detectadas coinciden mayoritariamente, mientras que para PGs, PSs y PAs tienen una asignación más clara y fiable en UHPLC-ESI-MS<sup>E</sup>, probablemente debido a que la matriz empleada en MALDI-MS está optimizada para modo de ionización positivo, y las TAGs se detectan mucho mejor también en UHPLC-ESI-MS.<sup>10</sup>

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

### 5.4.3. Estudio de éteres de PCs y PEs en diferentes xenografos

En el apartado 5.4.2 se concluyó que los éteres de PCs y PEs podrían ser buenos candidatos a biomarcadores de cáncer. Además, se constató la existencia de diferencias en la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a lo largo de las secciones. Por tanto, en este apartado se hizo un estudio de la abundancia de éteres de glicerofosfolípidos en otros tipos de xenografos para comprobar si existe una relación entre su concentración y la presencia de un tumor. Además, se profundizó en el tema de los aductos.

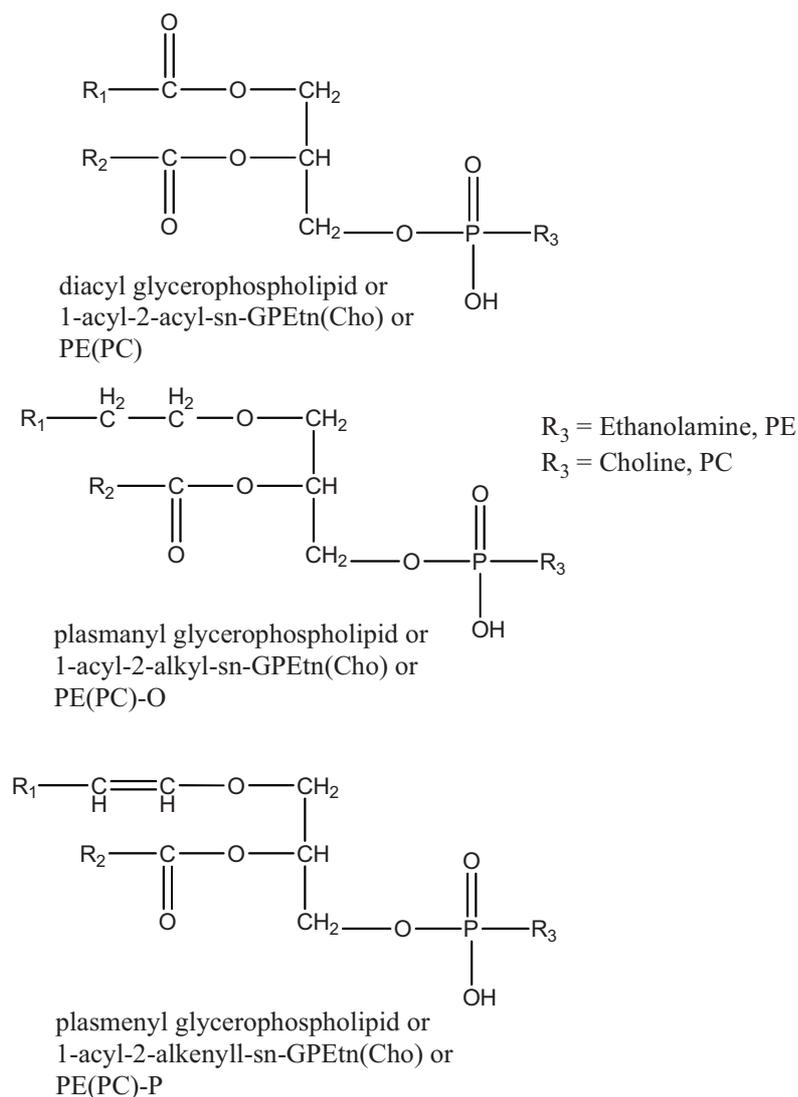


Fig 5.4.4. Estructura de PCs, PEs y sus correspondientes éteres.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

En este estudio se emplearán xenógrafos de:

- Líneas celulares de cancer pancreático humano, Bx-PC3
- Glioblastoma-astrocytoma humano, U-87 MG
- Líneas celulares de carcinoma de colon humano, HT-29
- Carcinoma de pulmón humano, A-549
- Adenocarcinoma de pulmón humano, NCI H-1975

### 5.4.3.1. Resultados

Tal y como se demostró en el apartado anterior cabía esperar una distribución no homogénea en los xenógrafos estudiados, donde debería ser posible distinguir zona de tejido necrótico, zona vascularizada y tejido conectivo del animal. Por lo tanto en primer lugar, mediante MSI-Analyst, se llevó a cabo un análisis de los experimentos de imagen empleando el algoritmo de clústering K-means y PCA. Se compararon con las tinciones con naranja de acridina, realizadas por el grupo Lipids in Human Pathology del Institut d'Investigació Sanitària de Palma, y donde las zonas más anaranjadas se corresponden con áreas de muerte celular, y a continuación se extrajeron los espectros promedio de los clústeres de cada xenógrafo.

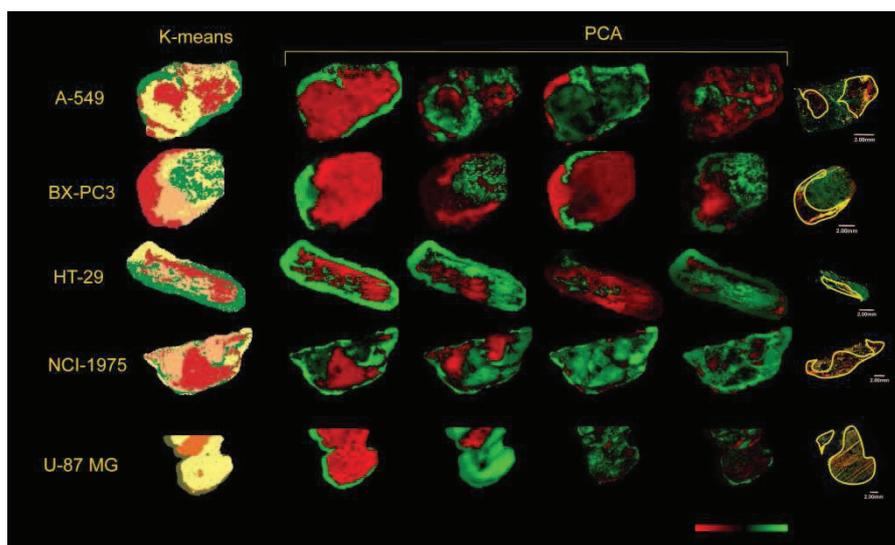


Fig 5.4.5. Áreas de interés determinadas mediante clústering *k*-means y por PCA, a la derecha se muestran las tinciones de los cortes, hechas con naranja de acridina.

Mediante una herramienta desarrollada en MatLab se generó una lista de canales másicos única para cada xenógrafo en cada polaridad. Empleando otra herramienta en Matlab y una base de datos de lípidos propia, se hizo una asignación preliminar y se comparó con las asignaciones obtenidas en UHPLC-MS<sup>E</sup>.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

Tal y como se describe en la bibliografía,<sup>11</sup> algunos lípidos podrían ser unos eficaces biomarcadores de necrosis celular, hipoxia y normoxia. La distribución de estos marcadores lipídicos, que también se detectaban en las muestras analizadas en este estudio, se muestra en la figura 5.4.5 donde se observa que la distribución de la palmitoilcarnitina (PalCar) correlacionaba bien con las áreas necróticas en los xenógrafos A549 y NCI H-1975 pero en el resto de tejidos se encontró principalmente en las zonas normóxicas, por lo que no puede considerarse como un buen marcador de necrosis. La PC 38:1 presentó una alta concentración en las áreas necróticas de los tejidos BX, NCI y U87 pero su distribución no coincide con la zona necrótica del HT29 y no se detectó en el A549. La SM 34:1, que se presentaba como un marcador de de hipoxia, se detectó en las áreas necrosadas de A549, NCI y U87. El resto de especies presentaron distintos tipos de distribución en función del tipo de tejido analizado.

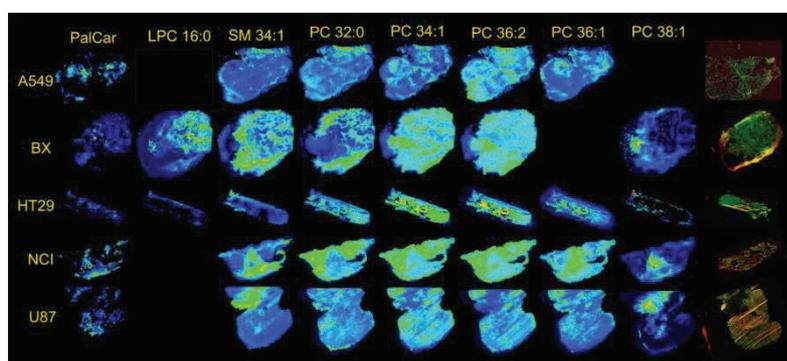


Fig 5.4.5. Distribución de los lípidos identificados como posibles marcadores de normoxia, hipoxia o necrosis en la referencia<sup>11</sup>, a la derecha se muestran las tinciones de los cortes, hechas con naranja de acridina.

En este estudio se compararon tres posibles indicadores para determinar si podían emplearse como marcadores de necrosis en xenógrafos. En primer lugar se comparó la relación entre las abundancias de los aductos en las PCs para los clústeres correspondientes a tejido necrótico y a tejido vascularizado, buscando una conexión entre una mayor abundancia de alguno de los iones,  $H^+$ ,  $K^+$  o  $Na^+$ , y la necrosis. A continuación se comparó la abundancia total de PCs frente a la de éteres de PC y la de PEs con la de éteres de PE en los clústeres de tejido con necrosis y los clústeres de tejido vascularizado.

Para poder hacer este análisis, y dado que muchas especies confirmadas por UHPLC-MS<sup>E</sup> presentaron aductos en MALDI cuya masa coincide con la de aductos de otras especies también confirmadas, fue necesario buscar una forma de distinguir qué parte de la abundancia de uno de estos canales pertenecía a unas especies u a otras. Para ello se empleó el programa diseñado en Matlab descrito en el punto 3.5.1.1.1. El análisis de los datos se muestra en el CD de material suplementario CD-II.4.11.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

Tabla 5.4.11. Especies de PCs detectadas por UHPLC-MS<sup>E</sup> en los cinco tipos de xenografo.

Especies	ADUCTOS				
	A549	U87	HT29	BXE	NCI
16:0/14:0 or 14:0/16:0	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>		+H <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
P-32:0/O-32:1		+H <sup>+</sup>			+H <sup>+</sup> [solo se detecta PC (O-32:1)]
O-32:0		+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>
16:0/16:1	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	-CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
16:0/16:0	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	-CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
33:1					+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
P-34:1/O-34:2		+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>		+H <sup>+</sup>
P-16:0/18:0/O-34:1		+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> [solo se detecta PC (P-34:0)]
34:3			+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	
16:0/18:2	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
16:0/18:1	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
16:0/18:0	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
36:5		+H <sup>+</sup>			
P-36:4/O-36:5	+AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup>			+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
P-36:3/O-36:4					+H <sup>+</sup>
P-36:2/O-36:3					+H <sup>+</sup>
P-36:1/O-36:2		+H <sup>+</sup>			+H <sup>+</sup>
16:0/20:4	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+Na <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
16:0/20:3 or 18:1/18:2	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
18:0/18:2	+H <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
18:0/18:1	+H <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
P-16:0/22:6		+H <sup>+</sup>			
P-38:4/O-38:5		+H <sup>+</sup>			+H <sup>+</sup>
P-38:3/O-38:4					+H <sup>+</sup>
37:4		+H <sup>+</sup>			
18:2/20:4	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>
16:0/22:5	+H <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
16:0/22:4 or 18:1/20:3	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	+AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
18:0/20:3					+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
38:2		+H <sup>+</sup>			
P-40:6		+H <sup>+</sup>		+H <sup>+</sup>	
P-40:4/O-40:5		+H <sup>+</sup>			
40:6	+AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>		+H <sup>+</sup>
18:0/22:4	+AcO <sup>-</sup>	+H <sup>+</sup>			+H <sup>+</sup>

Tabla 5.4.12. Especies de PEs detectadas por UHPLC-MS<sup>E</sup> en los cinco tipos de xenografo.

Especies	ADUCTOS				
	A549	U87	HT29	BXE	NCI
P-16:0/16:1	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	
32:1	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	
P-16:0/18:2	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>
P-16:0/18:1	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>
16:0/18:2	-H <sup>+</sup>			+Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	
16:0/18:1		-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>
34:0					+AcO <sup>-</sup>
P-36:5	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	
P-16:0/20:4	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>
P-36:3/O-36:4	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	
P-18:0/18:2/	-H <sup>+</sup>		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup> [solo se detecta]

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

O-36:3					PE (P-36:2)]
35:2					+AcO <sup>-</sup>
P-18:0/18:1	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>		+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>
P-18:0/18:0			-H <sup>+</sup>		
16:0/20:4	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>		
18:1/18:2	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>		
18:0/18:2					+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup> , +AcO
18:0/18:1	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>
P-16:0/22:6	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>
P-18:0/20:5/ O-16:0/22:6	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup> [solo se detecta PE (O-38:6)]
P-16:0/22:4 or P-18:0/20:4 /O-38:5	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup> [solo se detecta PE (P-38:4)]
P-38:3/O-38:4	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>		
P-20:0/18:2/ O-38:3			-H <sup>+</sup>		
38:6	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>
18:1/20:4	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	
18:1/20:3 or 18:0/20:4	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>
38:3	-H <sup>+</sup>			-H <sup>+</sup>	
38:2					+AcO <sup>-</sup>
38:1					+AcO <sup>-</sup>
39:2			+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>		
P-18:1/22:6	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>
P-18:0/22:6	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>
P-40:5/ O-18:0/22:6	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup> [solo se detecta PC (O-40:6)]
P-18:0/22:4	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>		-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>
40:7				-H <sup>+</sup>	
18:0/22:6			-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>
40:5				+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>	
18:0/22:4	-H <sup>+</sup>			-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , -H <sup>+</sup>

### 5.4.3.2. Análisis

#### 5.4.3.2.1. Estudio de la relación entre los aductos de PC en xenografos

Se estudió la relación entre los aductos de H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en cada clúster de cada xenógrafo, para comprobar si ésta podía ser una herramienta lo suficientemente precisa como para distinguir los distintos tipos de tejido dentro del xenógrafo.

Como ejemplo, para el xenógrafo A549 se obtuvo la relación de la figura 5.4.6 izda, sin recalculer las intensidades, eligiendo únicamente las especies en las cuales ninguno de los tres aductos compartía canal másico con otra especie. Por otro lado, la figura 5.4.6 dcha muestra la relación tras recalculer las intensidades. Se observó que en este caso la relación era muy parecida en ambos clústeres.

Tal y como se muestra en la figura 5.4.7, en el xenógrafo A-549 se aprecia un aumento de las especies sodiadas en el clúster 2, correspondiente a tejido necrótico.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

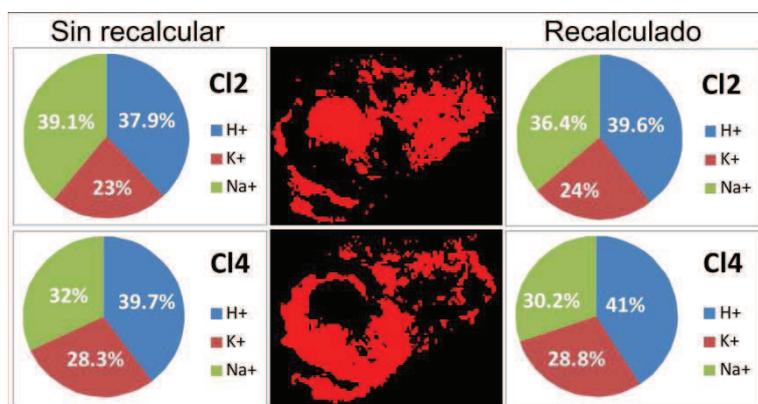


Fig 5.4.6. Relación entre los aductos en los clústeres 3 y 4 del xenografo A549 sin recalcular y tras haber recalculado las intensidades.

En el caso del xenografo BX-PC3, tan solo había una especie de PC cuyos tres aductos no coincidieran en masa con ninguna otra especie y hubo que recalcular las intensidades de todas las demás. Como se observa en la figura 5.4.7, los clústeres 1 y 3 presentan una relación entre aductos muy similar, con un ligero aumento de las especies potasiadas en el clúster 3, por tanto, las diferencias que llevaron al algoritmo de clústering K-means a separar ambos clústeres nada tienen que ver con la relación entre aductos. El clúster 4, que corresponde al tejido necrótico, presenta claramente una proporción del aducto con  $K^+$  inferior que los clústeres 1 y 3 y un aumento significativo de los aductos con  $Na^+$ .

En el xenógrafo HT-29 no se detectó ninguna especie en la cual sus tres aductos no coincidieran en masa con algún aducto de otra especie, por lo tanto el programa recalculó las relaciones utilizando la relación entre  $H^+$  con  $K^+$ ,  $H^+$  con  $Na^+$  y  $K^+$  con  $Na^+$  de varias especies que si presentaban estos pares libres. Como se observa en la figura 5.4.7, en el clúster 0 hay una mayor proporción de aductos con  $K^+$  y con  $Na^+$  que en el clúster 4, correspondiente al tejido necrótico, donde las PCs se ionizan mayoritariamente formando aductos con  $H^+$ .

En el xenógrafo NCI H-1975 tampoco se detectó ninguna PC cuyos tres aductos se encontraran en un canal másico no compartido. Por lo que, al igual que en el HT-29, se calcularon utilizando la relación entre  $H^+$  con  $K^+$ ,  $H^+$  con  $Na^+$  y  $K^+$  con  $Na^+$  de varias especies que si presentan estos pares libres. En la figura 5.4.7 se puede ver una clara diferencia entre el clúster 3, donde el aducto mayoritario es el que se forma con  $H^+$ , y el clúster 4, que define el área necrotizada, donde predomina el aducto formado con  $Na^+$ .

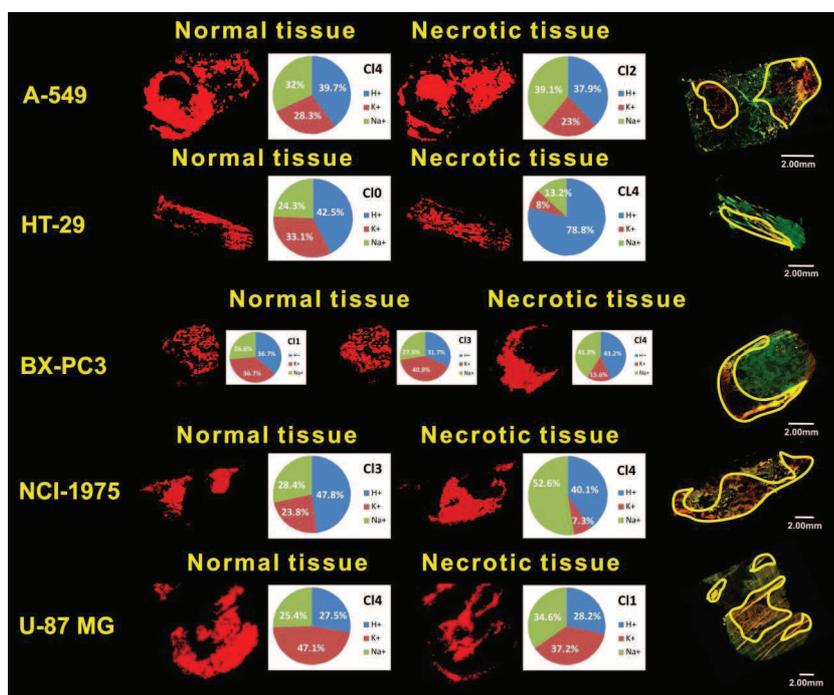


Fig 5.4.7. Relación entre los aductos de PCs en los diferentes clústeres de los xenografos A-549, BX-PC3, HT-29, NCI H-1975 y U-87 MG tras haber recalculado las intensidades.

Al igual que en HT-29 y NCI H-1975, en el xenógrafo U-87 MG tampoco se detectó ninguna PC cuyos tres aductos se encontraran en un canal másico no compartido. Por lo que se calculó la proporción entre los tres aductos utilizando la relación entre  $H^+$  con  $K^+$ ,  $H^+$  con  $Na^+$  y  $K^+$  con  $Na^+$  de varias especies que si presentaban estos pares libres. En la figura 5.4.7 se puede observar un aumento significativo de los aductos con  $Na^+$  en el clúster 1, correspondiente al tejido necrótico.

Se comprobó que la relación entre los tres aductos no era una herramienta útil para distinguir tejido necrótico de tejido viable. Sin embargo, al dejar a un lado los aductos con  $H^+$ , y analizar únicamente la relación  $Na^+/K^+$ , se observó, que en todos los casos, los aductos con sodio aumentaban en el tejido necrótico.

#### 5.4.3.2.2. Relación entre PCs y éteres de PC

Sumando las intensidades recalculadas de todas las PCs y de todos los éteres de PC, se estudió la proporción entre éteres de PC y PCs en cada clúster de cada xenógrafo.

Como ejemplo de las diferencias entre las abundancias recalculadas y las no recalculadas, en la figura 5.4.8, se muestra la proporción de éteres de PC respecto

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

al total de PCs sin recalcular las intensidades y tras recalcularlas para el xenógrafo A-549.

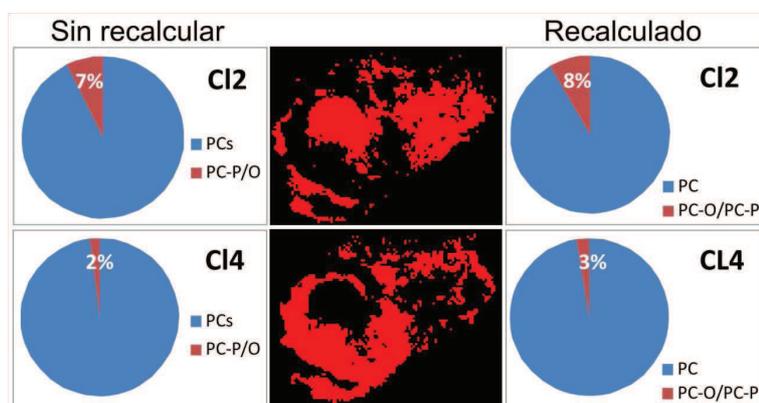


Fig 5.4.8. Proporción de éteres de PC en los clústeres del xenógrafo A-549 sin recalcular y tras haber recalculado las intensidades.

Tras recalcular las intensidades se observa un ligero aumento en la proporción de éteres de PC en ambos clústeres, probablemente debida a que picos muy intensos, como el 782.57 correspondiente a  $[PC\ 34:1 + Na]^+$  y  $[PC\ 36:4 + H]^+$ , sumaban su intensidad dos veces antes de hacer la deconvolución de los canales másicos.

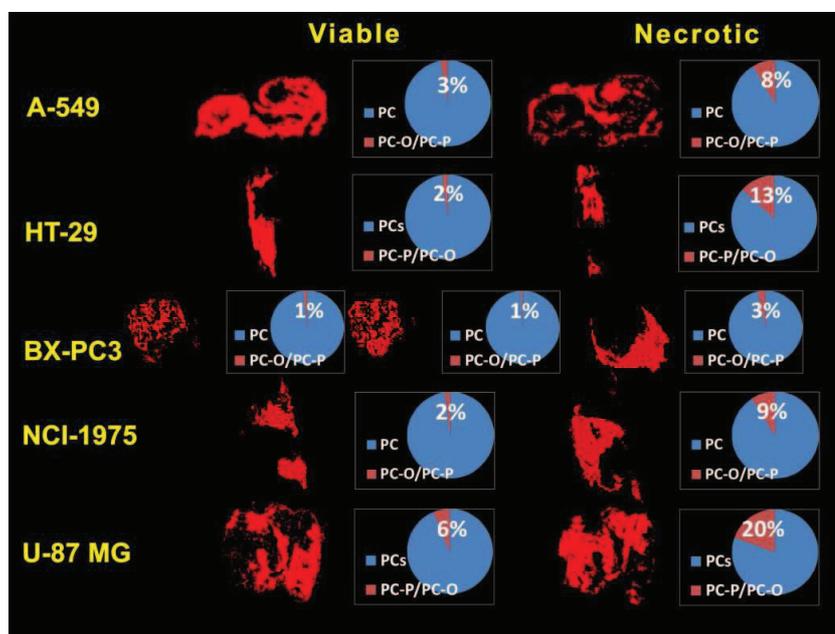


Fig 5.4.9. Proporción de éteres de PC en los clústeres de los xenografos A-549, BX-PC3, HT-29, NCI H-1975 y U-87 MG tras recalcular las intensidades.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

Cuando se estudió la proporción de éteres de PC en los clústeres 2 y 4 del xenógrafo A-549 se observó un aumento en su abundancia relativa en el área de tejido necrótico definida por el clúster 2, como se puede ver en las figuras 5.4.8 y 5.4.9.

Como se puede ver en la figura 5.4.9, al comparar los clústeres en el xenógrafo BX-PC3, si bien no se observó una proporción demasiado elevada de éteres de PC en ninguno de los clústeres, en el clúster 4, que corresponde a la zona necrotizada, había un aumento apreciable respecto a los demás clústeres. En el xenógrafo HT-29 se observó un aumento significativo de los éteres de PC en el área definida por el clúster 4, también zona de necrosis. En el xenógrafo NCI H-1975 se vió un aumento significativo de los éteres de PC en el tejido necrótico definido por el clúster 4. Por último, en el xenógrafo U-87 MG se observó un ligero aumento de los éteres de PC en el área necrótica que representa el clúster 1.

### 5.4.3.2.3. Relación entre PEs y éteres de PE

Se llevó a cabo un estudio similar sobre la proporción PE/PE-éter en los xenógrafos. Lamentablemente, a diferencia de las PCs, las PEs y sus éteres se detectan mejor en modo de ionización negativo<sup>3,4</sup> y la matriz que se empleó en las medidas tiene mucho mejor rendimiento en modo de ionización positivo. Por lo tanto, salvo en el xenógrafo A-549, en el cual se detectó un número razonable de especies de PEs y sus éteres en modo de ionización negativo, en el resto de xenógrafos fue necesario hacer el estudio con intensidades recalculadas de las especies detectadas en modo positivo.

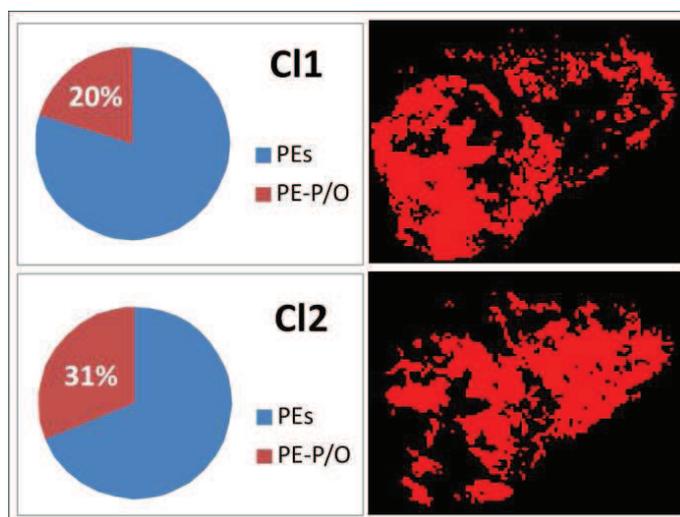


Fig 5.4.10. Proporción de éteres de PE en los clústeres del xenógrafo A-549 medido en modo de ionización negativo.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

En el xenógrafo A-549, tanto en modo de ionización positivo, figura 5.4.11 y A-V de los apéndices, como en negativo, figura 5.4.10, se observó un incremento de los éteres de PE en el tejido viable. En el resto de xenógrafos se mantiene esta tendencia, aunque el bajo número de especies detectada pone en entredicho la validez de las conclusiones. En ninguno de los clústeres del xenógrafo BX-PC3 o del U-87 se detectaron éteres de PEs. Mientras que en el HT-29 se detectaron mas éteres de PE en el tejido viable. Por otro lado en el xenógrafo NCI H-1975 se observa una mayor proporción de éteres de PE en el área viable del tumor, sin embargo, tal y como ocurre en el caso anterior, se detectaron muy pocas especies, 2 PEs y 3 éteres de PE, por lo que hay que tener cuidado al extraer conclusiones de estos datos. Además, los resultados observados no son reproducibles en otras secciones, como se puede ver en la figura A-V de los apéndices.

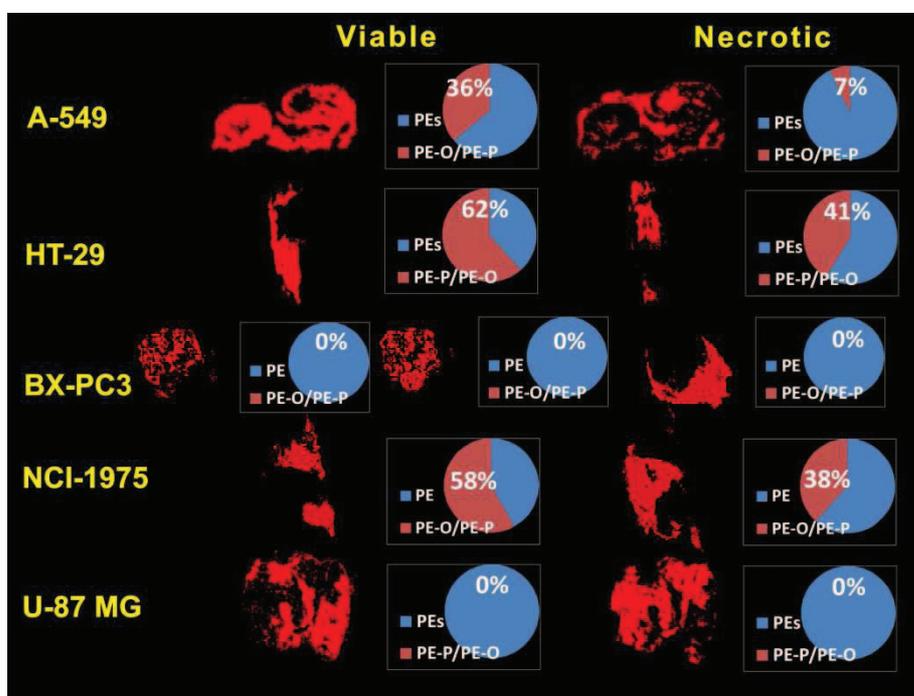


Fig 5.4.11. Proporción de éteres de PE en los clústeres de los xenografos A-549, BX-PC3, HT-29, NCI H-1975 y U-87 MG tras haber recalculado las intensidades, en la figura A-V de los apéndices se muestran más secciones..

### 5.4.3.2.4. Relación entre PEs y éteres de PE en LC-MS

Debido a la baja detectabilidad de los PEs y los éteres de PE en MALDI-MS, empleando MBT como matriz, se analizaron los extractos lipídicos de los xenógrafos mediante LC-MS. Se obtuvieron unos porcentajes de abundancia de éteres de PE frente a abundancia total de PEs de 58% para el NCI H-1975 (pulmón), el 71% para el A-549 (también pulmón), el 77% para el HT-29 (Colon), el

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

61% para el BX-PC3 (páncreas) y del 88% en el U-87 MG (Cerebro). Porcentajes muy elevados y que, salvo en algunas regiones del sistema nervioso como la materia blanca, superan ampliamente los descritos en la bibliografía.<sup>12,13</sup>

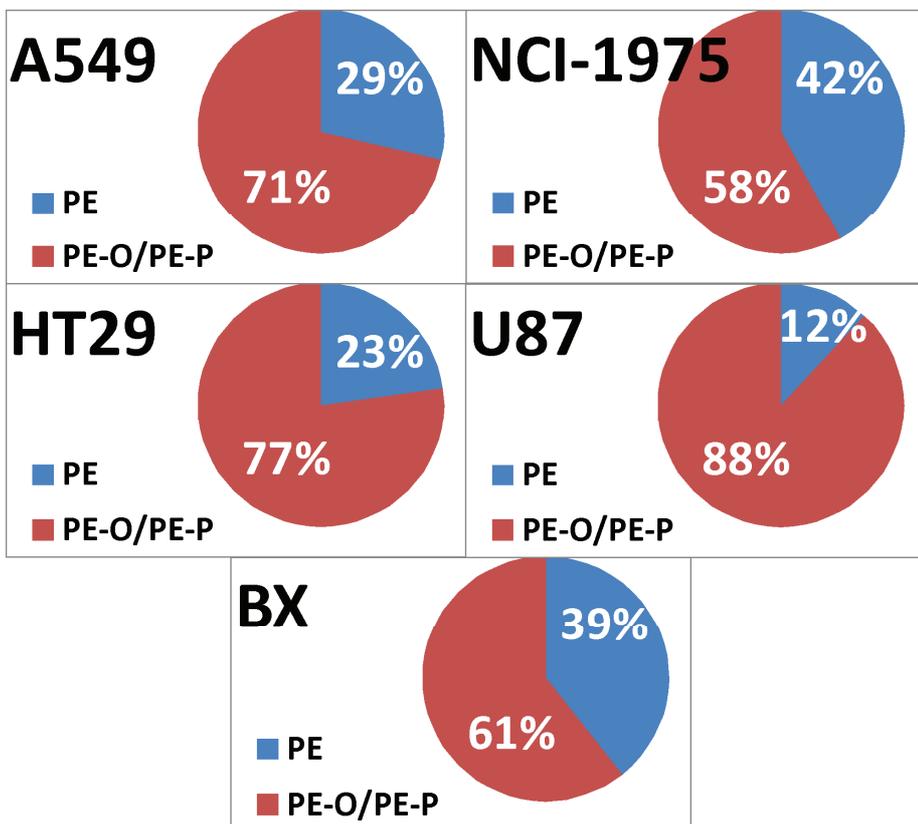


Fig 5.4.12. Abundancia relativa entre PEs y sus plasmalógenos en LC/MS para los diferentes tipos de tejidos.

### 5.4.3.3. Discusión

En todos los xenógrafos analizados se observó una notable variación en la relación de las abundancias de los aductos de PCs entre clústeres y dentro de un mismo tejido. Cuando se compararon las relaciones entre los tres aductos, se observó que mientras que en las zonas necróticas de los xenógrafos A-547, NCI H-1975, el U-87 y BX-PC3 aumentaron los aductos con sodio, en el HT-29 aumentaron los aductos con H<sup>+</sup>. En las zonas necróticas de todos los xenógrafos se observó una disminución de los aductos con potasio. Si se compara únicamente la relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>, ver figura 5.4.13 y A-IV de los apendices, en todos los casos se observó un aumento de los aductos con sodio en las áreas necróticas. Se sabe que los tejidos tumorales presentan un pH inferior al de los tejidos sanos y debido a ello el medio extracelular debe tener altas concentraciones de K<sup>+</sup>, ya que la liberación de potasio es uno de los mecanismos

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

que emplean las células para regular el pH. De esta forma, los lípidos de la parte exterior de la membrana plasmática están en contacto con más  $K^+$  del habitual. En las áreas en las que las células han muerto, este mecanismo se detiene y puede ser el motivo por el que disminuyen los aductos de  $K^+$  en las zonas necróticas del tumor. En estudios previos sobre isquemia cerebral en ratón<sup>14</sup> se atribuyó el incremento en la abundancia de los aductos de  $Na^+$  en los clústeres correspondientes a zonas hipoxicas o necróticas a la desregulación de la ATPasa  $Na^+/K^+$ .

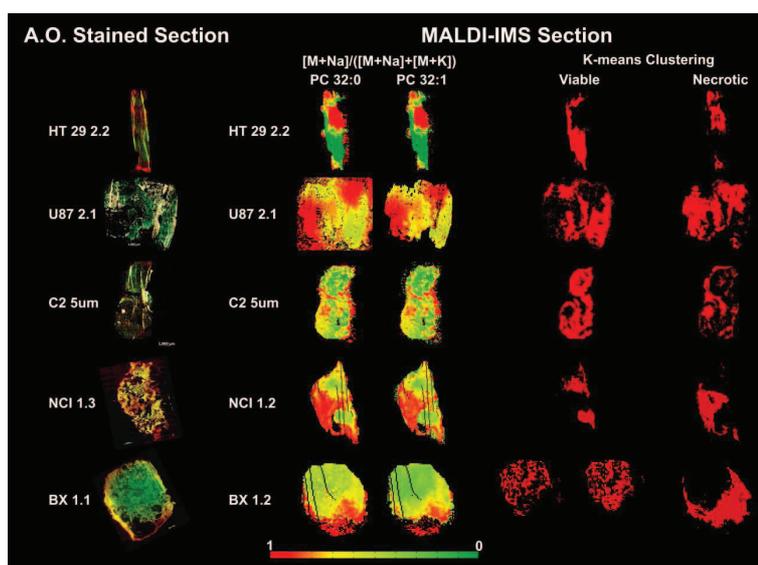


Fig 5.4.13. Comparación entre la relación  $\frac{[M+Na]}{([M+Na]+[M+K])}$  para las especies PC 32:0 y PC 32:1, y las áreas necróticas del tejido teñidas de amarillo-rojo con Naranja de acridina, en la figura A-IV de los apéndices se muestran el resto de secciones.

A pesar de que la relación entre PCs y éteres de PC está siempre muy desplazada a favor de las PC debido a que algunas PCs son las especies predominantes en el espectro en modo de ionización positivo, se observa un notable incremento en la suma de las intensidades de los éteres de PC en las áreas necróticas. Esto hace de los éteres de PC unos interesantes biomarcadores de necrosis.

En el caso de las PEs y sus éteres, debido a la supresión iónica y a que muchas especies coinciden en masa con PCs, cuyos picos son mucho más intensos en el espectro en modo positivo, el número de especies detectadas directamente sobre el tejido no es suficiente como para que los resultados sean representativos. Mientras que en los xenógrafos de A-549 y NCI H-1975 los éteres de PE son menos abundantes en las zonas necrosadas en el HT-29 se observa justo lo contrario. Debido a esto, los éteres de PE no parecen ser unos buenos marcadores de necrosis, al menos con la matriz empleada en este trabajo.

## **CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS**

---

Al analizar las intensidades relativas obtenidas por LC-MS, se observa una sorprendente abundancia de éteres, tanto de PC como de PE en todos los tipos de xenógrafo analizados, y si bien los éteres son componentes habituales de tejidos como el cerebro o los pulmones,<sup>13</sup> esta abundancia es extraña en tejidos como el colon o el páncreas. Por otro lado, un medio ácido puede provocar altas tasas de oxidación, y algunos estudios demuestran que los plasmalógenos son antioxidantes naturales, ya que el enlace éter es más dado a oxidarse que el doble enlace habitual de la mayoría de los fosfolípidos. Por tanto, un incremento de los éteres de PE podría ser debido a un mecanismo de protección del tejido viable del tumor. Estos resultados parecen indicar que el aumento en la abundancia de éteres de PC y PE está relacionado con el proceso tumoral.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

### 5.4.4. Estudio de la influencia del tratamiento con 2OHOA en el lipidoma de xenógrafos de A-549

Los Xenografos empleados en esta parte del estudio son muestras de la línea celular A549 inyectados subcutáneamente en ratones. Como se ha explicado anteriormente, la complejidad de este tipo de muestras se debe a la vascularización irregular del xenógrafo, que resulta en zonas hipóxicas o incluso necróticas. Por lo tanto, los xenógrafos presentan al menos dos tipos de tejido con diferentes características, además de una película de protección creada por el animal huésped y formada por tejido conjuntivo con un alto contenido en glicerolípidos. Esta heterogeneidad dificulta la comparación entre las muestras control y las muestras tratadas, ya que las diferencias entre los distintos tipos de tejido en cada muestra pueden ser más importantes que las derivadas del tratamiento con el fármaco.

Un grupo de ratones recibió un tratamiento durante 50 días con ácido 2-hidroxioléico (2OHOA) por vía digestiva mediante una cánula, mientras que otro grupo de control no recibió tratamiento alguno.<sup>15</sup> En este estudio se pretendía desarrollar un protocolo que permitiese detectar las diferencias en la composición lipídica de los xenografos, asociadas a la acción del fármaco.

En el CD de material suplementario, carpeta CD-II.4.12 se adjuntan los archivos de datos con los que se realizó el análisis.

Tabla 5.4.14. Relación de cortes medidos.

Controles	Tratados
A549 C1 5.1	A549 T1 2.1
A549 C3 5µm	A549 T3 5µm
A549 C2 2.2	A549 T2 2.1
A549 C3 3.1	A549 T3 1.1
A549 C1 3.1	A549 T3 2.1
A549 C1 1.1	A549 T3 3.1
A549 C1 2.1	A549 T4 1.2
A549 C3 1.1	A549 T4 2.1
A549 C2 3.1	A549 T4 3.1
A549 C2 5µm	A549 T4 5µm

#### 5.4.4.1. Comparación de los espectros promedio

En una primera aproximación se compararon los espectros promedio de toda la sección de cada xenografo en busca de diferencias en el lipidoma de los xenografos cuya rata huésped ha recibido tratamiento y aquellos en los que no. Para ello se desarrolló una herramienta capaz de recalibrar los espectros de dos formas diferentes, unificar la lista de canales másicos de todos los espectros, normalizarlos de cuatro formas distintas (p-norm, Median, Noise Level y

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

Calmass), eliminar los picos de la matriz, eliminar los picos de la distribución isotópica y eliminar los picos cuya intensidad no supere un umbral de intensidad.

En un primer paso, de todas las opciones implementadas en el software, se eligió la siguiente metodología para procesar los datos: Se normalizaron los espectros de dos formas diferentes: frente al TIC y respecto al pico [PC 34:1 + H]<sup>+</sup> (760.5851 Da); se eliminaron los picos de matriz y de la distribución isotópica y se generaron dos listas de picos descartando aquellos canales másicos que no superaron el 1% y el 10% de la intensidad máxima en el espectro promedio de alguno de los experimentos y para ambos tipos de normalización.

Empleando el software Unscrambler se realizaron varios análisis por componentes principales (PCA) sobre ambas listas, en los que se emplearon los datos sin normalización o normalizando cada pico, o variable, frente a su desviación estándar en el conjunto de muestras.

**Tabla 5.4.15. Resumen de los distintos análisis realizados sobre los espectros promedio de las muestras de xenografo. Se muestran los grupos de experimentos que ha permitido obtener el análisis (GOIs), las componentes principales (CPs) que están implicadas en estas agrupaciones, el umbral de intensidad en % respecto al máximo del espectro promedio (%I), el tipo de datos (Datos), el tipo de normalización de los espectros (Norm.Espectros), el tipo de normalización de las variables (Norm.Picos) y los experimentos que se han considerado atípicos (Outliers) en ese análisis y se han eliminado del mismo.**

Resultado		%I	Datos	Norm.Espectros	Norm.Picos	Muestras atípicas
GOIs	CP					
X	X	1	Promedios	TIC	No	
X	X	1	Promedios	TIC	No	C121, C111, T412
X	X	1	Promedios	TIC	/St.Dev	
X	X	10	Promedios	TIC	No	
X	X	10	Promedios	TIC	No	C121, C111, T412
X	X	10	Promedios	TIC	/St.Dev	
X	X	1	Promedios	760.58	No	
X	X	1	Promedios	760.58	No	C121, C111, T412
X	X	1	Promedios	760.58	/St.Dev	
X	X	1	Promedios	760.58	/St.Dev	C111, T412, T45u
X	X	10	Promedios	760.58	No	
X	X	10	Promedios	760.58	No	C121, C111, T412
X	X	10	Promedios	760.58	/St.Dev	
X	X	10	Promedios	760.58	/St.Dev	C111, T412

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

En la tabla 5.4.15 se aprecia cómo ninguno de los análisis que se realizaron permitió clasificar los experimentos como tratados y controles. En los análisis realizados sobre los espectros normalizados frente al pico 760.5851 y los picos (o variables) sin normalizar se observó que picos muy intensos como el 798.54 o el 782.57 tenían mucha influencia sobre las dos primeras componentes principales (CPs), de forma que enmascaraban las diferencias en otras especies que podrían ser clave en la distinción entre controles y tratados.

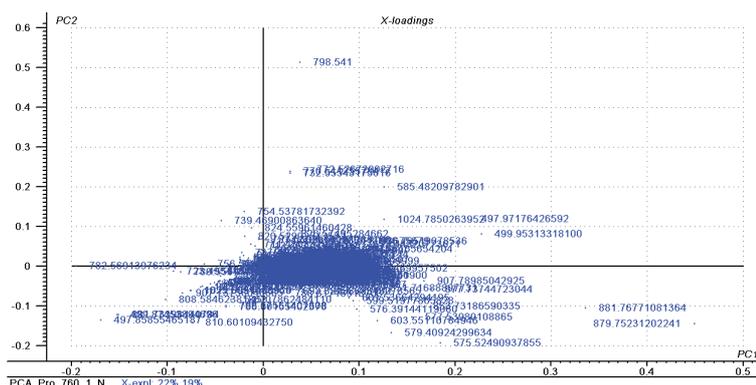


Fig 5.4.14. Variables en la CP1 y en la CP2 en el análisis de los espectros promedio normalizados frente al pico 760.5851 y los picos sin normalizar.

Se normalizaron los datos frente a la desviación estándar para evitar que los picos más intensos enmascararan las variaciones de los picos más pequeños. Sin embargo, y aun después de eliminar varios experimentos con un comportamiento muy diferente al resto, no fue posible obtener una separación de los experimentos control y tratados, tal y como se muestra en la figura 5.4.14.

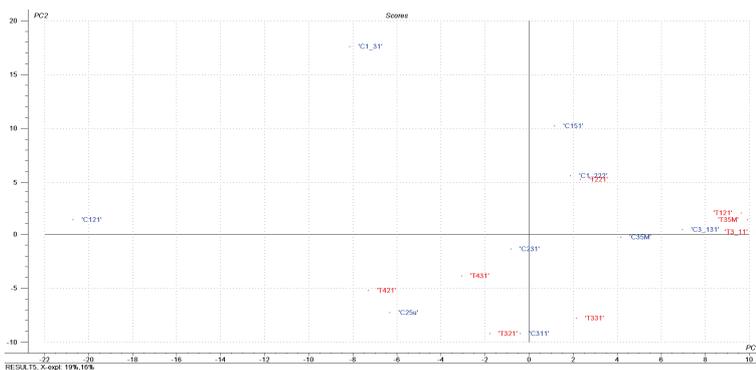


Fig 5.4.15. CP1 vs CP2 en el estudio de los espectros normalizados respecto al pico 760,58 tras normalizar las variables frente a su desviación estándar y eliminar los cortes C111, T412 y T45u que presentaban un comportamiento muy alejado del resto de cortes en el análisis.

Se repitieron estos análisis con los datos resultantes de fijar el umbral en el 1% de la intensidad máxima, obteniendo mismo resultado. El empleo de la

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

normalización TIC tampoco permitió la clasificación de los experimentos en tratados/control.

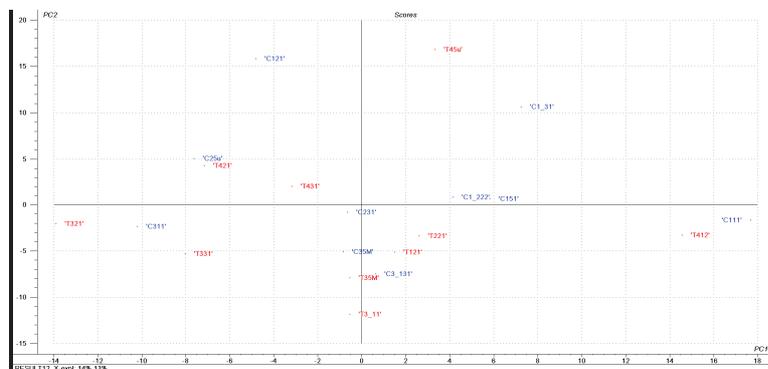


Fig 5.4.16. CP1 vs CP2 en el estudio de los espectros normalizados respecto al TIC tras normalizar las variables frente a su desviación estándar.

Los resultados demuestran que no es posible distinguir los experimentos la clasificación de los experimentos empleando los espectros promedio sobre todo el xenógrafo. La razón puede residir en la ausencia de efectos del 2OHOA sobre el lipídoma, o bien a que los cambios quedan enmascarados por otras variaciones en la abundancia de las especies, no relacionadas con la aplicación del fármaco. Una posible causa es la existencia de regiones bien diferenciadas dentro de los xenógrafos, correspondientes a células en diferentes estados metabólicos. Por ejemplo, en la caracterización del xenógrafo NCI H-1975 (fig 5.4.16), se encontraron varias regiones con diferente composición en cada tejido. Dos de ellas, ROI1 y ROI2, corresponderían la zona del tejido con necrosis, o muerte celular, y al tejido vascularizado respectivamente. Las otras dos, CT (Connective tissue) y Matrix corresponden a la capa de tejido conectivo que el animal ha formado alrededor del xenógrafo y a la zona de solo matriz respectivamente. En algunas muestras resulta difícil hacer una clasificación en 4 regiones, ya que algunas se entremezclan. Por ejemplo en algunos casos se encuentra mayor variabilidad entre áreas recubiertas de matriz que entre zonas de tejido.

La relación (zona necrosada/zona irrigada/CT/Matrix) no es la misma para todos los tejidos, lo que se refleja en el espectro promedio, que contiene contribuciones variables de cada área para cada xenógrafo. Este efecto, aparentemente, tiene mayor influencia en el perfil lipídico promedio que el tratamiento. Es conveniente por tanto comparar las zonas necrosadas e irrigadas de los controles con las correspondientes zonas de los tratados así como eliminar del análisis las zonas de tejido conectivo de la rata y de matriz y que no aportan nada al estudio del xenógrafo, como se hizo en el apartado anterior, en el que se estudiaron los éteres de PCs y PEs.

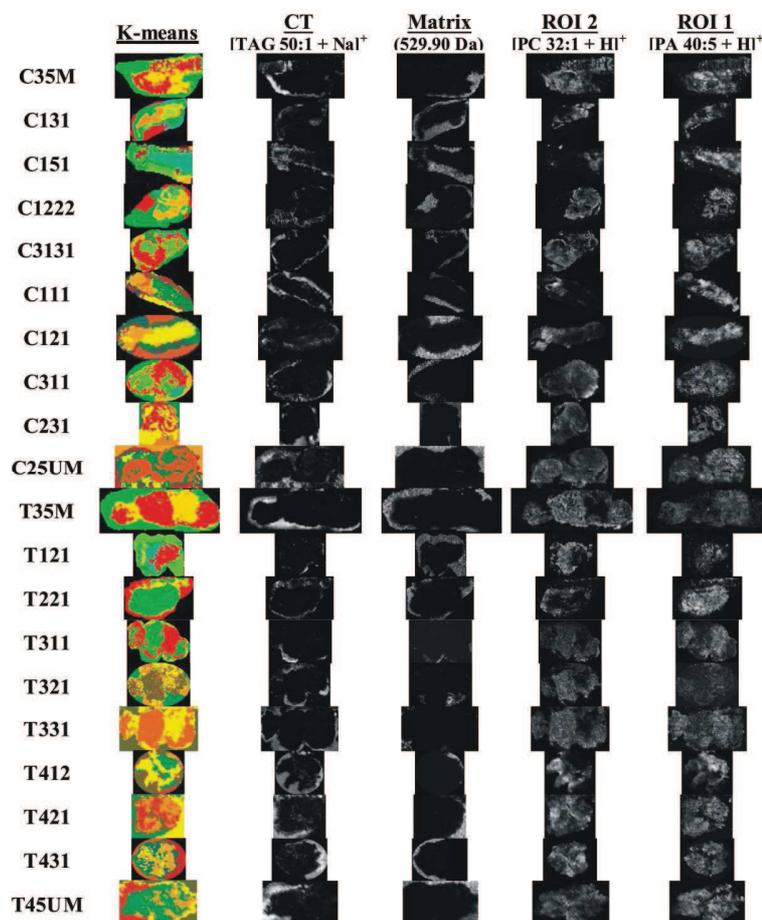


Fig 5.4.17. Diferentes regiones de interés o clústeres en los tejidos determinadas mediante K-means.

#### 5.4.4.2. Estudio por regiones de interés

En primer lugar se identificaron los clústeres que correspondían a zonas de necrosis por un lado, y por el otro, los asociados a zonas vascularizadas en cada tejido. A tal fin, se eliminaron en primer lugar los picos de matriz y los correspondientes a distribuciones isotópicas, se alinearon todos los espectros y se normalizaron frente al pico 760.5851, correspondiente a una de las especies habitualmente más abundantes  $[PC\ 34:1 + H]^+$ , y frente al TIC. A continuación, para cada tipo de normalización, se generaron tres listas de datos para hacer el análisis descartando aquellos picos que no superaban el 1%, el 10% y el 30% de la intensidad máxima.

Al igual que en el caso de los promedios, empleando el software Unscrambler se realizaron diferentes PCA sobre las seis listas, en los que se utilizaron las variables normalizadas frente a la desviación estándar y sin normalizar.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

Tabla 5.4.16. Resumen de los distintos análisis realizados sobre los espectros promedio de los clústeres de los xenografos. Se muestran los grupos de experimentos obtenidos con el análisis (GOIs), las componentes principales (CPs) que están implicadas en estas agrupaciones, el umbral de intensidad en % respecto al máximo del espectro promedio (%I), el tipo de datos (Datos), el tipo de normalización de los espectros (Norm.Espectros), el tipo de normalización de las variables (Norm.Picos) y los experimentos que se han considerado atípicos (Outliers) en ese análisis y se han eliminado del mismo.

Resultado		%I	Datos	Norm.Espectros	Norm.Picos	Muestras atípicas
GOIs	CP					
X	X	30	Clústeres	TIC	No	
X	X	30	Clústeres	TIC	/St.Dev	
X	X	10	Clústeres	TIC	No	
GOI1/GOI2	2	10	Clústeres	TIC	No	C35M_C10, T35M_C10, T311_C12
GOI1/GOI2	1	10	Clústeres	TIC	/St.Dev	
GOI1/GOI2	1	30	Clústeres	760.58	No	
GOI1/GOI2/GOI3	1	1	Clústeres	760.58	No	
X	X	1	Clústeres	760.58	/St.Dev	
GOI1/GOI2/GOI3	1	1	Clústeres	760.58	/St.Dev	C111_C10, T35M_C10, T412_C10, T412_C14

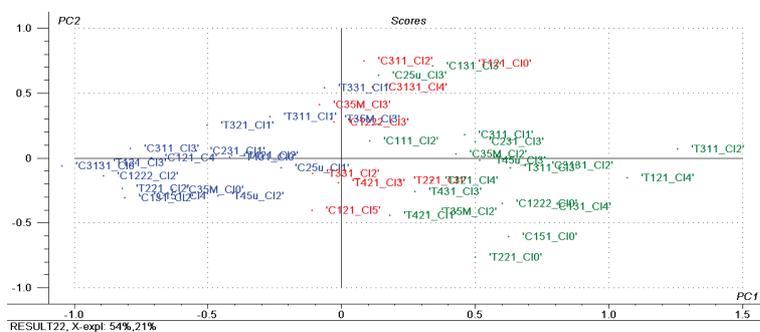


Fig 5.4.18. Conjuntos de clústeres obtenidos mediante PCA sobre los datos normalizados frente al pico 760.5851, filtrados al 30% de la intensidad máxima y con las variables sin normalizar.

Limitando el análisis a los picos con intensidad superior al 30% del máximo se asegura que el análisis se limita a las especies (picos) más representativos, eliminando el ruido estadístico debido a especies poco abundantes. Sin embargo, con este filtro tan estricto, se pueden quedar fuera del análisis especies relevantes para el estudio. Al analizar estos conjuntos de datos, en el normalizado frente al pico 760.5851 y con las variables sin normalizar se observaron dos grupos de experimentos a lo largo de la CP1, a los que se

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

denominó GOI1 y GOI2 (Group of interest 1 y 2), en los espectros normalizados frente al TIC no fue posible distinguir estos dos grupos, ni con las variables normalizadas ni con las variables sin normalizar.

El análisis de los datos normalizados frente al TIC y filtrados al 10% de la intensidad máxima, permitió obtener dos grupos diferenciados a lo largo de la CP2 y otros dos a lo largo de la CP1 a los que se nombró como GOI1 y GOI2 en ambos casos. Sin embargo los GOI 1 y 2 de la CP2, como se muestra más adelante en la tabla 5.4.19 no permitieron distinguir en ningún caso controles de tratados y tampoco parecían correlacionar con dos grupos de tejido concretos.

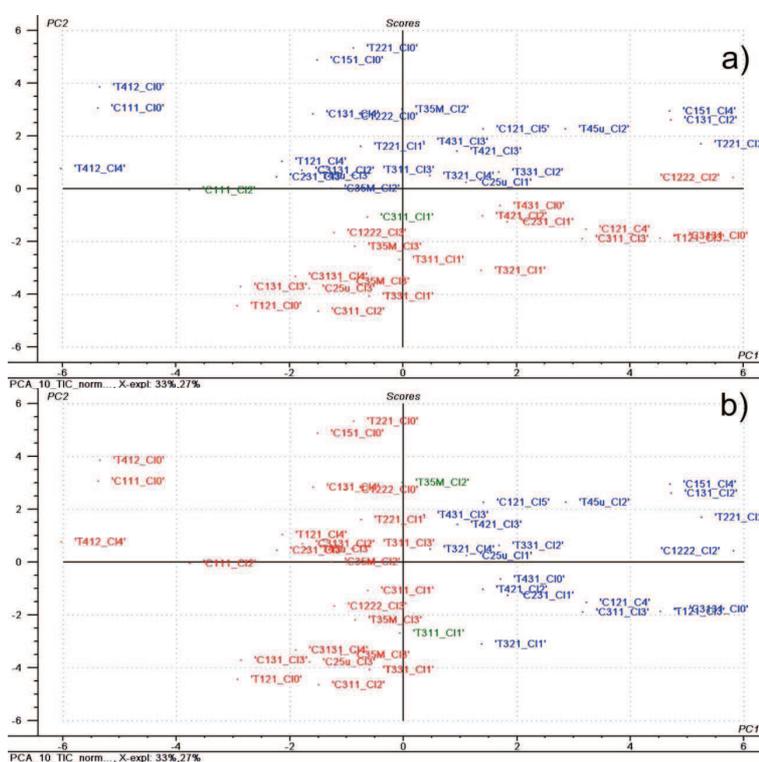


Fig 5.4.19. Conjuntos de clústeres obtenidos mediante PCA sobre los datos normalizados frente al TIC, cortados al 10% de la intensidad máxima y con las variables normalizadas frente a la desviación estándar. a) separación por la CP2. b) separación por la CP1.

Para comprobar los grupos obtenidos con los datos filtrados al 10% y al 30% para la normalización TIC y frente al pico 760.5851 respectivamente, se compararon estos conjuntos con los datos filtrados al 1% de la intensidad máxima. Se establecieron tres conjuntos, GOI1, GOI2 y GOI3 en el caso de los conjuntos obtenidos con los datos normalizados frente al pico 760.5851, donde el conjunto GOI2 estaba formado por algunos experimentos que quedaban a medio camino entre los dos grandes grupos GOI1 y GOI3, probablemente regiones con hipoxia pero sin llegar a necrosis, y se eliminaron del análisis posterior, junto al resto de

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

experimentos atípicos descartados. Para los datos normalizados frente al TIC quedaron definidos también tres conjuntos GO1, GO2 y GO3, donde GO1 correspondía casi exactamente al GO11 definido mediante la otra normalización, y GO2 era una mezcla de las GO12 y 3 anteriores, quedando solo unos pocos clústeres en GO3 como grupo de tejido hipóxico.

Tabla 5.4.17. Conjuntos de clústeres obtenidos de los datos normalizados frente al pico 760.5851.

GO1	GO2	GO3
'C121_C4'	'C121_CI5'	'C111_CI2'
'C1222_CI2'	'C1222_CI3'	'C1222_CI0'
'C131_CI2'	'C311_CI2'	'C131_CI3'
'C151_CI4'	'C3131_CI4'	'C131_CI4'
'C231_CI1'	'C35M_CI3'	'C151_CI0'
'C25u_CI1'	'T121_CI0'	'C231_CI3'
'C311_CI3'	'T221_CI1'	'C25u_CI3'
'C3131_CI0'	'T331_CI2'	'C311_CI1'
'C35M_CI0'	'T421_CI3'	'C3131_CI2'
'T121_CI3'		'C35M_CI2'
'T221_CI2'		'T121_CI4'
'T311_CI1'		'T221_CI0'
'T321_CI1'		'T311_CI2'
'T331_CI1'		'T311_CI3'
'T35M_CI3'		'T321_CI4'
'T421_CI2'		'T35M_CI2'
'T431_CI0'		'T421_CI1'
'T45u_CI2'		'T431_CI3'
		'T45u_CI3'

Tabla 5.4.18. Conjuntos de clústeres obtenidos de los datos normalizados frente al TIC.

GO1	GO2	GO3
'C121_C4'	'C111_CI0'	'T311_CI1'
'C121_CI5'	'C111_CI2'	'T35M_CI2'
'C1222_CI2'	'C1222_CI0'	
'C131_CI2'	'C1222_CI3'	
'C151_CI4'	'C131_CI3'	
'C231_CI1'	'C131_CI4'	

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

---

'C25u_CI1'	'C151_CI0'
'C311_CI3'	'C231_CI3'
'C3131_CI0'	'C25u_CI3'
'C35M_CI0'	'C311_CI1'
'T121_CI3'	'C311_CI2'
'T221_CI2'	'C3131_CI2'
'T321_CI1'	'C3131_CI4'
'T321_CI4'	'C35M_CI2'
'T331_CI2'	'C35M_CI3'
'T421_CI1'	'T121_CI0'
'T421_CI2'	'T121_CI4'
'T421_CI3'	'T221_CI0'
'T431_CI0'	'T221_CI1'
'T431_CI3'	'T311_CI2'
'T45u_CI2'	'T311_CI3'
	'T331_CI1'
	'T35M_CI0'
	'T35M_CI3'
	'T412_CI0'
	'T412_CI4'
	'T45u_CI3'

---

---

Dado que los clústeres se eligieron descartando aquellos que correspondían a tejido conectivo de la rata y a matriz, estas agrupaciones deben corresponder principalmente a tejido vascularizado y tejido necrótico. Además, algunos de los clústeres pueden corresponder a fases intermedias.

En el punto 5.4.3.3 de conclusiones del estudio de éteres de PC y PE en xenógrafos se describe cómo en los clústeres correspondientes a las áreas necróticas se observó un aumento de los clústeres con sodio de las PCs. Esto permitió, observando la relación de aductos promedio en los grupos de clústeres obtenidos por PCA que se muestran en la figura 5.4.31, concluir que el GOI2, en los experimentos normalizados frente a TIC y separados por la CP1, y GOI3, en los experimentos normalizados frente al pico 760.58, correspondían al tejido necrótico dentro del xenógrafo, mientras que GOI1 en ambas normalizaciones agrupaba los clústeres de tejido vascularizado.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

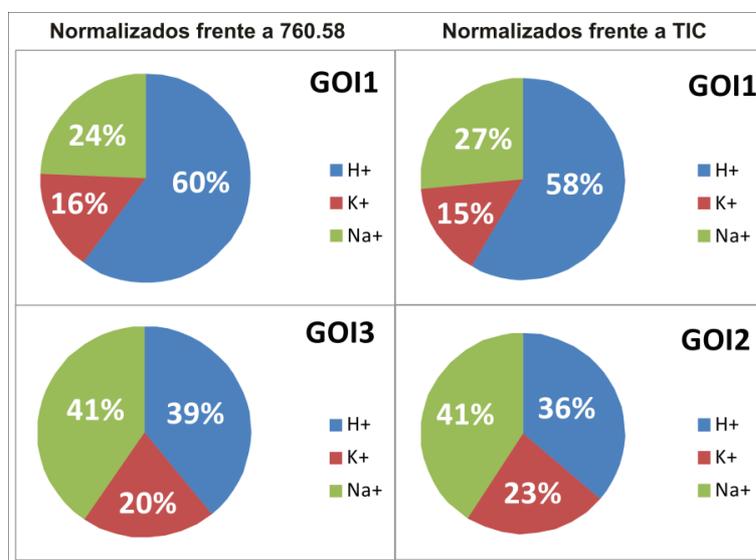


Fig 5.4.20. Relación de aductos en los grupos de interés obtenidos con las dos normalizaciones.

A continuación se analizó cada conjunto de datos por separado, en busca de diferencias entre las muestras tratadas y control.

Tabla 5.4.19. Resumen de los distintos análisis realizados sobre los espectros promedio de los clústeres de los xenografos en los grupos (GOIs) obtenidos en los análisis previos. Se muestran los grupos de experimentos que ha permitido obtener el análisis (GOIs), las componentes principales (CPs) que están implicadas en estas agrupaciones, el umbral de intensidad en % respecto al máximo del espectro promedio (%I), el tipo de datos (Datos), el tipo de normalización de los espectros (Norm.Espectros), el tipo de normalización de las variables (Norm.Picos) y los experimentos considerados atípicos (Outliers) en ese análisis y por tanto, eliminados del mismo.

Resultado	%I	Datos	Norm.Espectros	Norm.Picos	Outliers	
GOIs	CP					
X	X	1	GOI1(CP1)	760.58	No	
Control/Tratados	1	1	GOI1(CP1)	760.58	/St.Dev	
Control/Tratados	1	1	GOI1(CP1)	760.58	/St.Dev	T221_CI2, T121_CI3, C25u_CI1, T45u_CI2
X	X	1	GOI3(CP1)	760.58	No	
X	X	1	GOI3(CP1)	760.58	/St.Dev	
X	X	1	GOI1(CP1)	TIC	No	
Control/Tratados	1	1	GOI1(CP1)	TIC	/St.Dev	
Control/Tratados	1	1	GOI1(CP1)	TIC	/St.Dev	T221_CI2, T121_CI3, T421_CI1,

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

						T45u_C12, C121_C15, C25u_C11, C131_C12
X	X	1	GOI2(CP1)	TIC	No	
X	X	1	GOI2(CP1)	TIC	/St.Dev	
X	X	1	GOI1(CP2)	TIC	No	
X	X	1	GOI1(CP2)	TIC	/St.Dev	
X	X	1	GOI2(CP2)	TIC	No	
X	X	1	GOI2(CP2)	TIC	/St.Dev	

### 5.4.4.2.1. Normalización frente al pico 760.5851

#### GOI1 (tejido vascularizado):

El análisis por PCA de los clústeres pertenecientes al conjunto GOI1, obtenido con los datos normalizados frente al pico 760.5851, y sin normalizar las variables, no permitió una clasificación clara de los experimentos tratados y control, ya que dos de los picos, el 798.54 [PC 34:1 +H]<sup>+</sup> y el 782.57 [PC 34:1 + Na]<sup>+</sup> acumulaban todo el peso de la separación y enmascaraban cualquier otro tipo de diferencia.

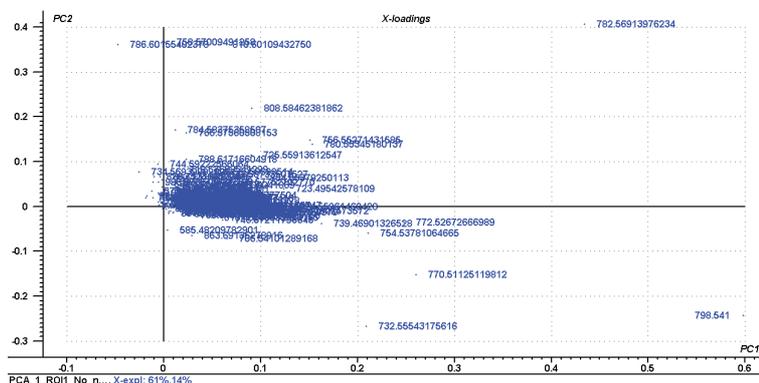


Fig 5.4.21. Loadings en la CP1 y en la CP2 en el análisis de los clústeres del GOI1, normalizados frente al pico 760.5851 y con las variables sin normalizar.

Sin embargo, el mismo análisis sobre los datos con las variables normalizadas respecto a su desviación estándar, resulta en una clara agrupación a lo largo de la CP1, solamente enturbiada por un reducido número de clústeres.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

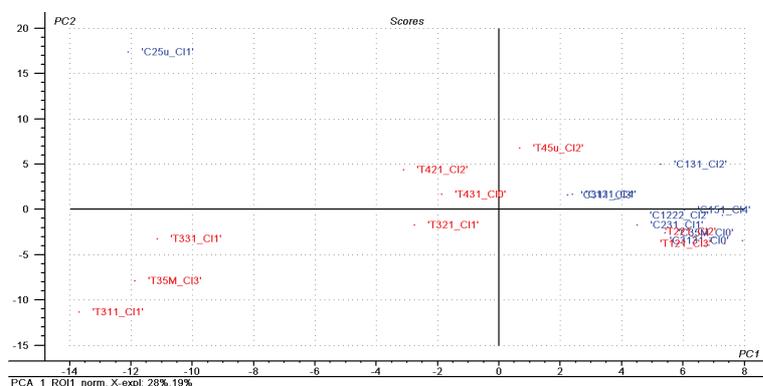


Fig 5.4.22. CP1 vs CP2 en el estudio de los clústeres del GOI1, normalizados respecto al pico 760,58 y tras normalizar las variables frente a su desviación estándar.

Al eliminar estos clústeres del análisis, se pudo agrupar por separado los experimentos control y tratados. (GOIs rojas y azules en la figura 5.4.23)

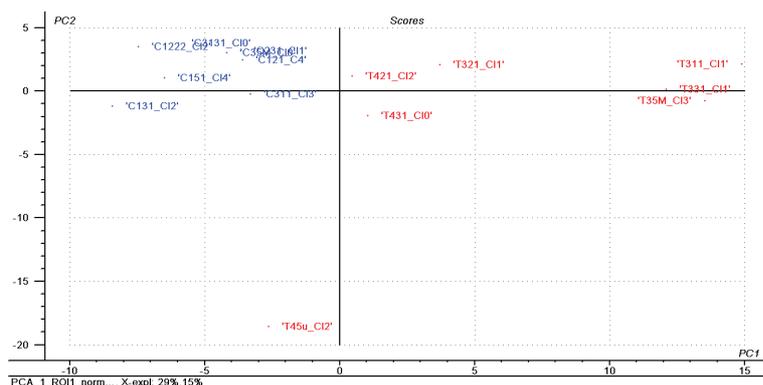


Fig 5.4.23. CP1 vs CP2 en el estudio de los clústeres del GOI1 normalizados respecto al pico 760,58, tras normalizar las variables frente a su desviación estándar y extraer los clústeres T221\_CI2, T121\_CI3, C25u\_CI1.

De esta forma fue posible determinar, tras extraer también el clúster T45u\_CI2, los picos que definieron esta separación. Es decir, aquellas especies lipídicas cuya intensidad, y por tanto, abundancia varía más entre tratados y controles.

En la figura 5.4.24 se muestra la proyección sobre las CP1 y CP2 de todos los picos empleados para la clasificación entre controles y tratados de la figura 5.4.23. Se observó un gran número de picos agrupados marcando la dirección de la CP1 en la que se encontraban los experimentos tratados y un grupo más reducido en la dirección opuesta, donde se sitúan los clústeres de muestras control. Estos grupos de picos son los que permitieron clasificar controles y tratados, aumentando su intensidad relativa en el conjunto de muestras cuya proyección aparece en la misma dirección de la figura. En la figura 5.4.25 se muestra la diferencia entre controles y tratados de las especies más relacionadas con la agrupación de los clústeres tratados en el análisis y en la figura 5.4.26, se muestra

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

esta variación para un valor estandarizado de 1 en el promedio de los experimentos control. Algunas especies, que presentan una gran desviación estándar en los resultados de la figura 5.4.26, corresponden a especies muy poco intensas, como se ve en la figura 5.4.25. En la figura 5.4.27 se puede ver la diferencia entre controles y tratados de las especies que agrupan los experimentos control y en la figura 5.4.28 se muestra esta variación para un valor normalizado de 1 en el promedio de los experimentos tratados. En los experimentos tratados, se observó un aumento en la abundancia de numerosas especies, principalmente PCs y PAs poco abundantes, que formaban aductos con  $\text{Na}^+$  y con  $\text{K}^+$ , mientras que en los experimentos control tan solo se apreció un ligero aumento en TAGs y en el pico 575.52, que no fue posible identificar.

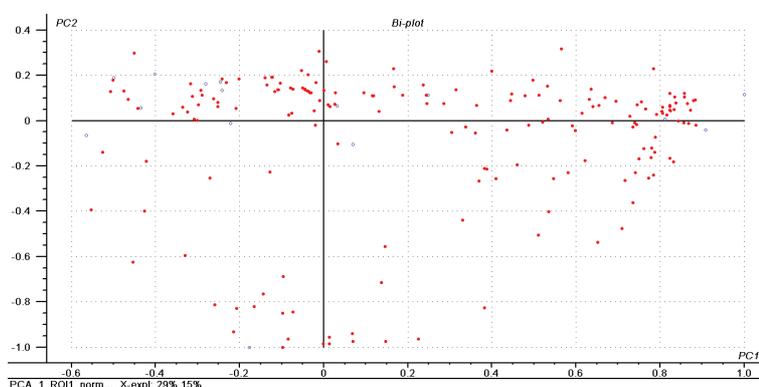


Fig 5.4.24. Variables, o loadings, en la CP1 y en la CP2 en el análisis de los clústeres del GO11 normalizados respecto al pico 760,58, tras normalizar las variables frente a su desviación estándar y extraer los clústeres T221\_CI2, T121\_CI3, C25u\_CI1.

**CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS**

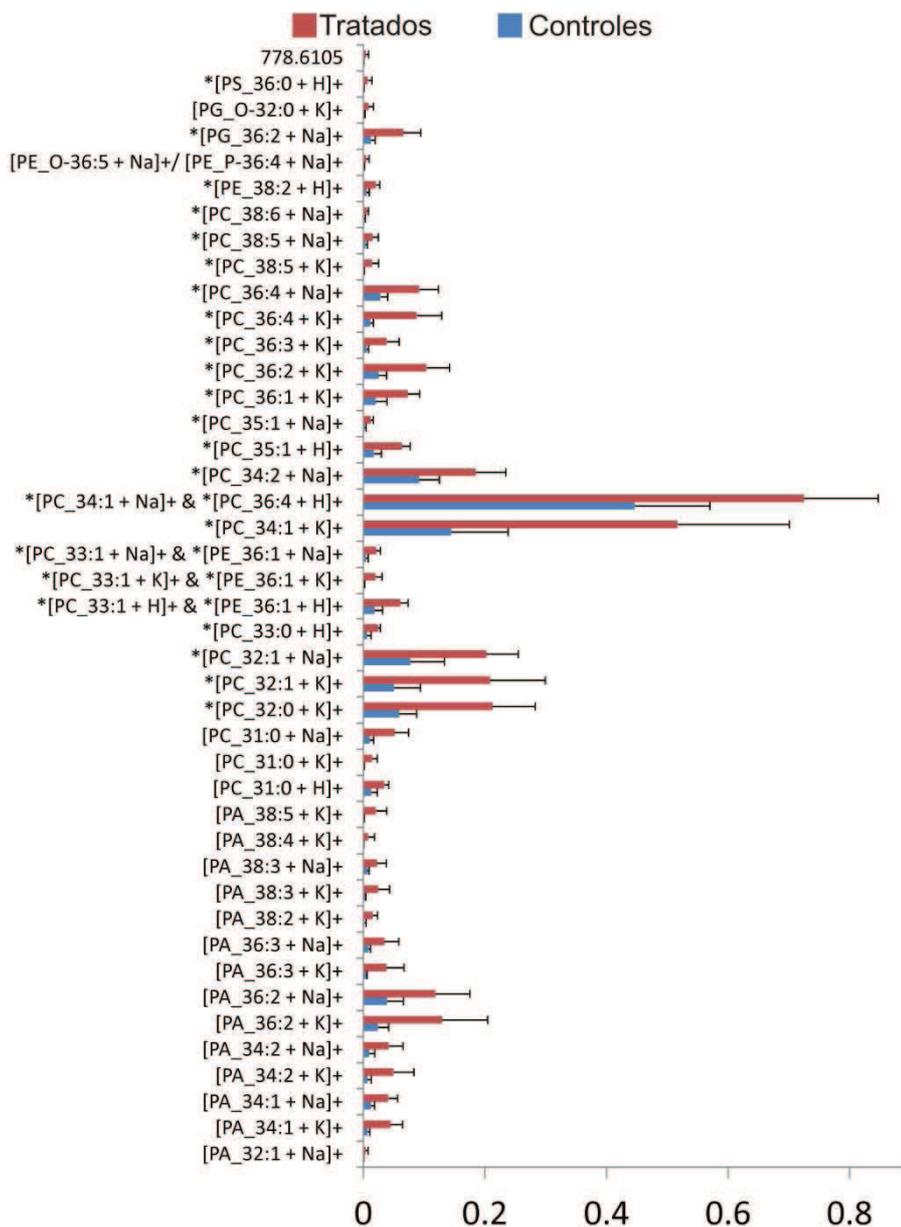


Fig 5.4.25. Comparación entre las intensidades promedio de las especies que más aumentan en los experimentos tratados, en el GO11, con los espectros normalizados frente al pico 760.5851.\* Especies confirmadas mediante UHPLC-ESI-MS.

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

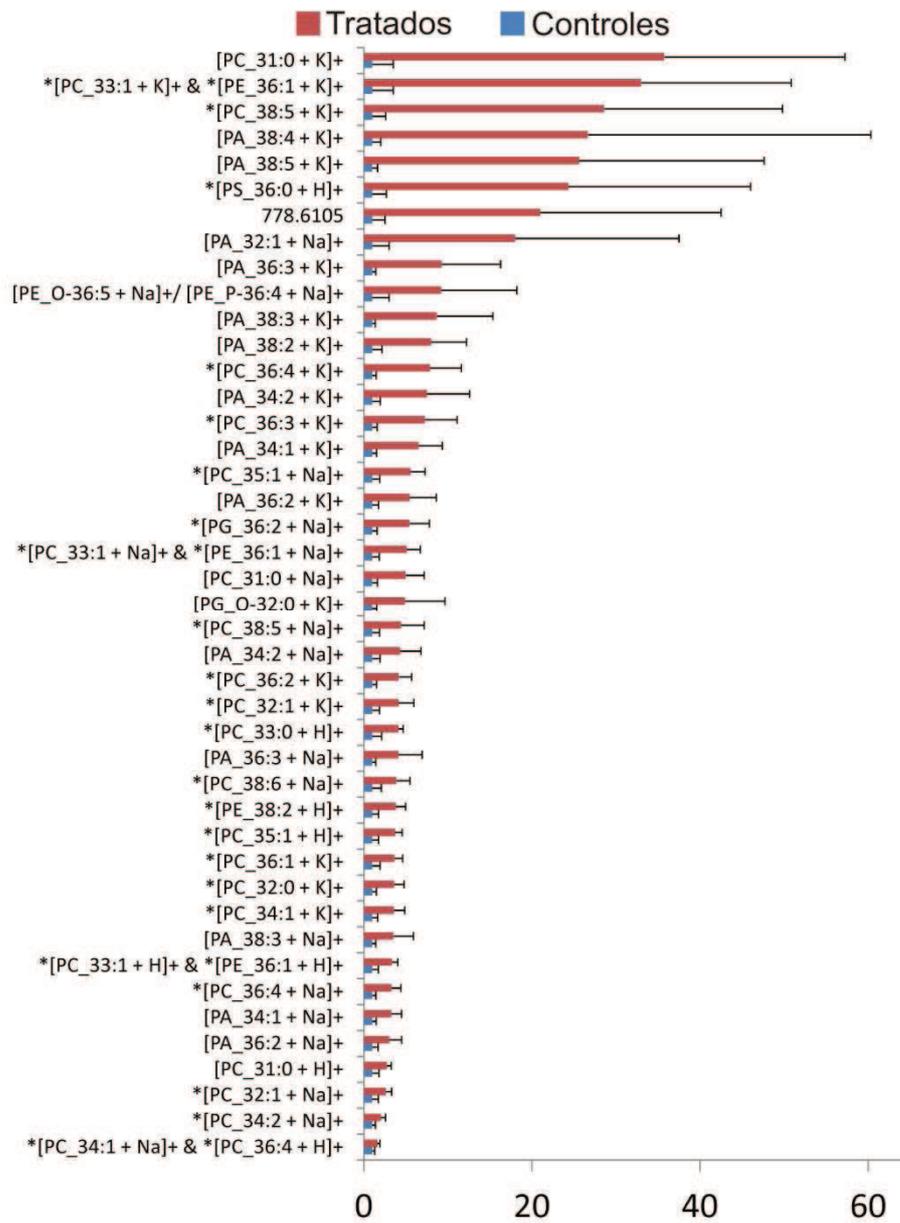


Fig 5.4.26. Aumento en las intensidades promedio de las los experimentos tratados para un valor normalizado de 1 en los controles, en el GO11, con los espectros normalizados frente al pico 760.5851. \* Especies confirmadas mediante UHPLC-ESI-MS.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

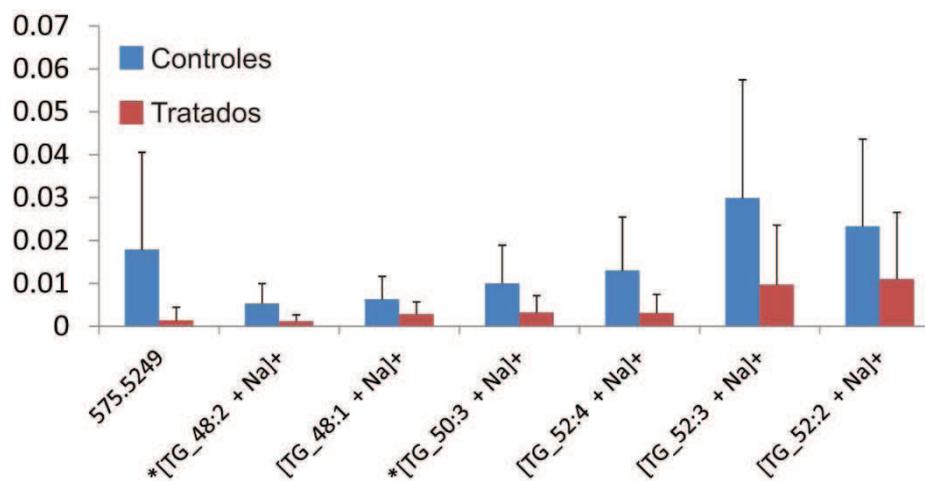


Fig 5.4.27. Comparación entre las intensidades promedio de los picos que disminuyen en los experimentos tratados, en el GOI1, con los espectros normalizados frente al pico 760.5851. \* Especies confirmadas mediante UHPLC-ESI-MS.

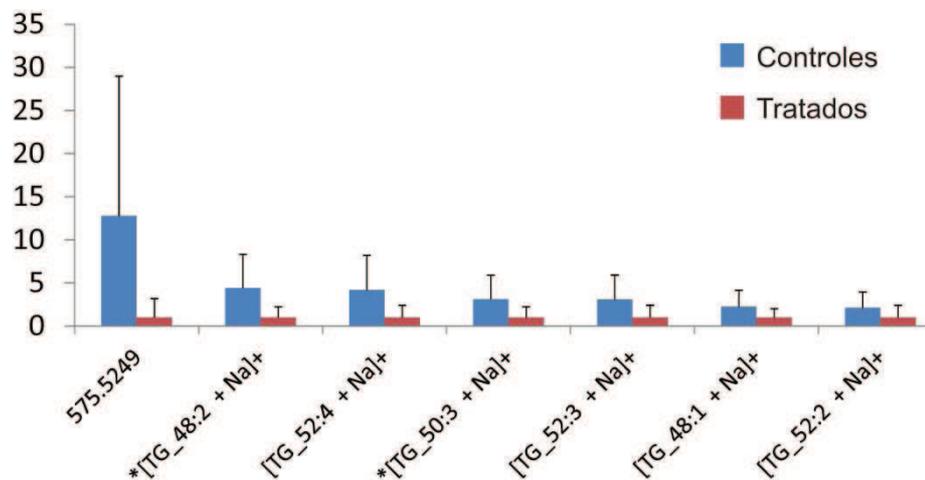


Fig 5.4.28. Aumento en las intensidades promedio de las los experimentos control para un valor normalizado de 1 en los tratados, en el GOI1, con los espectros normalizados frente al pico 760.5851. \* Especies confirmadas mediante UHPLC-ESI-MS.

### GOI3 (Tejido necrótico):

El mismo análisis realizado sobre los clústeres del conjunto GOI3, figura 5.4.29, no permitió distinguir controles de tratados, tanto con las variables normalizadas como sin normalización. En el segundo caso si se apreciaba una ligera diferenciación pero era fundamentalmente debida a un único pico, el 798.541 del PC 34:1 + K<sup>+</sup>. Esto confirma que en este tipo de estudios, es necesaria una clasificación previa de los tipos de tejido en cada muestra.

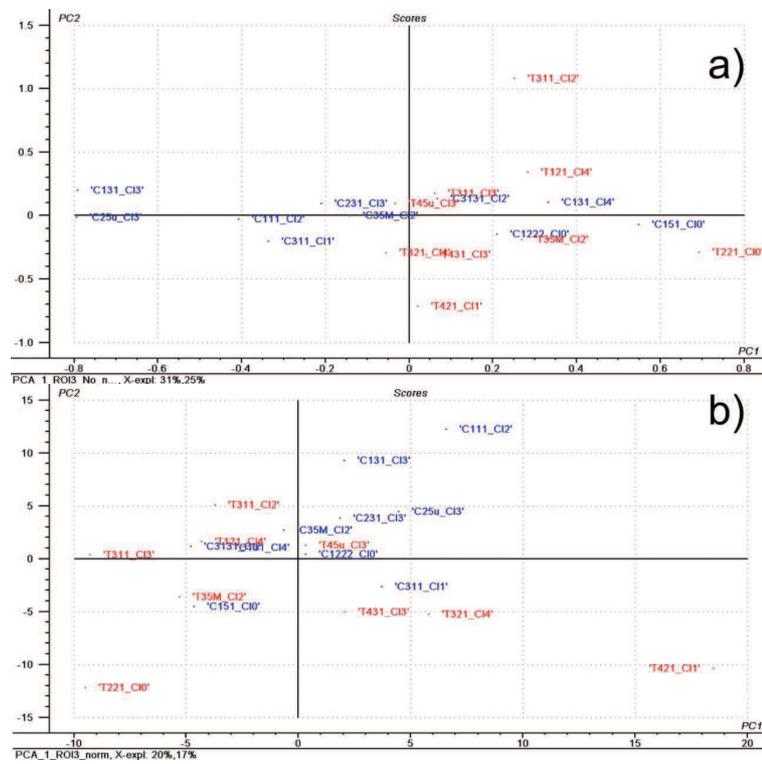


Fig 5.4.29. CP1 vs CP2 en el estudio de los clústeres del GOI3 normalizados frente al TIC. a) sin normalizar las variables. b) Tras normalizar las variables frente a su desviación estándar.

#### 5.4.4.2.2. Normalización frente al TIC

Al normalizar los espectros frente a un pico determinado, lo que realmente se está observando es el cambio de la relación Intensidad del pico/Intensidad del pico de referencia. Es posible, por tanto, que el aumento de la intensidad de un conjunto de picos se deba más a una disminución de la intensidad del pico de referencia que a un aumento real de todos los demás picos. Para descartar que las diferencias observadas entre experimentos control y tratados sean debidas a la normalización de los espectros, se repitió el análisis con los espectros normalizados frente al TIC, es decir, dividiendo cada canal másico entre la suma total de iones del espectro, simulando así que todos los espectros tienen una cantidad total de iones detectados similar. Con esta normalización no es posible apreciar variaciones en la cantidad de iones a lo largo del tejido, lo que puede generar artefactos.

El análisis de los conjuntos de clústeres separados por la CP2, figura 5.4.19.a, resultó infructuoso, tal y como se aprecia en las figuras 5.4.30 y 5.4.31, donde no se aprecia separación entre tratados y controles.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

### GOI1(CP2):

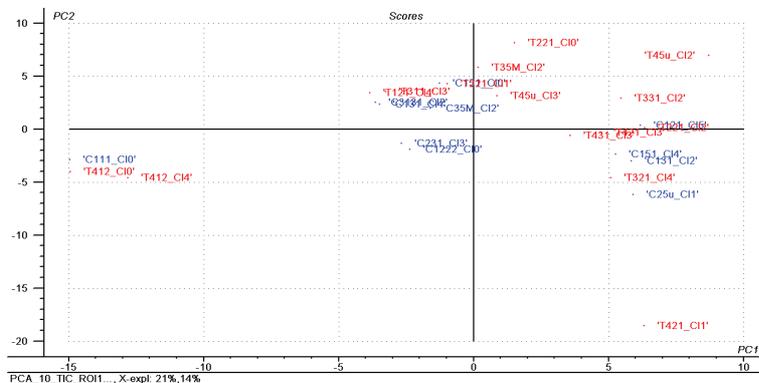


Fig 5.4.30. CP1 vs CP2 en el estudio de los clústeres del GOI1(CP2), normalizados frente al TIC y tras normalizar las variables frente a su desviación estándar.

### GOI2(CP2):

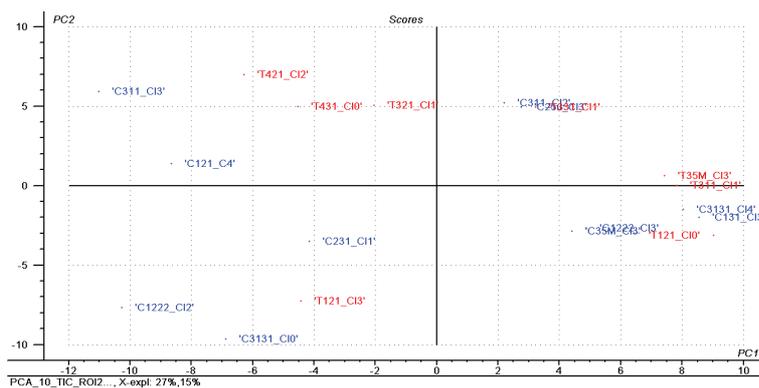


Fig 5.4.31. CP1 vs CP2 en el estudio de los clústeres del GOI2(CP2), normalizados frente al TIC y tras normalizar las variables frente a su desviación estándar.

A continuación se estudiaron los conjuntos de datos diferenciados en la CP1, figura 5.4.19.b, obteniendo una buena clasificación de controles y tratados en el GOI1. El análisis sobre los clústeres del GOI2 no permitió distinguirlos.

### GOI1(CP1) (Tejido vascularizado):

Al hacer el análisis con las variables sin normalizar, la gran intensidad del pico 760.5851, desplazó el análisis en la dirección de la CP1. Por tanto, a pesar de que se observó cierta diferencia entre controles y tratados, figura 5.4.32, se repitió el análisis normalizando las variables frente a su desviación estándar. En esta ocasión, figura 5.4.33, se mantuvo la separación entre controles y tratados, excepto por unos pocos clústeres, pero se apreció un mayor número de picos contribuyendo a la separación. Se eliminaron los clústeres que se salían de la

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

norma y se repitió el análisis, figura 5.4.34. Finalmente se pudieron separar claramente un grupo de clústeres control por un lado y otro de clústeres tratados. Del análisis de las variables, o *loadings*, se pudo deducir un conjunto de picos que aumentaban en los tratados y otro conjunto que disminuía.

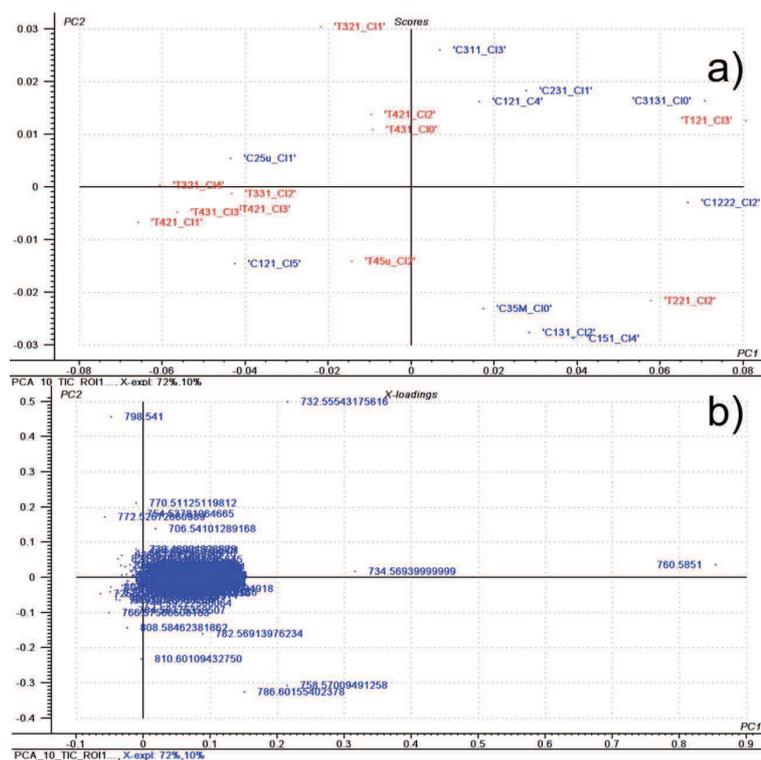


Fig 5.4.32. CP1 vs CP2 en el estudio de los clústeres del GO11(CP1) normalizados frente al TIC sin normalizar las variables. a) Clústeres b) Variables.



## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

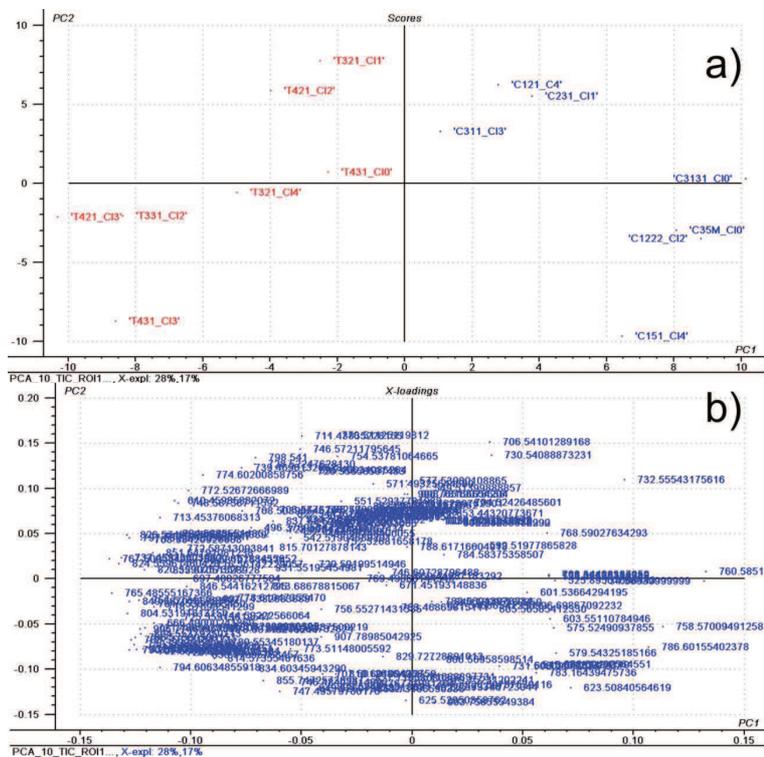


Fig 5.4.34. CP1 vs CP2 en el estudio de los clústeres del GOI1(CP1) normalizados frente al TIC tras normalizar las variables frente a su desviación estándar y tras extraer del análisis los clústeres T221\_C2, T121\_C3, T421\_C1, T45u\_C2, C121\_C5, C25u\_C1 y C131\_C2. a) Clústeres. b) Variables.

**CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS**

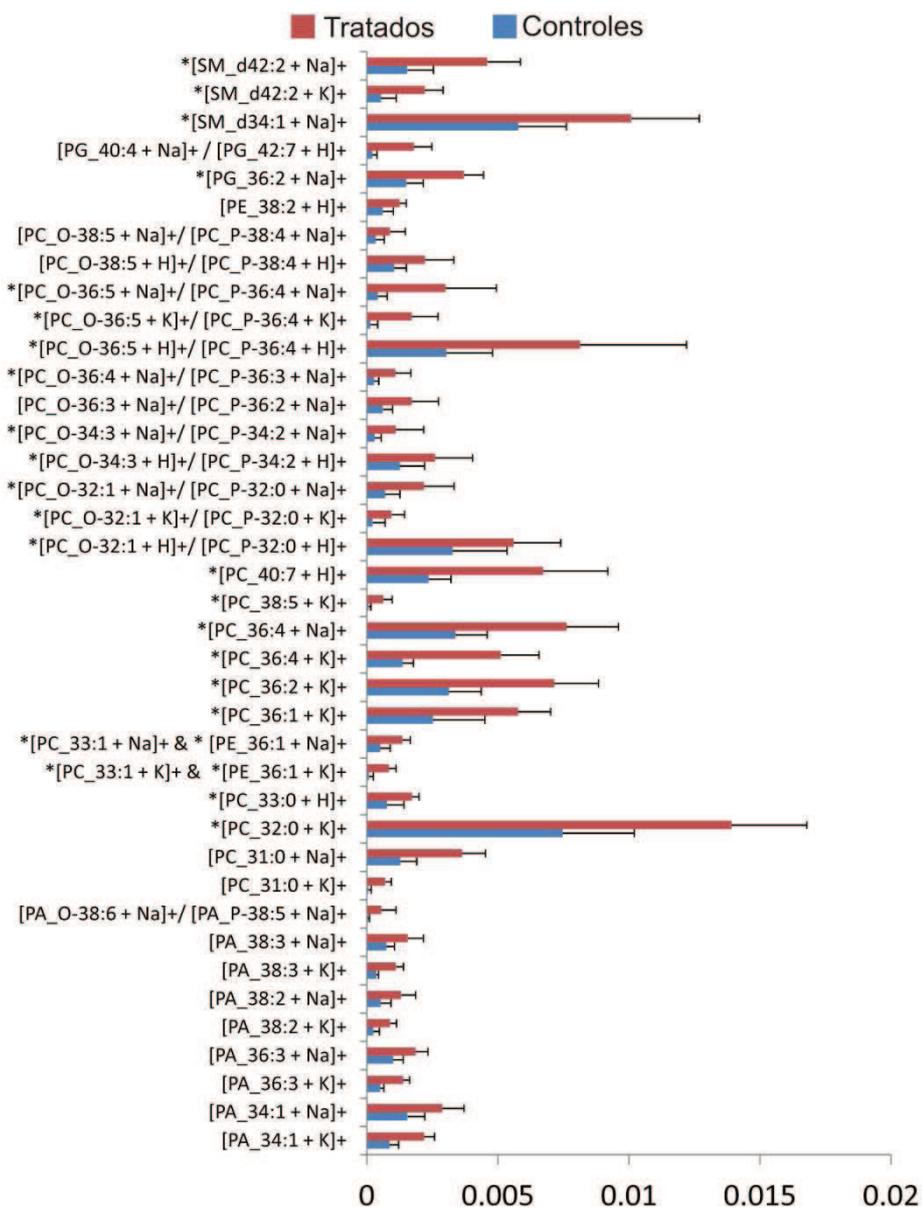


Fig 5.4.35. Comparación entre las intensidades promedio de los picos que aumentan los experimentos tratados, en el GO1, con los espectros normalizados frente al TIC. \* Especies confirmadas mediante UHPLC-ESI-MS.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

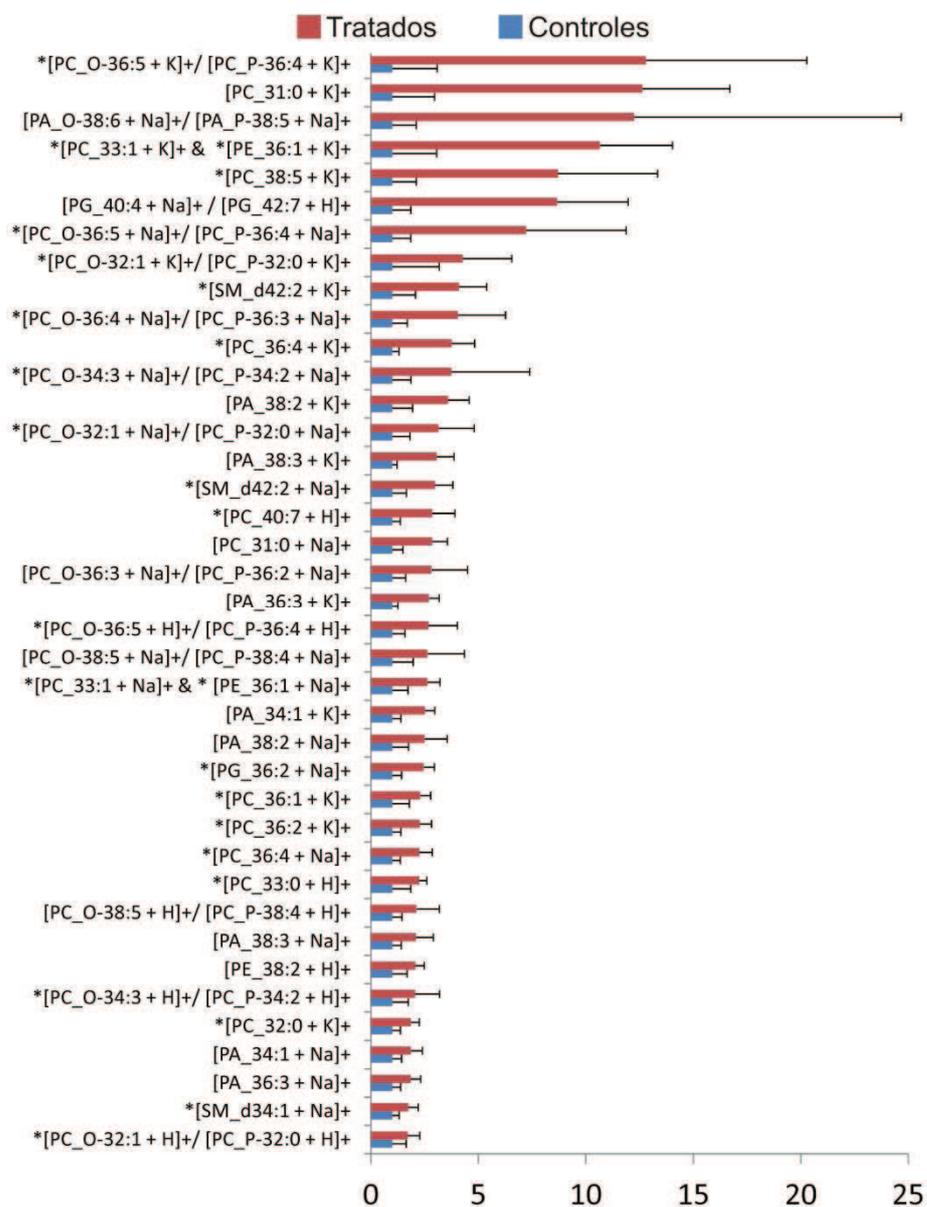


Fig 5.4.36. Aumento en las intensidades promedio de las los experimentos tratados para un valor normalizado de 1 en los controles, en el GO11, con los espectros normalizados frente al TIC. \* Especies confirmadas mediante UHPLC-ESI-MS.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

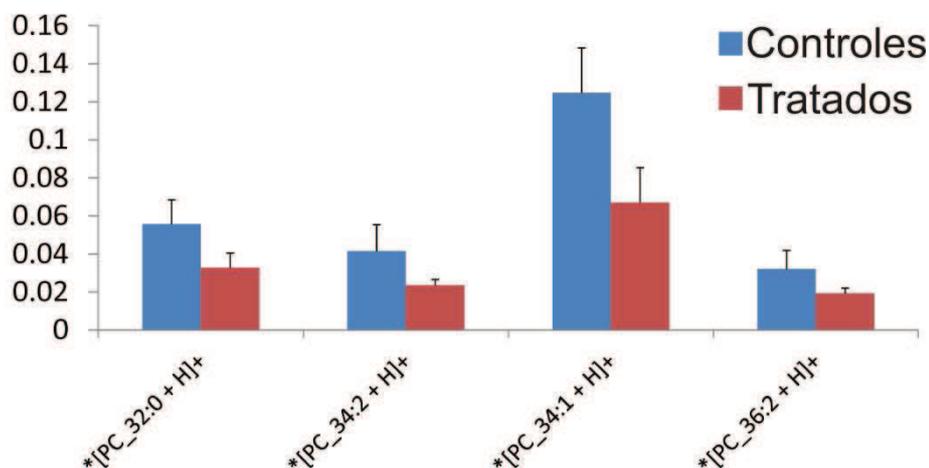


Fig 5.4.37. Comparación entre las intensidades promedio de los picos que disminuyen en los experimentos tratados, en el GOI1, con los espectros normalizados frente al TIC. \* Especies confirmadas mediante UHPLC-ESI-MS.

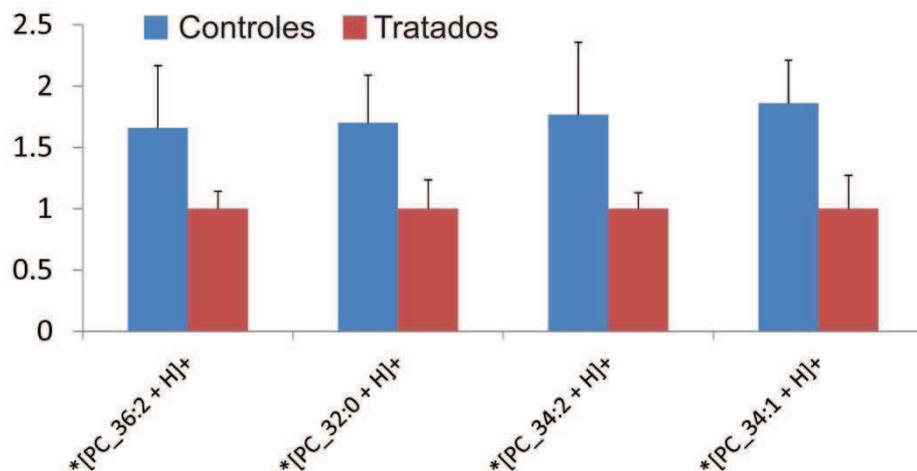


Fig 5.4.38. Aumento en las intensidades promedio de las los experimentos control para un valor normalizado de 1 en los tratados, en el GOI1, con los espectros normalizados frente al TIC. \* Especies confirmadas mediante UHPLC-ESI-MS.

### GOI2(CP1) (Tejido necrótico):

Al analizar los datos normalizando las variables frente a la desviación estándar y sin normalizarlas no fue posible distinguir las muestras control de las tratadas en los clústeres agrupados en el GOI2 de la CP1 de los datos normalizados usando el algoritmo TIC.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

### 5.4.4.3. Estudio de los aductos

Se observó que los cuatro picos que disminuyeron en los clústeres tratados en el GO11 al normalizar los espectros usando el TIC, correspondían a los aductos protonados de la PC 32:0, la PC 34:2, la PC 34:1 y la PC 36:2. Es decir, aparentemente, la diferencia entre experimentos control en el GO11 no se debió a cambios en la proporción relativa de las especies, sino de sus aductos. A su vez, se constató en ambos análisis que los picos que más aumentaron en los experimentos tratados del GO11 eran precisamente los aductos con Na<sup>+</sup> y con K<sup>+</sup> de PCs y PAs, reforzando la hipótesis de los cambios en los aductos.

Se observó que la mayor parte de los clústeres seleccionados para la GO11 de uno y otro método de normalización coincidían (tabla 5.4.20). Es decir, ambos conjuntos estaban describiendo el tejido vascularizado dentro del xenógrafo. Las diferencias observadas entre ambas listas se deben principalmente a que en la normalización frente al pico 760.58 se amplifica la influencia de los aductos, al relativizar todas las intensidades a la de un único aducto.

Tabla 5.4.20. Comparación de los clústeres que componen el GO11 obtenida normalizando los espectros frente al pico 760.5851 y respecto al TIC, en verde se muestran aquellos que coinciden en ambos tipos de normalización.

vs760.58	vsTIC
'C121_C4'	'C121_C4'
'C1222_C12'	'C1222_C12'
'C131_C12'	'C151_C14'
'C151_C14'	'C231_C11'
'C231_C11'	'C311_C13'
'C311_C13'	'C3131_C10'
'C3131_C10'	'C35M_C10'
'C35M_C10'	'T321_C11'
'T311_C11'	'T321_C14'
'T321_C11'	'T331_C12'
'T331_C11'	'T421_C12'
'T35M_C13'	'T421_C13'
'T421_C12'	'T431_C10'
'T431_C10'	'T431_C13'

Dado que, ni en el resto de clústeres de los xenografos, ni en los promedios, fue posible distinguir experimentos control de experimentos tratados, se concluyó que las variaciones provocadas por el tratamiento se daban únicamente en una de las áreas de interés de los xenógrafos: la correspondiente al tejido vascularizado. Además, se observó que algunos de los picos que más influían en esta diferenciación no eran otros que los diferentes aductos de fosfatidilcolinas. Por lo tanto, se estudió la relación de aductos de varias fosfatidilcolinas en las diferentes regiones y en los espectros promedio.

**CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS**

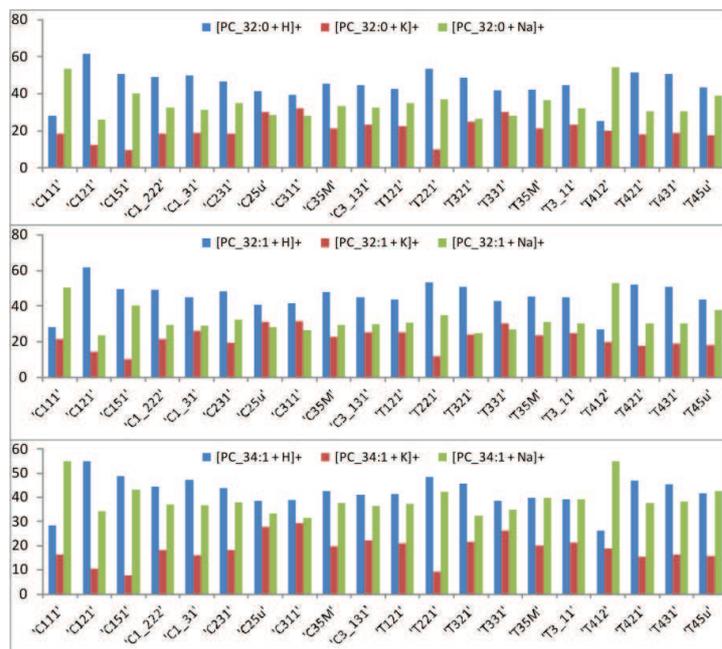


Fig 5.4.39. Comparación entre los tres aductos de tres fosfatidilcolinas diferentes en los espectros promedio normalizados usando el TIC.

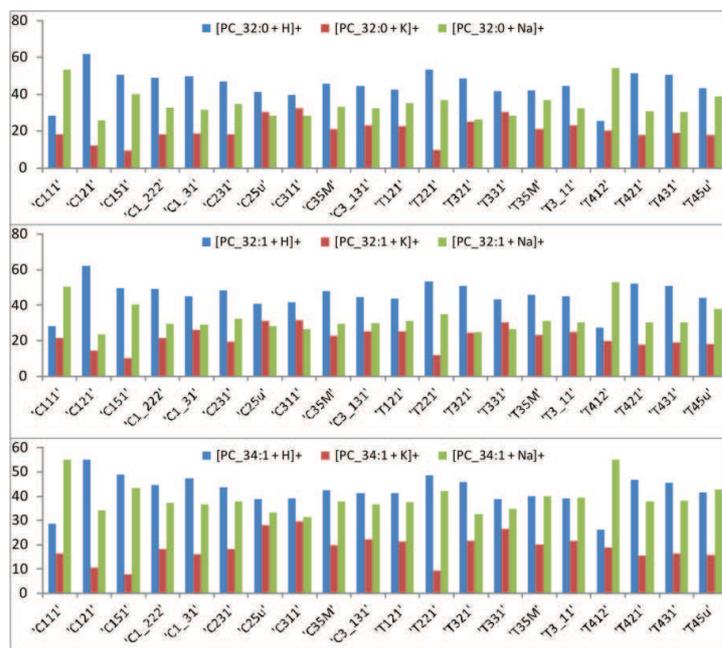


Fig 5.4.40. Comparación entre los tres aductos de tres fosfatidilcolinas diferentes en los espectros promedio normalizados frente al pico 760.5851.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

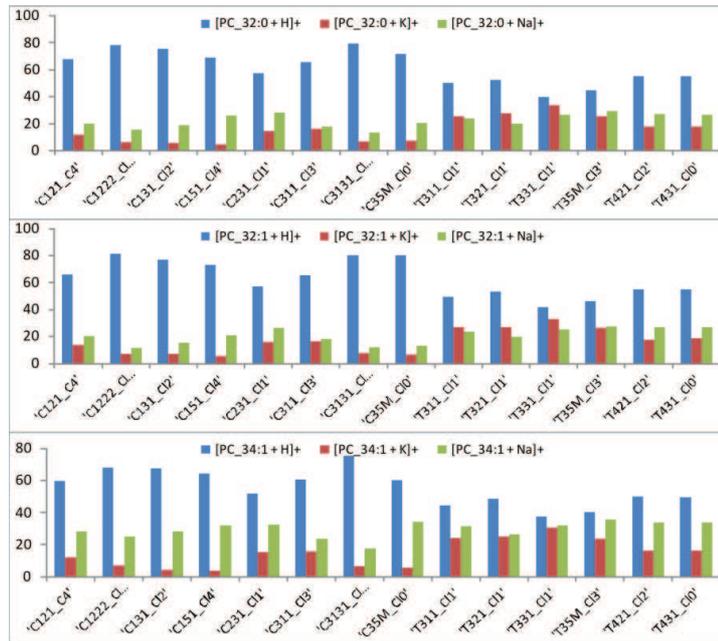


Fig 5.4.41. Comparación entre los tres aductos de tres fosfatidilcolinas diferentes en los espectros promedio de los clústeres del GOI1 normalizados frente al pico 760.5851.

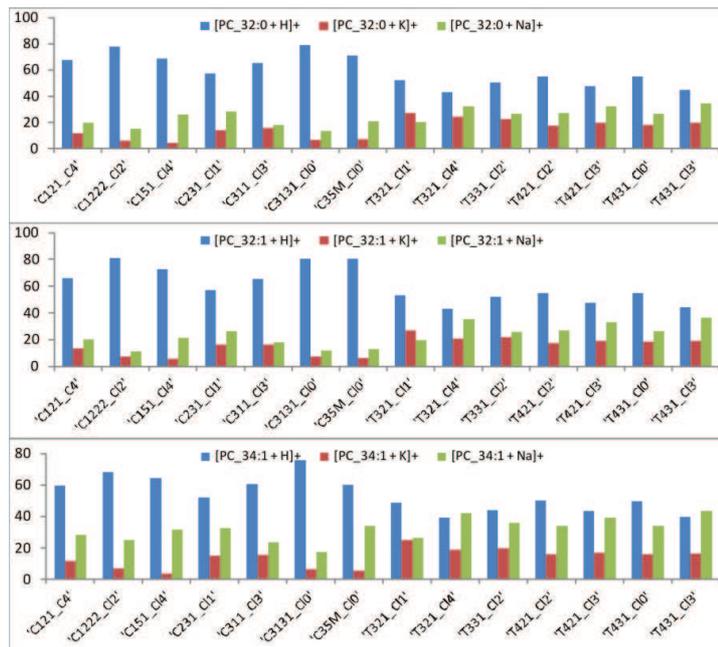


Fig 5.4.42. Comparación entre los tres aductos de tres fosfatidilcolinas diferentes en los espectros promedio de los clústeres del GOI1 normalizados usando el TIC.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

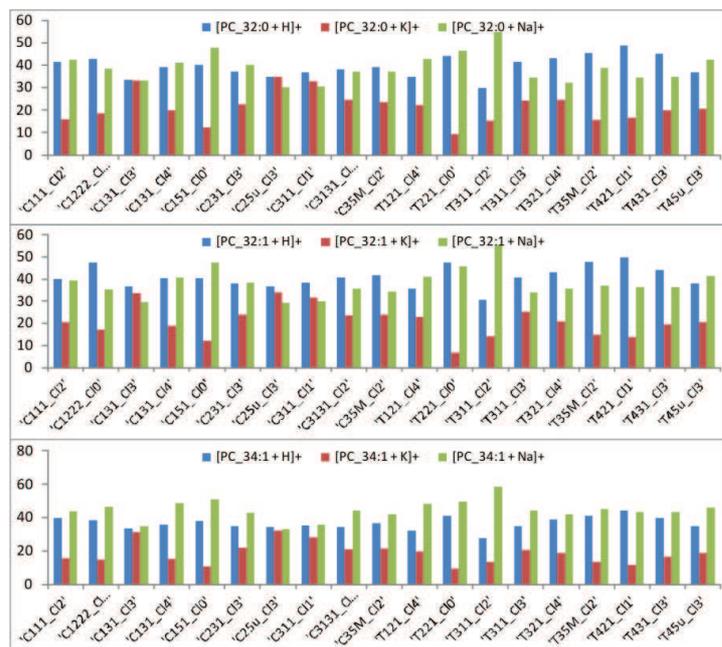


Fig 5.4.43. Comparación entre los tres aductos de tres fosfatidilcolinas diferentes en los espectros promedio de los clústeres del GOI3 normalizados frente al pico 760.5851.

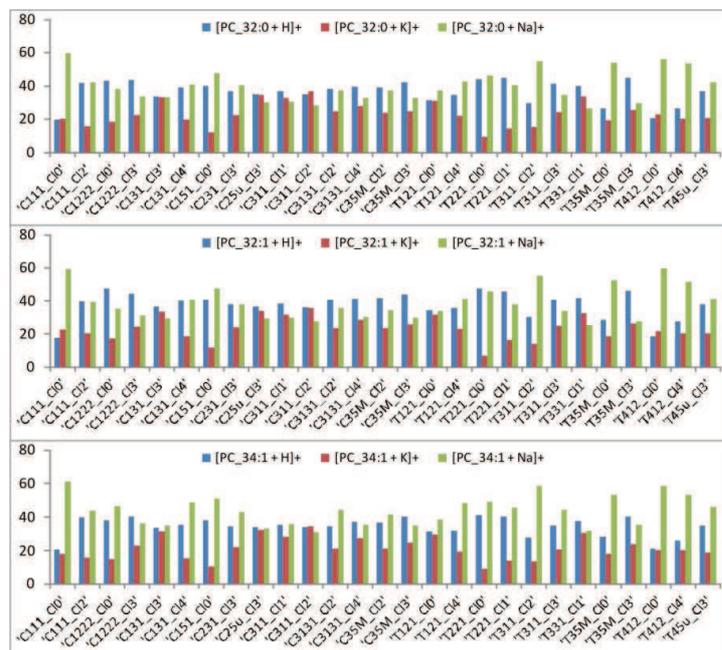


Fig 5.4.44. Comparación entre los tres aductos de tres fosfatidilcolinas diferentes en los espectros promedio de los clústeres del GOI2 normalizados usando el TIC.

Tanto en los promedios, figuras 5.4.39 y 5.4.40, como en el GOI3 de los espectros normalizados frente al pico 760.5851, figura 5.4.43, como en el GOI2 de los espectros normalizados usando el TIC, figura 5.4.44, la relación entre aductos no varía entre experimentos control y experimentos tratados. Sin embargo, en el GOI1 de los espectros normalizados frente al pico 760.5851, 5.4.41, como en el GOI1 de los espectros normalizados usando el TIC, fig 5.4.42, que representan el mismo tipo de tejido dentro del xenógrafo, se observaba una clara diferencia en la relación entre los tres aductos de los experimentos control y tratados. En los experimentos tratados se apreciaba un claro incremento de los aductos con potasio y una disminución en la abundancia relativa de los aductos protonados. Por tanto, únicamente una de las áreas estudiadas, la vascularizada, presentó diferencias entre los experimentos control y tratados, y estas diferencias parecen debidas a una distinta relación entre los aductos con  $H^+$ ,  $K^+$  y  $Na^+$  formados por los lípidos. Es posible que esta diferencia entre los aductos enmascare diferencias más pequeñas, debidas a la composición lipídica por lo que se consideró interesante repetir el estudio empleando la suma de los aductos de cada especie.

#### 5.4.4.4. Eliminación de la influencia de los aductos

La resolución obtenida en los espectros de masas, aunque buena, no permitió resolver todos los aductos, de forma que en muchos casos un pico contiene contribuciones de más de una especie. Se obtuvieron extractos de ambos tipos de xenógrafo y se analizaron por UHPLC-MS<sup>E</sup> para hacer la asignación definitiva de los lípidos. Así se pudo conseguir una asignación más precisa, y reducir el número de candidatos, para aquellos canales másicos con contribución de más de una especie. Aun así, se demostró que algunos canales másicos contenían la contribución de dos o más especies. Tal y como se hizo previamente en el estudio de los éteres de PC y PE, en el apartado 5.4.3, se empleó un programa diseñado en Matlab, apartado 3.5.1.1.1, para calcular, de forma aproximada, la contribución de varias especies a la intensidad de un único canal másico. El principal problema para hacer este cálculo residió en la dificultad, aun teniendo los resultados de UHPLC-MS<sup>E</sup>, de obtener alguna especie con al menos dos de sus aductos en canales másicos no ocupados, para cada clase de lípido. Sobre todo para clases de lípidos con abundancias relativas muy bajas. En el caso de las PCs sin embargo, fue posible aislar los suficientes pares de aductos como para poder recalcular las intensidades relativas de cada especie y desentrañar, con este dato, la contribución de los aductos para cada especie de PC.

Empleando estas sumas de intensidades fue posible hacer un estudio por componentes principales de las muestras control y las muestras tratadas, utilizando como variables las especies de PC, en lugar de los canales másicos.

##### 5.4.4.4.1. Comparación de los espectros promedio, solo PCs

Al igual que en el estudio anterior, en el que se emplearon los canales másicos como variables, se empezó por hacer un PCA utilizando las abundancias relativas

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

de las PCs en los espectros promedio de todo el tejido, normalizados frente al TIC y frente al pico 760.58, para cada una de las muestras.

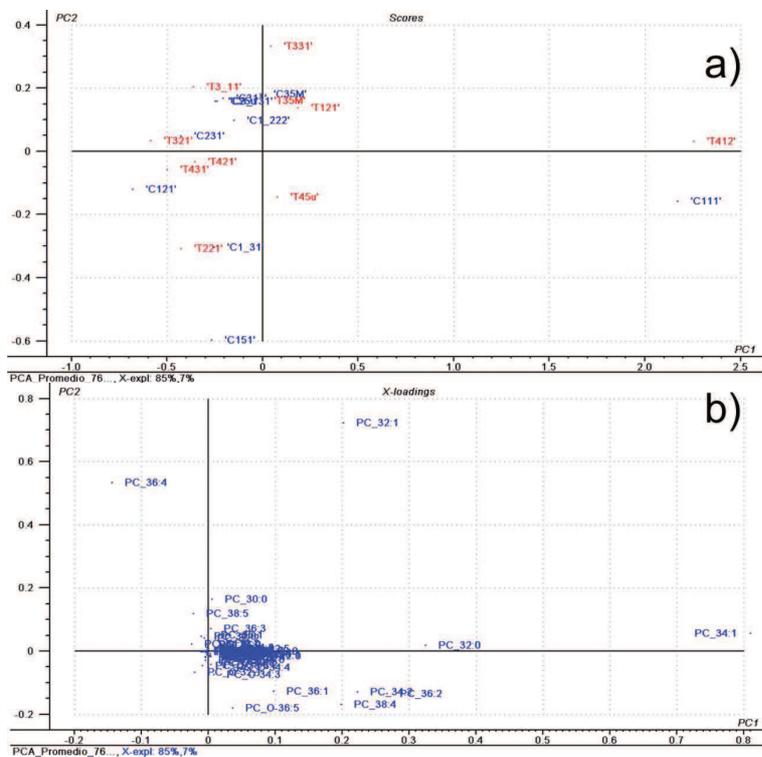


Fig 5.4.45. PCA de espectros promedio normalizados frente al pico 760.58, empleando como variables la suma de las abundancias relativas para cada especie de PC sin normalizar. a) Scores o muestras. b) Variables.

Cuando se analizaron los datos de los espectros promedio normalizados frente al pico 760.58, no se observó en ningún caso ningún tipo de clasificación de las muestras control o de las tratadas, figura 5.4.45.a. Dos experimentos, un control y un tratado, se alejaban mucho del comportamiento del resto a lo largo de la CP1. Como se ve en la figura 5.4.45.b, la especie PC 34:1 tiene mucho peso en la dirección de la componente principal 1, debido a que es, con diferencia, la especie más abundante en el espectro. Al igual que en el caso del estudio empleando los canales másicos, para determinar si alguna de las otras especies lipídicas menos abundantes presentaba un comportamiento capaz de diferenciar muestras control de muestras tratadas, fue preciso escalar las variables a valores en el mismo orden de magnitud, dividiendo las variables entre su desviación estándar a lo largo de todo el conjunto de muestras, figura 5.4.46.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

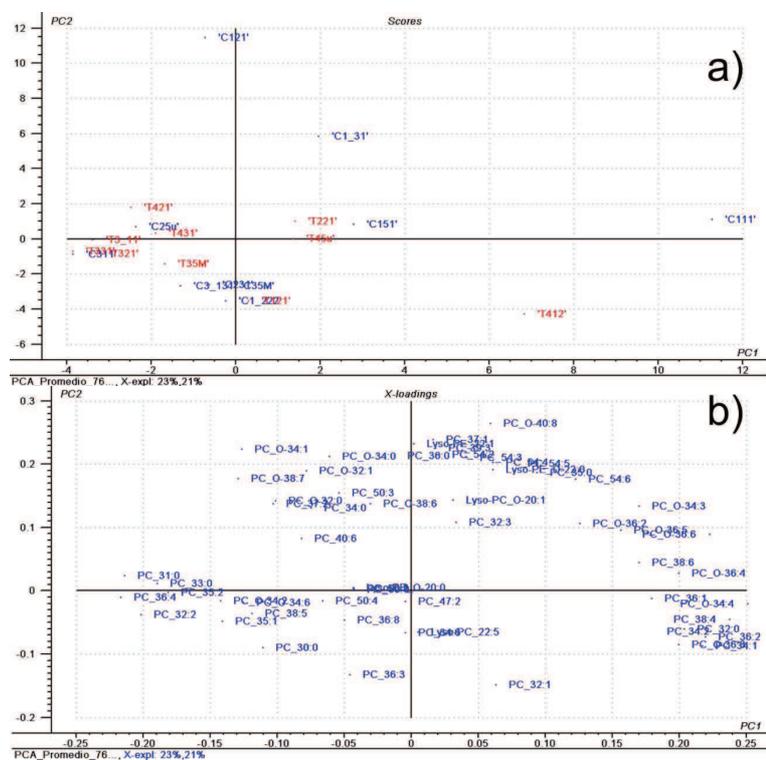


Fig 5.4.46. PCA de espectros promedio normalizados frente al pico 760.58 y empleando como variables la suma de las abundancias relativas para cada especie de PC normalizadas frente a la desviación estándar en todo el conjunto de muestras. a) Scores o muestras. b) Variables.

Sin embargo, esta normalización tampoco permitió distinguir las muestras control de las muestras tratadas, figura 5.4.46.a.

Al repetir el PCA empleando los datos obtenidos de los espectros normalizados frente al TIC tampoco fue posible diferenciar controles de tratados, figura 5.4.47, tanto si se empleaban las variables sin normalizar como si se normalizaban frente a su desviación estándar.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

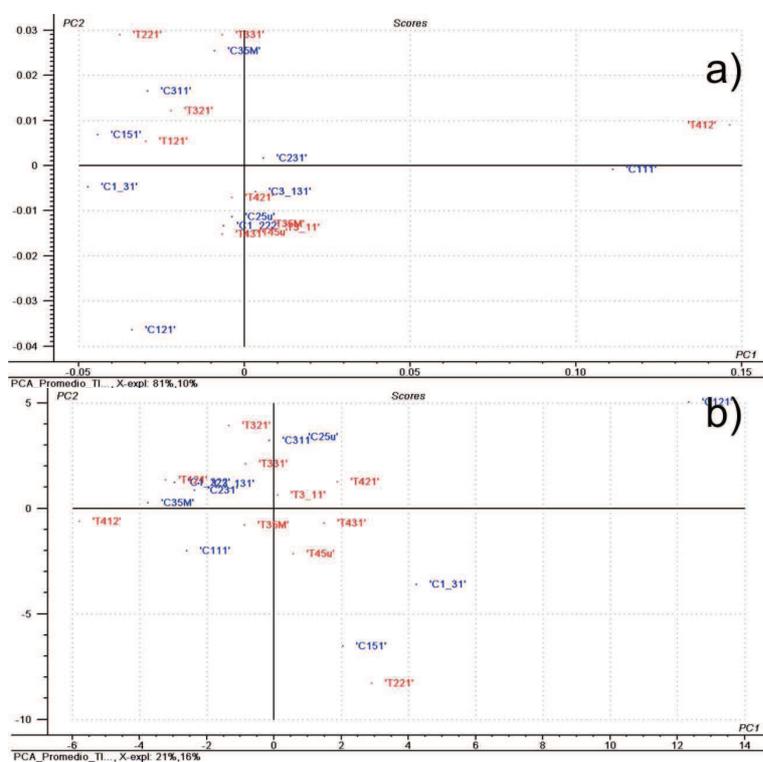


Fig 5.4.47. PCA de espectros promedio normalizados frente al TIC y empleando como variables la suma de las abundancias relativas para cada especie de PC. a) Análisis sin normalizar. b) Normalizando frente a la desviación estándar en todo el conjunto de muestras.

### 5.4.4.4.2. Estudio por regiones de interés, solo PCs

Una vez comprobado que empleando los espectros promedio de todo el tejido es imposible distinguir muestras control de muestras tratadas, se pasó a estudiar los espectros promedio de los clústeres en cada tejido, dando por buenos los grupos de clústeres determinados mediante PCA con los canales másicos como variables, para determinar si mediante PCA es posible distinguir controles de tratados en los GOI 1 y 2 de los experimentos normalizados usando el TIC y en los GOI 1 y 3 de los experimentos normalizados respecto al pico 760.5851, utilizando la suma de las abundancias relativas de las PCs.

#### 5.4.4.4.2.1. Experimentos normalizados frente al pico 760.5851

##### GOI 1

A simple vista, figura 5.4.48, y salvo por las muestras control C131\_CI2 y C151\_CI4, que se apartaron de la tendencia general del resto de muestras, se observó una clara separación a lo largo de la CP1 entre los experimentos control y los tratados. Sin embargo aparentemente esta separación se debió únicamente a

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

las variables más abundantes, PC 34:1, PC32:0, PC 32:1. Repitiendo el PCA con las variables reescaladas empleando la desviación estándar, figura 5.4.49, se observó una clara separación entre muestras control y tratadas a lo largo de la CP2, exceptuando los experimentos C131\_CI2 y C311\_CI3, que se apartaron del comportamiento general. Rehaciendo el análisis excluyendo dichos experimentos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 5.4.50, donde se observa una clara separación entre controles y tratados, definida por un numeroso grupo de especies de PC, que marcan la orientación en la CP1 hacia la que se agrupan los experimentos tratados y un grupo más reducido en la dirección en la que se encuentran los experimentos control, tabla 5.4.21. Muchas de estas especies son muy poco abundantes y es posible que en muchos experimentos quedaran excluidas al estar su intensidad por debajo del 1% de la intensidad máxima del espectro. Es recomendable repetir el análisis eliminando todos estos picos poco reproducibles ya que pueden conducir a falsas conclusiones.

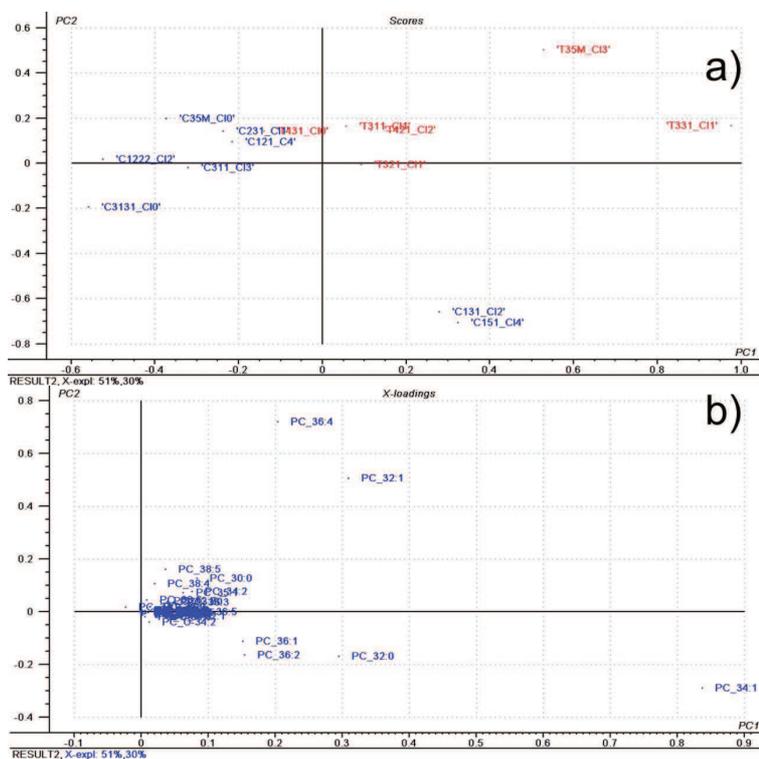


Fig 5.4.48. PCA de clústeres en el GOI1 de los experimentos normalizados frente al pico 760.58 y empleando como variables la suma de las abundancias relativas para cada especie de PC. a) Scores o muestras. b) Variables.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

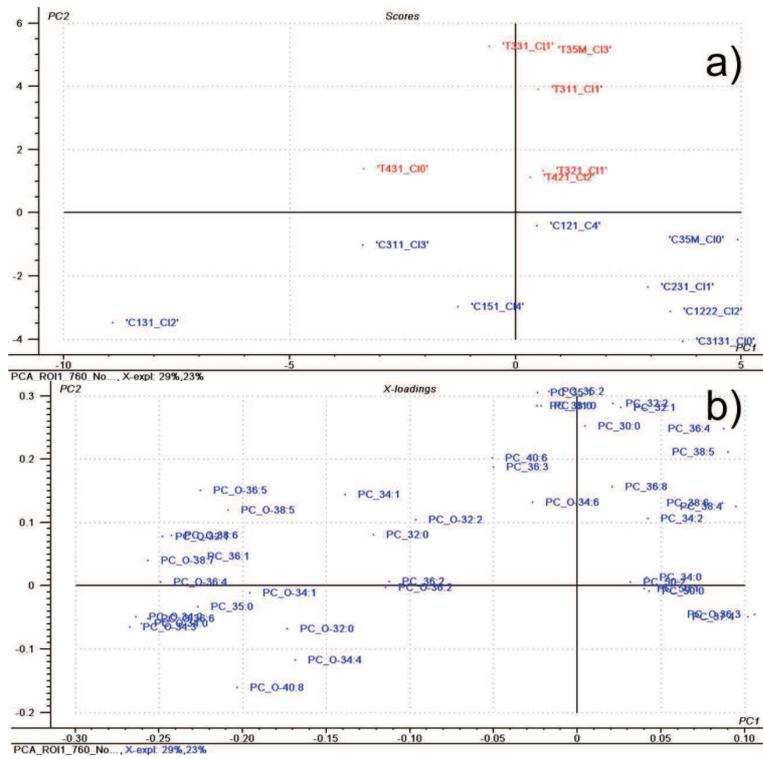


Fig 5.4.49. PCA de clústeres en el GO1 de los experimentos normalizados frente al pico 760.58 y empleando como variables la suma de las abundancias relativas para cada especie de PC normalizadas frente a la desviación estándar en todo el conjunto de muestras. a) Scores o muestras. b) Variables.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

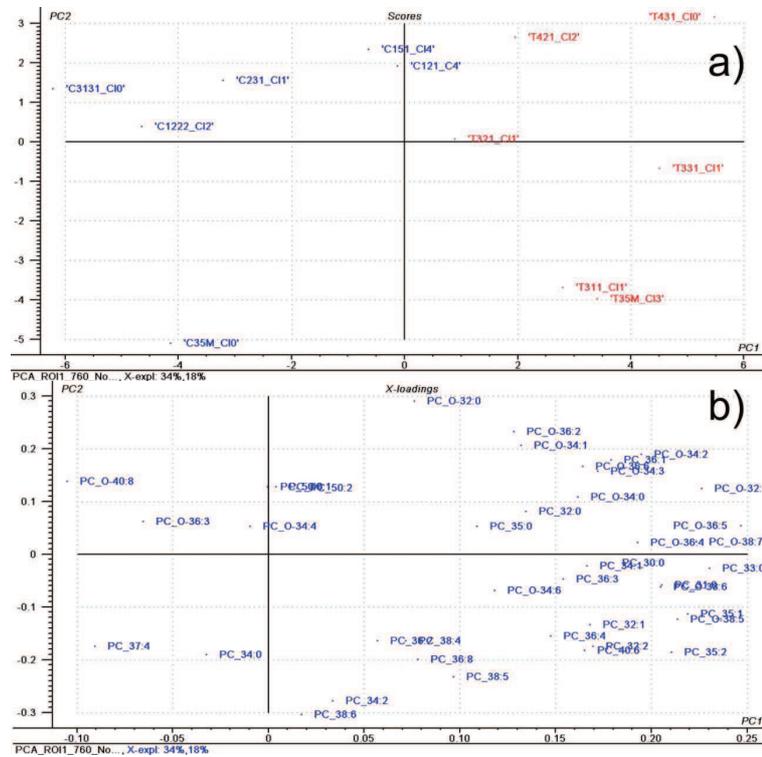


Fig 5.4.50. PCA de clústeres en el GOI1 de los experimentos normalizados frente al pico 760.58, sin las muestras C311\_C13 y C131\_C12, empleando como variables la suma de las abundancias relativas para cada especie de PC normalizadas frente a la desviación estándar en todo el conjunto de muestras. a) Scores o muestras. b) Variables.

Tabla 5.4.21. Especies de PC más influyentes en la diferenciación entre experimentos control y tratados en el GOI1 de los experimentos normalizados frente al pico 760.58.

Tratado	Control
PC O-36:5	PC O-34:4
PC 33:0	PC 34:0
PC O-32:1	PC O-36:3
PC O-32:2	PC 37:4
PC O-38:7	PC O-40:8

Se seleccionaron las 20 especies con intensidades relativas más reproducibles en los experimentos control y las 20 más reproducibles en los experimentos tratados; a continuación se eligieron aquellas especies coincidentes en ambos grupos y se eliminaron las demás. Se repitió el PCA con este conjunto de variables.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

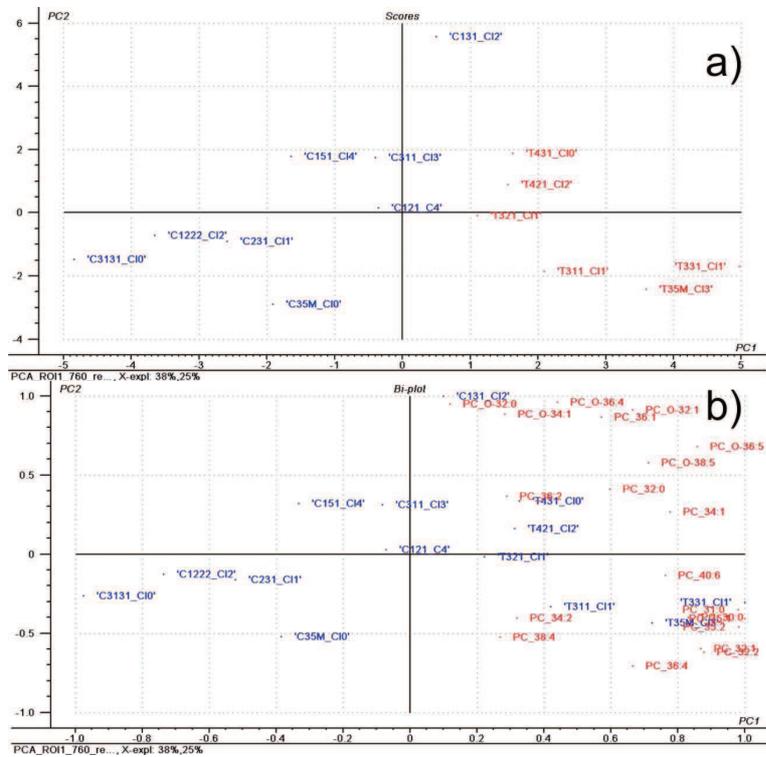


Fig 5.4.51. PCA de clústeres en el GOI1 de los experimentos normalizados frente al pico 760.58, empleando como variables las mas reproducibles en controles y tratados de las sumas de las abundancias relativas para cada especie de PC, normalizadas frente a la desviación estándar en todo el conjunto de muestras. a) Scores o muestras. b) Muestras y variables.

Sorprendentemente, como se ve en la figura 5.4.51, los resultados del análisis mostraron que todas las PCs seleccionadas aumentaban en los experimentos tratados, en los clústeres del GOI1.

### GOI3

Al hacer el PCA sobre los datos del GOI 3, que corresponde a tejido necótico, de los espectros normalizados frente el pico 760.58 y sin normalizar las variables, no fue posible diferenciar experimentos control de experimentos tratados, figura 5.4.52.a. Por tanto, se repitió el análisis normalizando las variables frente a la desviación estándar, como se observa en la figura 5.4.52b, pero tampoco fue posible clasificar experimentos control y tratados. Es decir, una vez más, los tejidos necrotizados de los xenógrafos tratados son indistinguibles de los de los controles.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

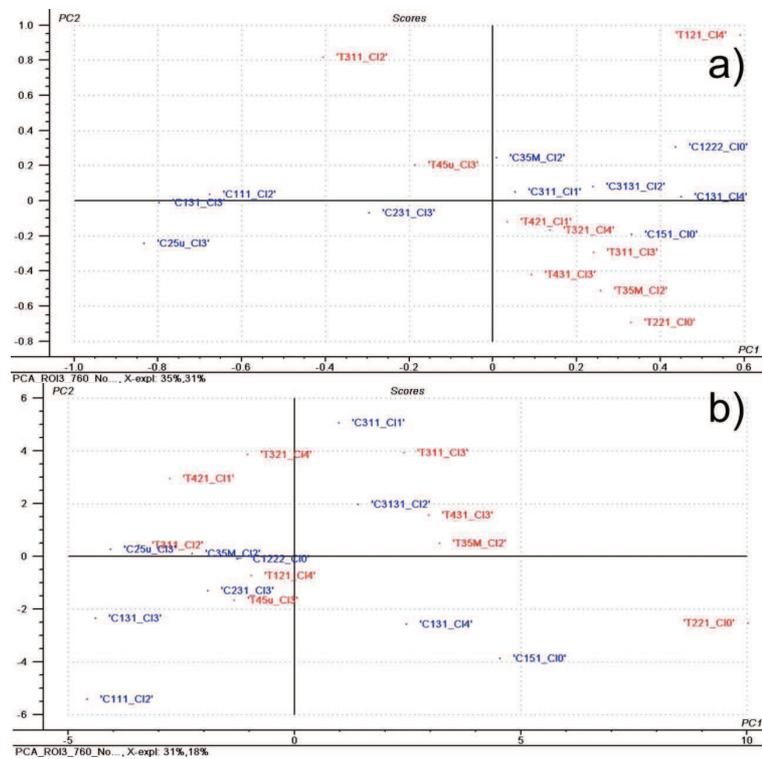


Fig 5.4.52. PCA de clústeres en el GOI3 de los experimentos normalizados frente al pico 760.58 y empleando como variables la suma de las abundancias relativas para cada especie de PC. . a) Análisis sin normalizar. b) Normalizando frente a la desviación estándar en todo el conjunto de muestras.

### 5.4.4.4.2.2. Experimentos normalizados frente al TIC

#### GOI 1

Cuando se analizaron los datos sin normalizar las variables, figura 5.4.53, se observó que, salvo el C311\_C13 y el C35M\_C10, se pudieron diferenciar los clústeres pertenecientes a muestras control de los clústeres de muestras tratadas. Sin embargo, una vez más, unas pocas especies, muy intensas, llevaban todo el peso de la CP1 que es la que permitía clasificar las muestras. Se repitió el análisis normalizando las variables frente a la desviación estándar.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

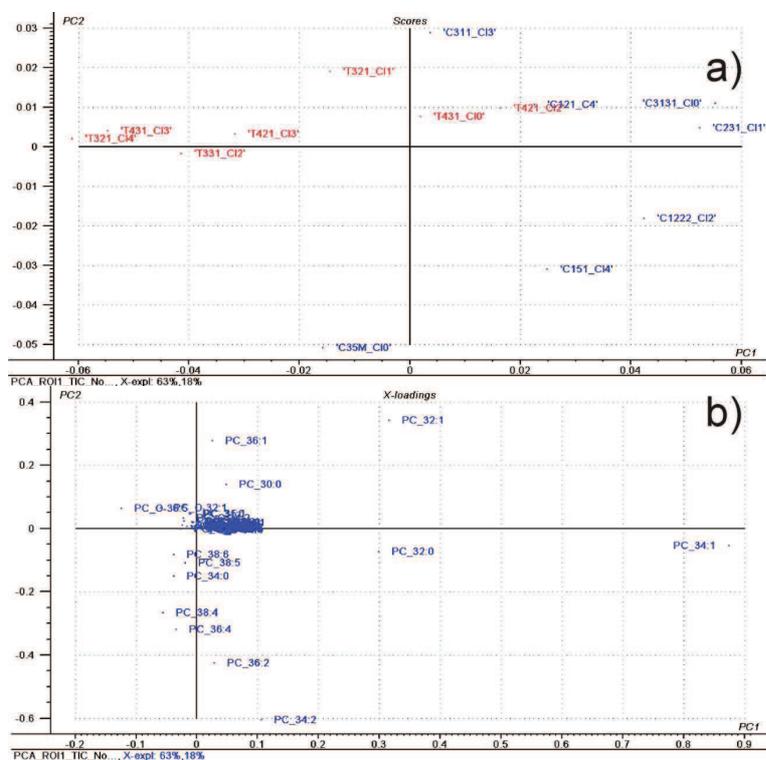


Fig 5.4.53. PCA de clústeres en el GOI1 de los experimentos normalizados frente al TIC y empleando como variables la suma de las abundancias relativas para cada especie de PC. a) Scores o muestras. b) Variables.

Al normalizar las variables, figura 5.4.54, fue necesario eliminar del análisis los clústeres C121\_CI4 y C311\_CI3, ya que se salían del comportamiento general. Esto es probablemente debido a que algunas especies de lípidos son tan poco intensas que han quedado excluidas en algunos experimentos al tener una intensidad por debajo del 1% de la intensidad máxima. Se repitió el análisis empleando únicamente las especies más reproducibles en controles y tratados. Del mismo modo que en el GOI1 de los experimentos normalizados frente al pico 760.58, se seleccionaron las veinte especies más reproducibles en cada uno de los casos y se eligieron las que coincidían en ambos como variables para hacer el análisis.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

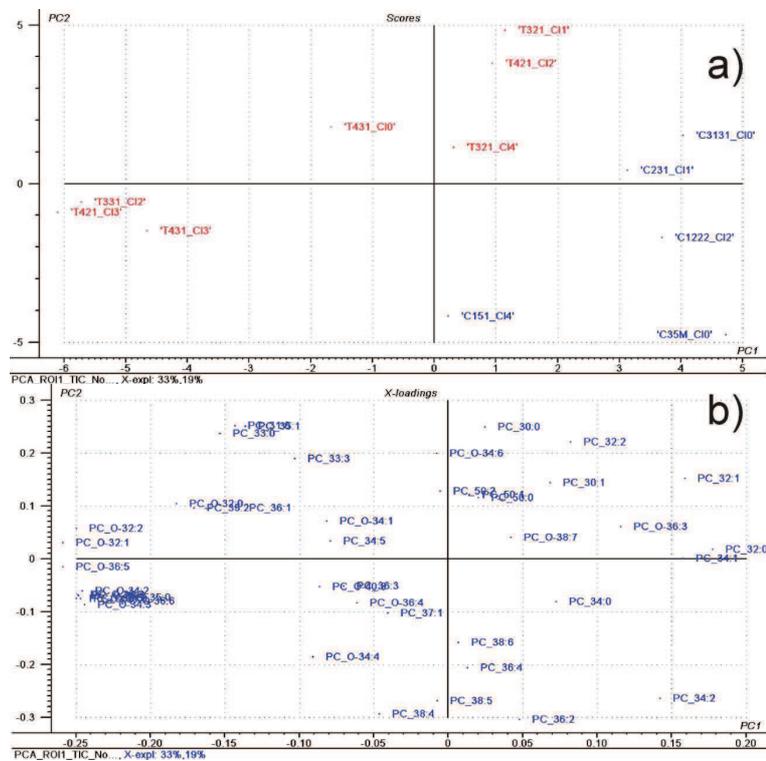


Fig 5.4.54. PCA de clústeres en el GO1 de los experimentos normalizados frente al TIC y empleando como variables la suma de las abundancias relativas para cada especie de PC normalizadas frente a la desviación estándar en todo el conjunto de muestras. a) Scores o muestras. b) Variables.

Al hacer el análisis con las especies más reproducibles, figura 5.4.55, se obtuvo una buena clasificación de controles y tratados, en la que las especies que se muestran en la tabla 5.4.22 son las que definen cada uno de los grupos.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

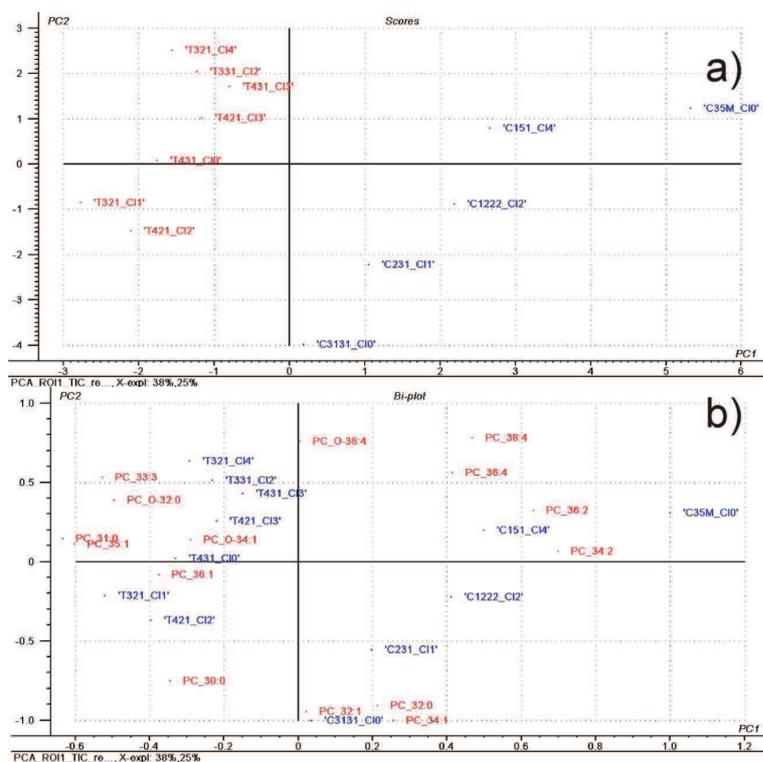


Fig 5.4.55. PCA de clústeres en el GOI1 de los experimentos normalizados frente al TIC, empleando como variables las mas reproducibles en controles y tratados de las sumas de las abundancias relativas para cada especie de PC, normalizadas frente a la desviación estándar en todo el conjunto de muestras. a) Scores o muestras. b) Muestras y variables.

Tabla 5.4.22. Especies de PC más influyentes en la diferenciación entre experimentos control y tratados en el GOI1 de los experimentos normalizados frente al TIC.

Treated	Control
PC_O-34:1	PC_34:2
PC_30:0	PC_36:2
PC_36:1	PC_38:4
PC_O-32:0	PC_36:4
PC_33:3	PC_34:1
PC_35:1	PC_32:0
PC_31:0	PC_32:1

### GOI 2

Al hacer PCA sobre los datos del GOI2, que corresponde a tejido necrótico, con los espectros normalizados frente al TIC y sin normalizar las variables, figura 5.4.56, no fue posible separar los clústeres de experimentos control de los

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

tratados. Se repitió el análisis normalizando las variables respecto a su desviación estándar.

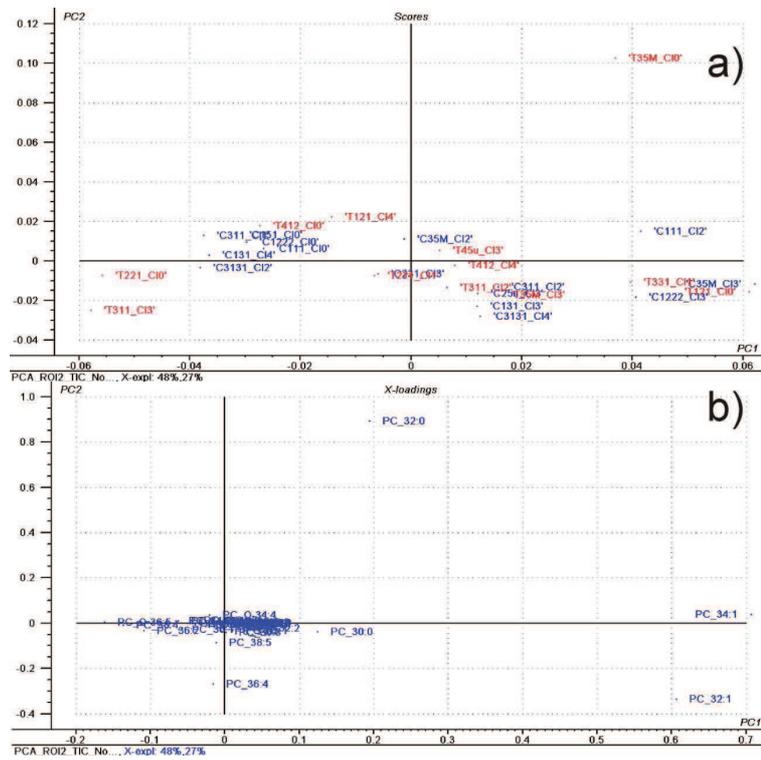


Fig 5.4.56. PCA de clústeres en el GOI2 de los experimentos normalizados frente al TIC y empleando como variables la suma de las abundancias relativas para cada especie de PC. a) Scores o muestras. b) Variables.



## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

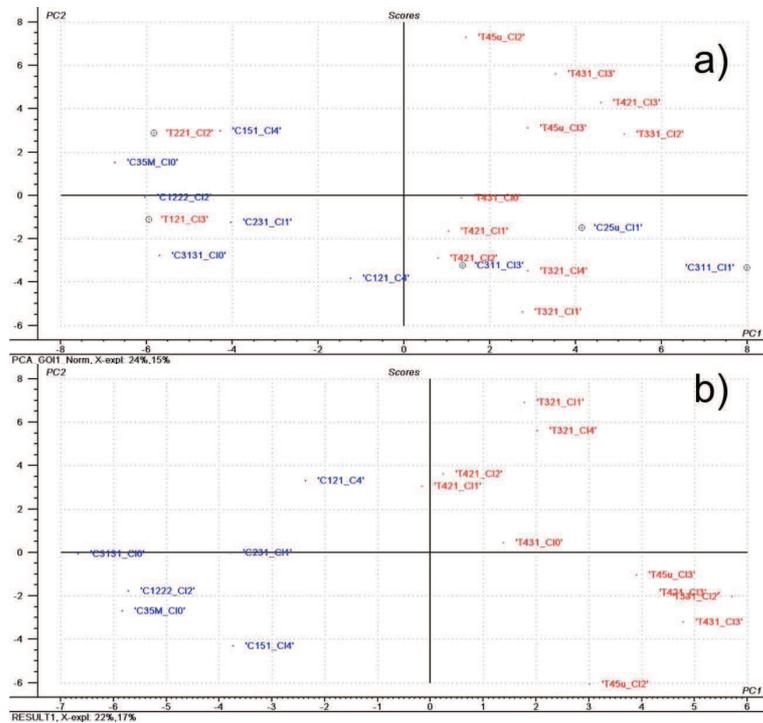


Fig 5.4.57. PCA de clústeres de tejido viable en los de los experimentos normalizados frente al TIC y empleando como variables la suma de las abundancias relativas, normalizadas frente a la desviación estándar en todo el conjunto de muestras. a) Primer análisis. b) Segundo análisis, tras extraer aquellos clústeres que presentaban un comportamiento atípico.

Como se muestra en la figura 5.4.57.a, se observó una clara tendencia a agruparse de los clústeres control y tratados. Sin embargo, algunos de ellos mostraron un comportamiento atípico y se extrajeron del análisis, obteniendo la clasificación que se muestra en la figura 5.4.57.b. Se extrajeron las intensidades relativas promedio de controles y tratados para las especies empleadas en el análisis, tal y como se puede ver en la figura 5.4.58 y en la figura 5.4.59, donde se muestra la variación de la intensidad relativa de estas especies en los experimentos tratados, frente a un valor fijo de 1 en los controles.

**CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS**

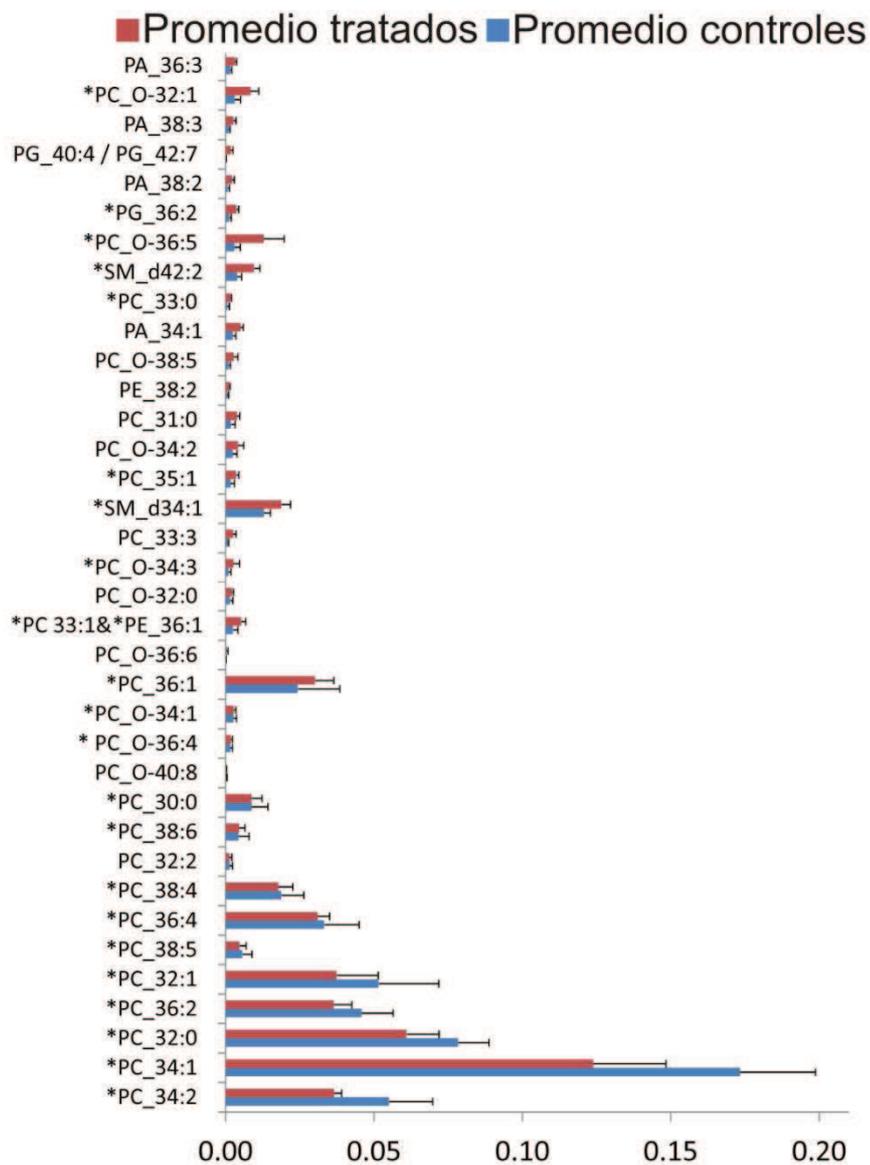


Fig 5.4.58. Comparación entre las intensidades promedio de las especies en el tejido viable, con los espectros normalizados usando el TIC. \* Especies confirmadas mediante UHPLC-ESI-MS.

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

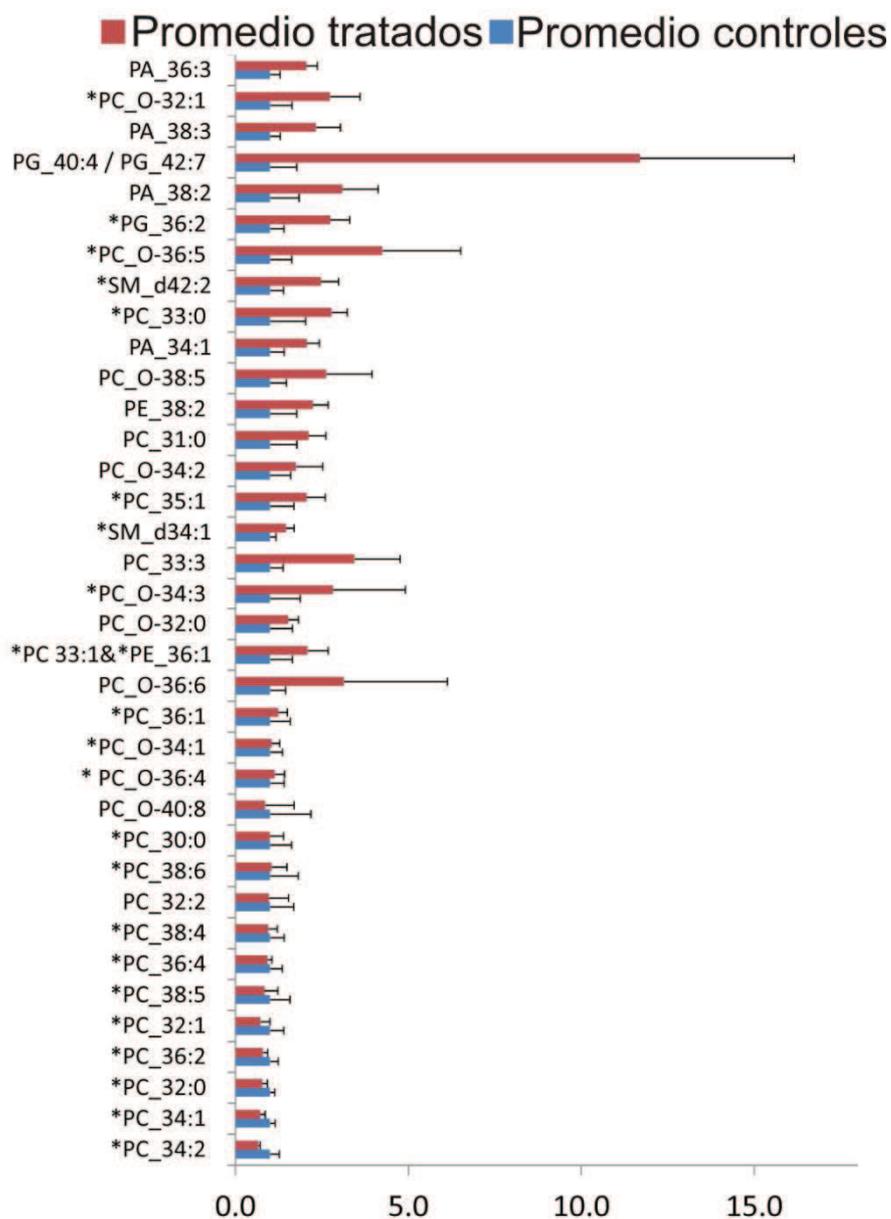


Fig 5.4.59. Comparación de las intensidades promedio de las especies en el tejido viable, con los espectros normalizados usando el TIC, para un valor normalizado de 1 en los controles. \* Especies confirmadas mediante UHPLC-ESI-MS.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

### 5.4.4.5. Discusión

En la figura 5.4.60 se muestra cómo, con el tratamiento aumenta la suma total de abundancias en PAs, PEs, PGs, SMs, éteres de PC y PCs con número de carbonos impares, mientras que en las PCs se observa una disminución. Sin embargo también se observa cómo, en todos los casos excepto en aquellos en los que alguno de los aductos no se detecta, disminuye la proporción de aductos protonados y aumenta la de potasiados y sodiados, particularmente los potasiados, demostrando que, en las muestras tratadas, hay un aumento en el pH del medio.

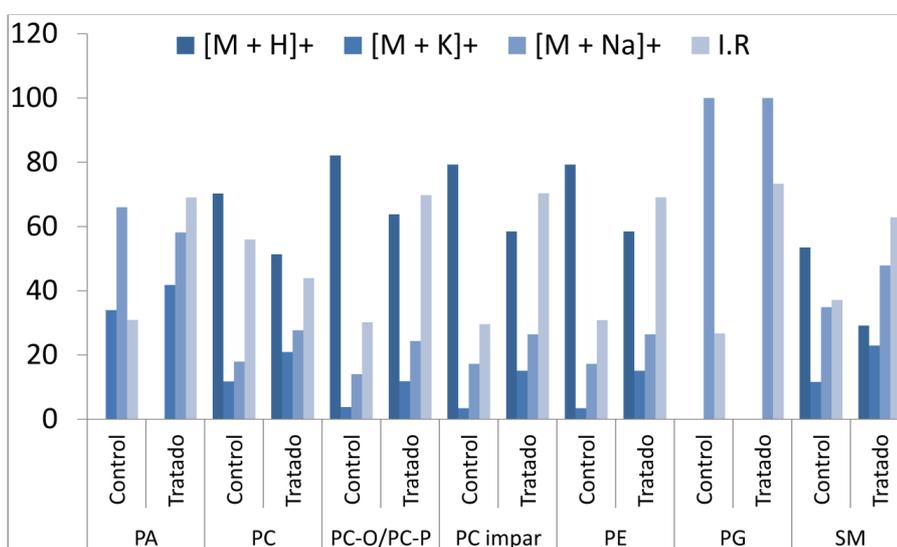


Fig 5.4.60. Comparación de la relación de aductos aproximada para cada familia de lípidos en el tejido viable de los experimentos control y tratados, y suma total de intensidades relativas (I.R) normalizada para que la suma de I.R. de controles e I.R. de tratados sea igual a 100.

MALDI-MS no es una técnica cuantitativa, pero puede emplearse como una técnica semi-cuantitativa en determinadas condiciones, en las cuales el medio es similar y se añade un patrón de referencia con una concentración homogénea en toda la muestra, lo cual es prácticamente imposible de conseguir empleando la técnica de sublimación para depositar la matriz. Por lo tanto, todos los valores de intensidad o abundancia que se muestran son relativos. En este caso, se hizo el análisis de dos formas: referenciando todas las abundancias respecto a la [PC 34:1 + H]<sup>+</sup>, pero se descartó este tipo de análisis al comprobar que la relación de aductos no era constante en todas las muestras; y mostrando cada abundancia como un tanto por uno del total de iones detectados, empleando la normalización TIC, que es la utilizada para obtener los resultados finales. Por lo tanto es difícil decir si el aumento observado en las clases de lípidos con mayor tendencia a ionizarse formando aductos con Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, como las PAs y las PGs, es debido a que el medio menos ácido favorece dicha ionización, o a que realmente

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

haya una mayor concentración de dichas especies. No obstante, en el caso de los éteres de PC, los PCs de cadena impar y las PEs, que prefieren ionizarse capturando un protón, también se observa un aumento en la abundancia total, aunque también aumente la proporción de aductos con Na<sup>+</sup> y con K<sup>+</sup>. En el caso de las SMs, que muestran una tendencia a capturar protones relativamente parecida a su tendencia a capturar iones Na<sup>+</sup>, se observa también un aumento en la abundancia total detectada y en los aductos con Na<sup>+</sup> y con K<sup>+</sup>.

En estudios previos,<sup>16,17,18</sup> se estudió la variación en el lipidoma de cultivos celulares de varias líneas celulares cancerosas en presencia de 2OHOA y en su ausencia, durante 72 h, empleando HPTLC y cromatografía de gases, observando un claro aumento de las SMs y una disminución de las PCs, figura 5.4.61, al igual que en los resultados obtenidos en este trabajo.

	Control		2OHOA	
	Mean	SD	Mean	SD
SM	42	4	193	16 ***
PC	249	16	176	13 ***
PS	70	3	40	5 ***
PI	36	2	31	6
PE	106	8	46	3 ***
Total PL	463	79	486	38
Cholesterol	172	16	205	10**
Cholesterol/PL	0.38	0.04	0.42	0.03

Fig 5.4.61. Variaciones en varias clases de lípidos entre los experimentos control y los tratados obtenidas por HPTLC de cultivos celulares.

Sin embargo, al hacer estos estudios sobre extractos obtenidos de xenógrafos implantados en ratones tratados con 2OHOA y sin tratar, no fue posible obtener diferencias significativas, al igual que sucedía en el estudio por MALDI-IMS de los promedios y de los clústeres de tejido necrótico.

### 5.4.4.6. Conclusiones

Tan solo tras identificar las áreas de tejido viable y compararlas ha sido posible reproducir los resultados obtenidos mediante HPTLC sobre cultivos celulares. Al igual que en el apartado 5.4.2, en la caracterización del xenografo NCI H-1975, y en el apartado 5.4.3, en el estudio de éteres de PC y PE en diferentes xenógrafos, se confirma la existencia de varias áreas con composiciones lipídicas características. Al emplear UHPLC-ESI-MS sobre extractos, o los espectros promedio de todo el corte, en MALDI-MS, la diferente relación entre las áreas que ocupa cada tipo de tejido en cada muestra genera más diferencias entre las muestras que el tratamiento. Este trabajo es, por tanto, un buen ejemplo de por qué es necesario emplear técnicas con resolución espacial, como el MALDI-IMS, en el análisis de determinados tipos de muestra, para poder determinar primero las diferentes regiones dentro de cada muestra y después comparar esas

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

regiones en los experimentos control con sus equivalentes en los experimentos tratados.

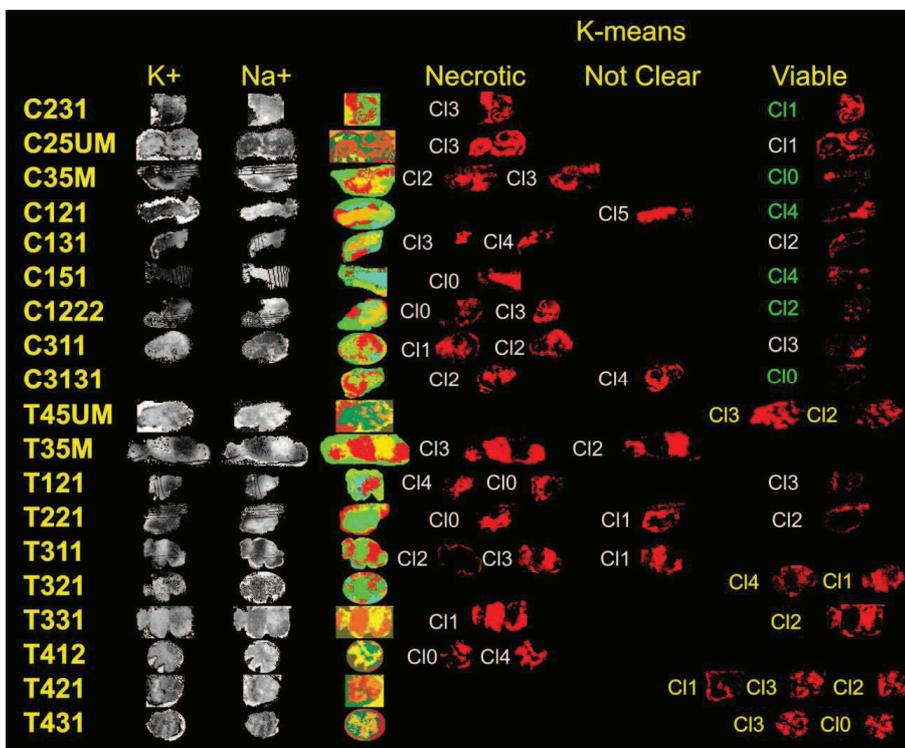


Fig 5.4.62. Comparación de la relación  $[M+K]^+ / ([M+K]^+ + [M+Na]^+)$  y  $[M+Na]^+ / ([M+K]^+ + [M+Na]^+)$ , para  $M = PC(32:1)$ , con los clústeres obtenidos por *k-means* y como se han agrupado estos clústeres mediante PCA de los espectros normalizados frente al TIC. En verde y amarillo se muestran los clústeres que se han empleado en el análisis final, sobre los tejidos viables y con la suma de aductos como variables.

En el análisis por componentes principales de los espectros promedio de los clústeres, es necesario hacer una normalización de las variables que iguale su intensidad promedio, ya que de no hacerlo, las variaciones en los picos más abundantes tienen tanta influencia que enmascararían variaciones aun más importantes en picos mucho menos intensos.

La relación entre las abundancias de los aductos con  $H^+$ ,  $Na^+$  y  $K^+$ , resulta ser un buen indicador, tanto para determinar el tipo de tejido en una misma muestra, figura 5.4.62, como para determinar si la muestra ha sido tratada o no. Estas diferencias son tan importantes que condicionan el análisis por componentes principales. Por lo tanto, si se pretende localizar diferencias en el lipidoma, hay que eliminar la influencia de los aductos. Una forma de hacerlo es utilizando únicamente espectros en modo negativo, donde todos los lípidos se ionizan perdiendo un  $H^+$ . Otra posibilidad es emplear una sal con un catión, como  $Li$  o  $Cs$ , que desplace al resto de los aductos. También, si es posible, se puede calcular la

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

aportación de cada aducto al canal másico en el que se encuentra y sumar todos los aductos para cada especie, aunque es mucho más laborioso.

Si se utiliza la suma de los aductos para hacer el análisis, la normalización de los espectros no debe hacerse respecto a un canal másico, ya que, al representar la abundancia de uno de los aductos, arrastra el efecto de los aductos a los nuevos datos aumentando el valor de la suma de las abundancias en aquellos en los que ese aducto es menos intenso. Es recomendable hacer una normalización empleando el TIC o no hacer ninguna normalización, si la calidad de los datos lo permite.

---

<sup>1</sup> Xiong, X. C.; Xu, W.; Eberlin, L. S.; Wiseman, J. M.; Fang, X.; Jiang, Y.; Huang, Z. J.; Zhang, Y. K.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. "Data Processing for 3D Mass Spectrometry Imaging". *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2012, 23 (6), 1147-1156

<sup>2</sup> Arthur, D.; Vassilvitskii, S. "*k-means++: the advantages of careful seeding.* Society for Industrial and Applied Mathematics" New Orleans, Louisiana, 2007; pp 1027-1035.

<sup>3</sup> Fuchs B and Schiller J. "Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics." *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2009, 111, 83-98

<sup>4</sup> Astigarraga E, Barreda-Gomez G, Lombardero L, Fresnedo O, Castano F, Giralt M. T, Ochoa B, Rodriguez-Puertas R, and Fernandez J. A. "Profiling and Imaging of Lipids on Brain and Liver Tissue by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Using 2-Mercaptobenzothiazole as a Matrix. *Analytical Chemistry*" 80 (23):9105-9114, 2008

<sup>5</sup> Zemski Berry, K. A.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Spraggins, J. M.; Caprioli, R. M.; Murphy, R. C. "MALDI Imaging of Lipid Biochemistry in Tissues by Mass Spectrometry." *Chem. Rev.* 2011, 111 (10), 6491-6512

<sup>6</sup> Fhaner C. J, Liu S, Ji H, Simpson R. J, Reid G. E. "Comprehensive Lipidome Profiling of Isogenic Primary and Metastatic Colon Adenocarcinoma Cell Lines." *Anal. Chem.* 2012, 84 (21), 8917-8926.

<sup>7</sup> Yang H. J, Park K. H, Lim D. W, Kim H. S, Kim J. "Analysis of cancer cell lipids using matrix-assisted laser desorption/ionization 15-T Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry." *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 26 (6), 621-630.

<sup>8</sup> Smith R, Lespi P, Di Luca M. a, Bustos C, Marra F, Alaniz M. a, Marra C. "A Reliable Biomarker Derived from Plasmalogens to Evaluate Malignancy and Metastatic Capacity of Human Cancers." *Lipids* 2008, 43 (1), 79-89.

<sup>9</sup> Hankin J, Farias S, Barkley R, Heidenreich K, Frey L, Hamazaki K, Kim H. Y, Murphy R. "MALDI Mass Spectrometric Imaging of Lipids in Rat Brain Injury Models." *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2011, 22 (6), 1014-1021.

<sup>10</sup> Fernández R, Lage S, Abad-García B, Barceló-Coblijn G, Terés S, López D. H, Guardiola-Serrano F, Martín M. L, Escribá P. V and Fernández J. A, "Analysis of the Lipidome of Xenografts Using MALDI-IMS and UHPLC-ESI-QTOF", *J Am Soc Mass Spectrom.* 2014 Jul; 25(7):1237-46

<sup>11</sup> Chughtai K, Lu Jiang, Greenwood T. R, Glunde K, and Heeren R. M. A. "Mass spectrometry images acylcarnitines, phosphatidylcholines, and sphingomyelin in MDA-MB-231 breast tumor models" February 2013 *The Journal of Lipid Research*, 54, 333-344.

<sup>12</sup> Braverman N. E and Moser A. B. "Functions of plasmalogen lipids in health and disease." *Biochim. Biophys. Acta*, 1822, 1442-1452 (2012).

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.4. XENOGRAFOS

---

<sup>13</sup> Magnusson C. D. and Haraldsson G. G. "Ether lipids." *Chem. Phys. Lipids*, 164, 315-340 (2011).

<sup>14</sup> F. M. Yatsu, M.D. and S. A. Moss, M.A. "Brain Lipid Changes Following Hypoxia Stroke"-1971--587-93.

<sup>15</sup> Escriba P. V. "Use of hydroxyoleic acid and similar compounds in the production of medicaments" Patent. Pub. No.: WO/2003/030891. International application No.: PCT/ES2002/000475.

<sup>16</sup> Barceló-Coblijn G, et al *PNAS* 2011;108:19569-74.

<sup>17</sup> Martin M. L, et al *J Lipid Res.* 2013; 54:1457-65.

<sup>18</sup> Martin M. L, et al *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828:1405-13.

**SECCIÓN 5.5.**  
**NERVIO PERIFÉRICO**



### 5.5. NERVIOS PERIFÉRICOS

El sistema nervioso periférico (SNP) se compone de los nervios y ganglios fuera del cerebro y la médula espinal, su función principal es conectar el sistema nervioso central (SNC) con los órganos y músculos, actuando como un relé de comunicación entre el cerebro y las extremidades.

Los nervios periféricos consisten en un parénquima funcional, principalmente de las fibras nerviosas que forman los axones y la células de Schwann que lo rodean, y un estroma compuesto por un tejido conectivo especializado y organizado en las capas epineural, perineural y endoneural.<sup>1</sup> La capa más externa, la epineural, es generalmente rica en el tejido adiposo que rodea el nervio periférico. El nervio ciático de rata es un nervio mixto sensorial-motor que consta de un solo fascículo correspondiente a la fusión de los nervios espinales L4 y L5,<sup>2</sup> y que se divide distalmente en dos fascículos. Las células de Schwann pueden interactuar con un solo axón formando fibras nerviosas mielinizadas o pueden interactuar con varios axones formando fibras nerviosas no mielinizadas. Estudios previos han demostrado que el nervio ciático se compone de un 6% de axones motores mielinizados, un 23% de axones sensoriales mielinizados, un 48% de axones sensoriales desmielinizados y un 23% de axones simpáticos desmielinizados.<sup>3</sup>

La estructura de los nervios y sus axones se pueden dañar debido a enfermedades o lesiones mecánicas, provocando graves alteraciones funcionales. De hecho, las lesiones en nervios periféricos son lesiones frecuentes que afectan a alrededor de 100.000 pacientes en los Estados Unidos y Europa cada año, y a menos que se traten pueden causar parálisis a largo plazo.<sup>4</sup> Después de un daño estructural, el nervio periférico tiene la capacidad intrínseca de regenerar parcialmente sus componentes, y la reparación quirúrgica tiene tasas de éxito variables. Con el fin de evaluar adecuadamente el proceso de regeneración, es necesario identificar la composición y distribución de los lípidos en los nervios normales. Sin embargo, la composición lipídica exacta de estos órganos ricos en lípidos aun no ha sido estudiada en profundidad.

En este trabajo, con el fin de detectar el mayor número de especies, se utilizó la imagen por espectrometría de masas de secciones de nervio ciático de rata combinada UHPLC-MS<sup>E</sup> de extractos de lípidos. Se detectaron más de 500 especies de un rango de entre 200-2000 Da y se determinó su distribución espacial.

#### 5.5.1. Preparación y análisis de muestras

##### Muestras

Cuatro ratas Wistar macho adultas y sanas, criadas en el animalario del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (España), fueron anestesiadas utilizando ketamina y acepromazin y perfundidos con paraformaldehído. Se extirparon quirúrgicamente ambos nervios ciáticos de cada rata incluyendo las

## **CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.5. NERVIOS PERIFÉRICOS**

---

capas de parénquima y estroma. Se redujo al mínimo la manipulación quirúrgica del nervio para evitar daños en su haz de fibras internas. Los nervios se introdujeron en OCT y se obtuvieron secciones de 6 micras de espesor. Este trabajo fue aprobado por el comité de investigación y ética para la investigación con animales de la Universidad de Granada, España.

Los ocho segmentos de los nervios ciáticos se lavaron dos veces con PBS (Tampón fosfato salino) enfriado con hielo, después de lo cual se pesaron y se homogeneizaron en hielo en 5 volúmenes de PBS con 10 ráfagas de 30 segundos usando un homogeneizador Polytron (Kinematika, Suiza). Los homogeneizados se agruparon al azar para generar dos muestras que contuvieran aproximadamente 100 mg de tejido de nervio ciático y se transfirieron a tubos de vidrio. Los lípidos se extrajeron de las fases resultantes del homogeneizado (~3-4 mg de proteína) siguiendo el procedimiento de Bligh y Dyer<sup>5</sup> y se secaron en un concentrador Savant SpeedVac (Thermo Scientific, IL, EE.UU.). La proteína se estimó por el ensayo de proteínas con ácido bicinonínico (BCA) (Thermo Scientific).

### **MALDI-IMS**

Las secciones de nervio ciático se cubrieron con las matrices MBT y DAN empleando la técnica de sublimación descrita en el apartado 2.1.2.3 del capítulo Materiales y Métodos. A continuación se midieron por MALDI-IMS, tal y como se describe en el apartado 2.3.2.3 del capítulo Materiales y Métodos, a 25, 50 y 100  $\mu\text{m}$  de resolución espacial y 100.000 de resolución en masa, con el equipo LTO Orbitrap XL. Los datos fueron analizados empleando el software dedicado MSI Analyst (Noray Bioinformatics S.L., España)

### **UHPLC-ESI-MS<sup>E</sup>**

Partiendo de extractos de lípidos de los nervios ciáticos disueltos en MeOH se prepararon alícuotas de 150  $\mu\text{l}$  en cloroformo/metanol (1:2), tal y como se describe en el apartado 2.2, que se inyectaron en la columna UHPLC acoplada al espectrómetro de masas SYNAPT G2 HDMS. Se adquirió, tal y como se explica en el apartado 2.4.1.1 mediante una función de baja energía el *full scan* o espectro de los precursores no fragmentados para cada tiempo de retención, en el rango entre 50 y 1200 Da y en ambas polaridades. Por otro lado, mediante una función de alta energía con una rampa de energías de colisión, se recogieron los espectros de fragmentación de las especies en las dos polaridades.

Los datos obtenidos por UHPLC-ESI-MS<sup>E</sup> se analizaron empleando el software de identificación de lípidos SimLipid de PREMIER Biosoft International y comparando con estándares de PC, LPC, PE, PI, PA, PS, PG, DAG, TAG, SM (Avanti Polar Lipids, Inc.) y preparados de la misma forma que el extracto. Para facilitar el trabajo se redujo la lista preliminar a una sola especie por cada clase de lípido, m/z, aducto iónico formado y tiempo de retención, mediante un programa escrito en MatLab.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.5. NERVIOS PERIFÉRICOS

### 5.5.2. Resultados

Con el fin de determinar la composición lipídica de las diferentes áreas histológicas del nervio ciático, se escanearon 9 secciones longitudinales y 2 secciones transversales en modo de ionización positivo, y 4 secciones longitudinales en modo de ionización negativo, utilizando MBT como matriz. Dado que el MBT no tiene un rendimiento óptimo en modo de ionización negativo, se escanearon otras 2 secciones transversales utilizando DAN como matriz. En la Figura 5.5.1 se muestra la distribución espacial de algunos canales másicos seleccionados en modo de ionización positivo a lo largo de una de las secciones transversales, junto a los clústeres determinados por k-means. Una imagen similar para la detección negativa se incluye en los apéndices del libro, A-VII. La clusterización permitió identificar cuatro áreas diferentes: azul, púrpura, verde y rosa, correspondientes a las fibras nerviosas, el tejido conectivo (el epineuro, el perineuro y el tejido conectivo intraneural con vasos sanguíneos), el tejido adiposo (epineuro rico) y los alrededores de la sección de tejido. Sorprendentemente, se encontraron numerosos lípidos neutros en la zona que rodea el tejido. Por ejemplo,  $m/z = 549.487$ , asignada como DAG (O-30: 0) + Na<sup>+</sup>.

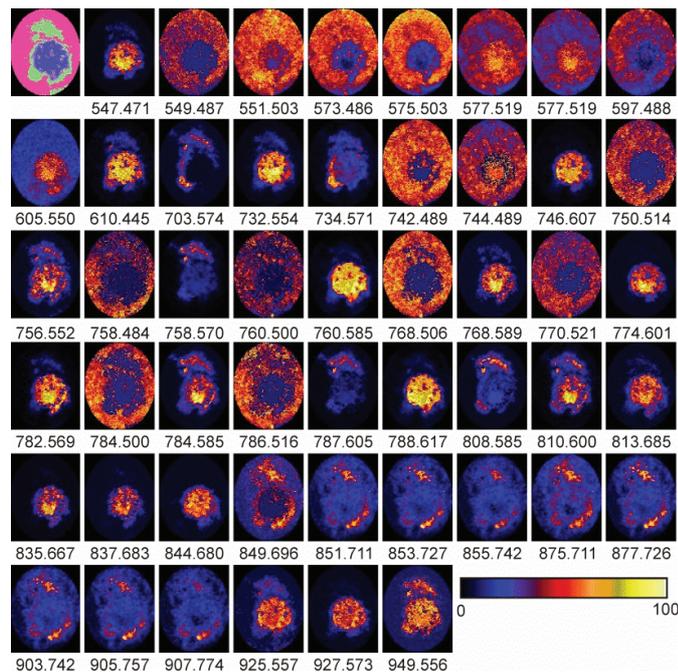


Fig 5.5.1. Imágenes de algunos canales másicos seleccionados de una sección transversal del nervio ciático en modo de ionización positivo y empleando MBT como matriz. Resolución espacial: 50  $\mu\text{m}$ , 10 disparos por píxel. Resolución en masa: 100.000.

También se encontraron los mismos clústeres en las secciones longitudinales (Figuras 5.5.2 y A-VIII), aunque dependiendo de la altura a la que se hizo el corte, la contribución relativa de cada área a la imagen variaba. De modo que el

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.5. NERVIOS PERIFÉRICOS

número y la identidad de las especies detectadas en los espectros promedio variaban de unas secciones a otras.

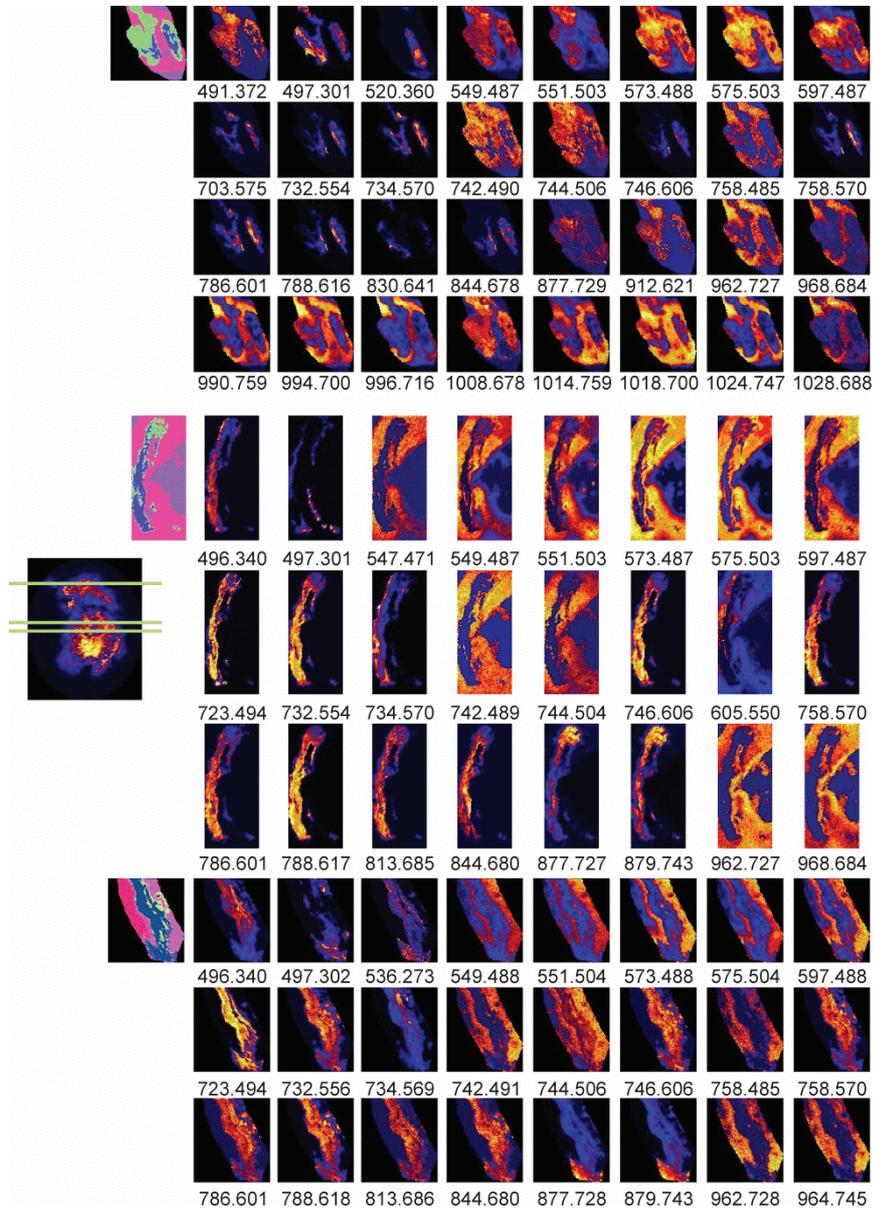


Fig 5.5.2. Imágenes de algunos canales másicos seleccionados de secciones longitudinales de nervio ciático en modo de ionización positivo y empleando MBT como matriz. Resolución espacial: 100 y 50  $\mu\text{m}$ , 10 disparos por pixel. Resolución en masa: 100.000.

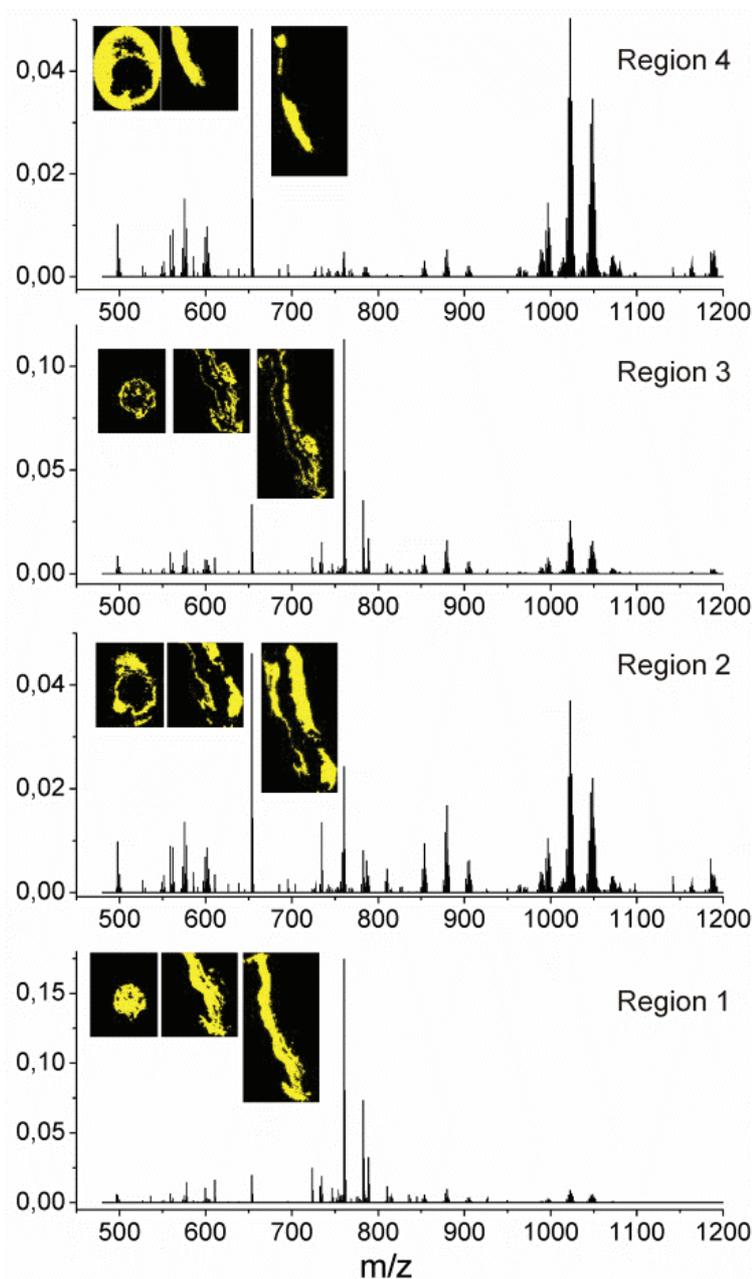


Fig 5.5.3. Espectros promedio de las diferentes regiones identificadas por clusterización k-means en modo de ionización positivo.

Es evidente en las figuras 5.5.1 y 5.5.2 que las fibras presentaban una composición lipídica característica, diferente del tejido circundante. En la figura 5.5.3 se muestra el espectro promedio de cada una de las regiones encontradas

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.5. NERVIÓ PERIFÉRICO

---

por clusterización k-means, junto con la imagen de cada región en una sección transversal y en dos secciones longitudinales. La región 1 correspondía a las fibras nerviosas y el espectro de masas está dominado por el pico con  $m/z = 760.5851$ ,  $[PC\ 34:1 + H]^+$ , que se llevaba la mayor parte de la intensidad y por su aducto de  $Na^+$  a  $m/z = 782.5670$ . El resto de las especies presentaron una abundancia significativamente menor. El espectro promedio de la región 1 en modo de ionización negativo (Figura A-IX de los apéndices) también mostró una baja abundancia de especies, o cuanto menos, el predominio de un número muy limitado de lípidos. En este caso, el espectro estaba dominado por un pico en  $m/z = 888.624$ ,  $[SFT\ (d18:1/24:1) - H]^-$ , y un pico de menor intensidad a  $m/z = 885.550$ ,  $[PI\ (38:4) - H]^-$ .

La región 3 correspondía al tejido conectivo y se observaba una reducción de la intensidad de la PC 34:1. Mientras que hubo un aumento significativo en la intensidad de un grupo de picos entre  $m/z = 960 - 1100$ . La mayor parte de estas especies se asignaron como aductos de TGs con una molécula de MBT y un protón. Dicha asignación se vio reforzada al observar el espectro de la región 2, que correspondía al tejido adiposo alrededor del nervio y donde tales especies abundan. Curiosamente, estas especies se deslocalizaron por una gran área alrededor de la sección de tejido (región 4). Para descartar que el procedimiento de preparación de la muestra estuviera causando la migración de los lípidos, se seccionó un nervio ciático sin añadir OCT y se midió, pero aún así se observó la deslocalización. Dado que el procedimiento de sublimación utilizado para depositar la matriz es un protocolo sin disolventes, no debería haber migración de las especies lipídicas. Finalmente se tuvo en cuenta que la intensidad total fuera del tejido se reducía de manera significativa y, por tanto, la cantidad total de lípidos deslocalizados era pequeña, y en consecuencia la normalización de los datos podría magnificar el efecto.

Para comprobar si el procedimiento de normalización utilizado en este trabajo estaba provocando la deslocalización de los lípidos observada en las imágenes, uno de los experimentos se volvió a analizar utilizando cuatro algoritmos de normalización: TIC, *noise-level*, normalización frente a la intensidad máxima y frente a la intensidad media. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.5.4. Como se puede observar, se encontraron pequeñas diferencias entre los cuatro espectros promedio. Además, cuando se visualizó el  $m/z = 1046.7312$ ,  $[TG\ (54:6) + MBT + H]^+$ , no se observaron variaciones significativas en las imágenes generadas con las diferentes normalizaciones. Por lo tanto, se concluyó que la normalización no era la responsable de la deslocalización de los lípidos neutros observada, y que probablemente se debía a una dispersión por la matriz de los lípidos del tejido adiposo, que rodean el nervio, al introducir la muestra en el equipo a alto vacío ( $10^{-10}$  Bar) y que podían llegar a ser líquidos a temperatura ambiente.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.5. NERVIJO PERIFÉRICO

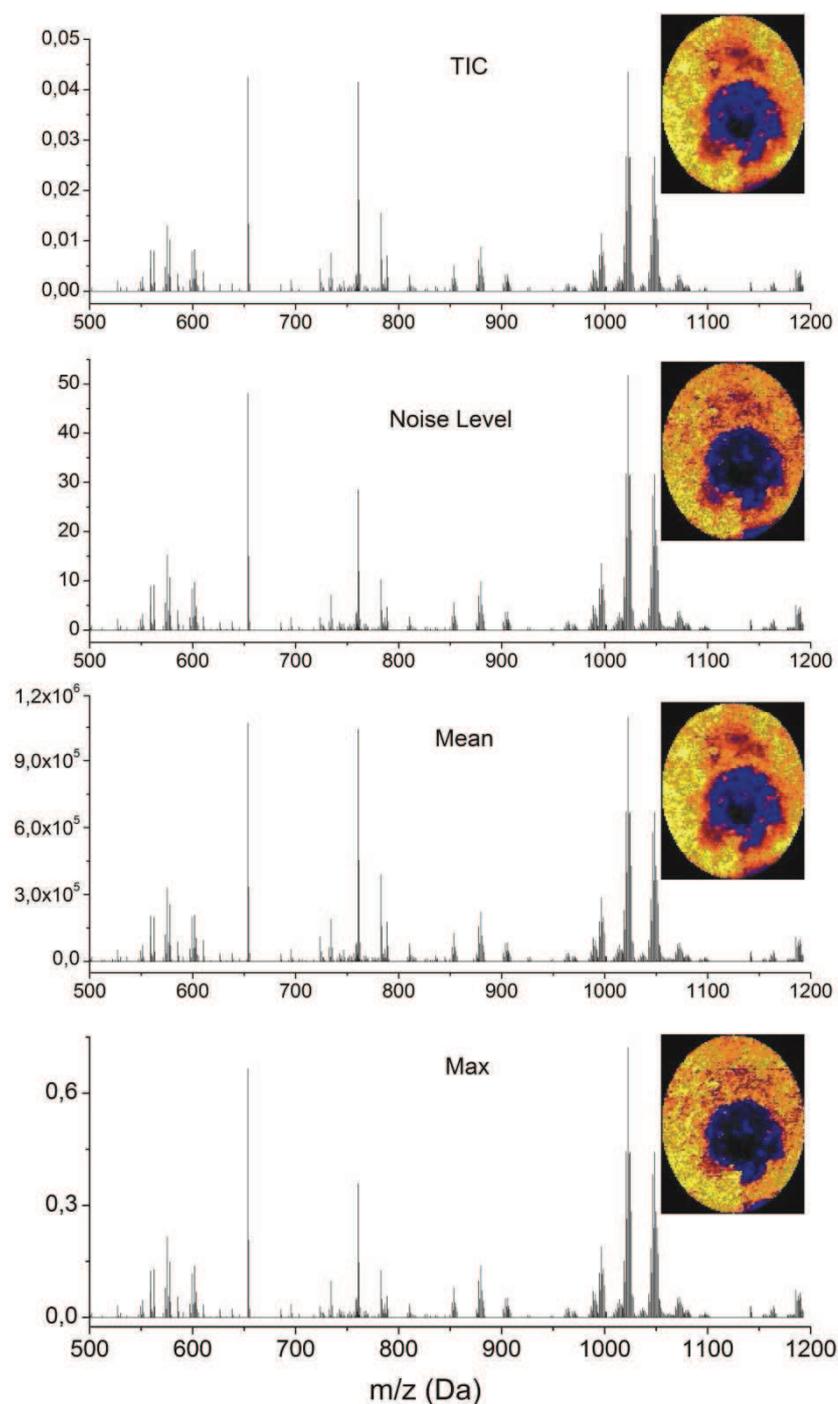


Fig 5.5.4. Espectros promedio de una misma sección normalizados de 4 formas diferentes, junto con la imagen de  $[TG (54:6) + MBT + H]^+$  en los 4 casos.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.5. NERVIJO PERIFÉRICO

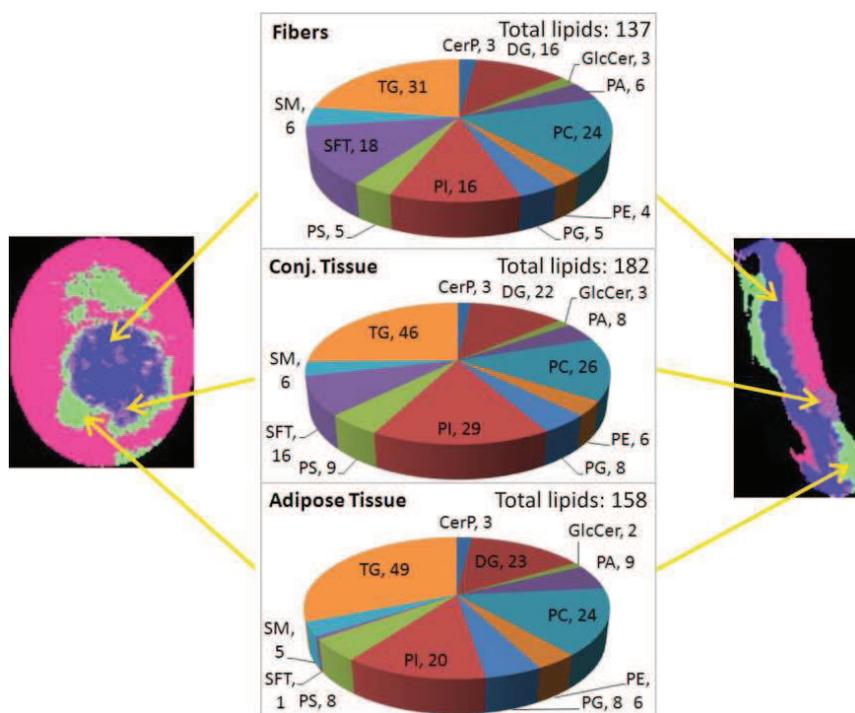


Fig 5.5.5. Número de especies y especies de cada clase de lípidos detectadas por MALDI-IMS en modo de ionización positivo y negativo en cada región del nervio ciático.

Mediante UHPLC-ESI-MS<sup>E</sup> se hizo una asignación completa de los lípidos presentes en el nervio ciático y se empleó para confirmar las especies detectadas por MALDI-IMS en las diferentes regiones, las tablas de asignación están incluidas en los apéndices, de A-X a A-XIII. En la figura 5.5.5 se muestra el número de especies de cada clase detectadas en modo de ionización positivo y negativo. Se observó que las fibras y el tejido conectivo contenían una proporción muy similar de especies de cada clase. La baja cantidad de especies de PE detectadas, bien pudo ser debida a la supresión iónica provocada por la presencia de PCs en las fibras, que se encuentran en la misma región espectral pero que suelen ser mucho más abundantes. En la figura 5.5.6 se muestran las abundancias relativas de cada especie en las tres regiones identificadas.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.5. NERVIJO PERIFÉRICO

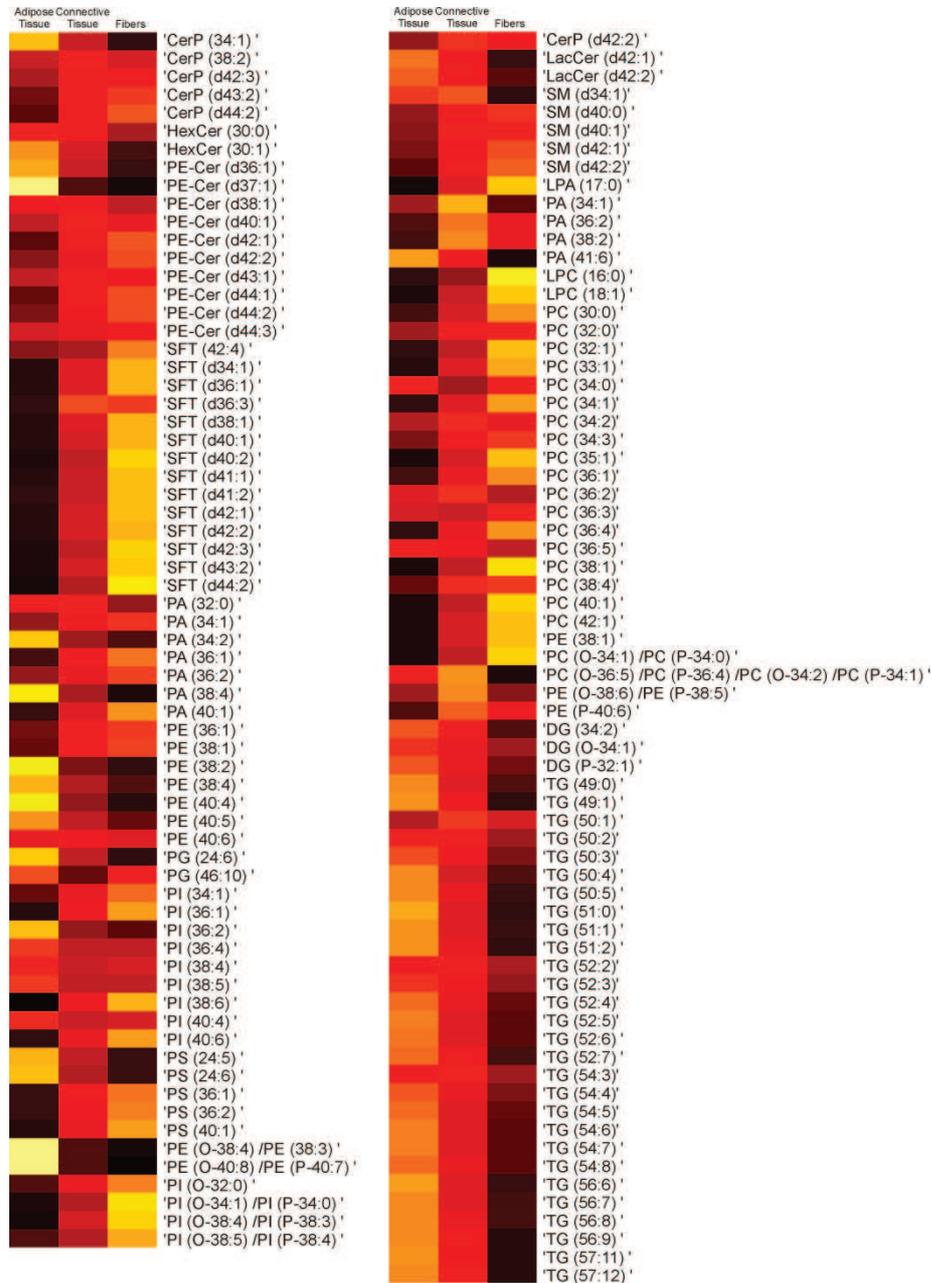


Fig 5.5.6. Heatmap con la abundancia relativa de cada especie detectada en las tres regiones.

Se llevó a cabo un estudio de la correlación entre las diferentes clases de lípidos (Figura 5.5.7), donde se compararon las intensidades relativas en los tres tipos de tejido. Por lo tanto, cada especie es un vector de tres dimensiones. Para calcular la matriz de correlación se hace el producto escalar de los vectores, que será

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.5. NERVIÓ PERIFÉRICO

proporcional al coseno del ángulo que forman, de forma que una correlación de 1 indica que los valores de las tres dimensiones del vector varían en la misma proporción, mientras que una correlación de -1 indica que varían de forma opuesta. En la matriz de correlación se muestra la correlación de todas las especies. Es decir, cada columna es una especie y cada fila es una especie, y en la diagonal se muestra la correlación de una especie consigo misma, que es 1.

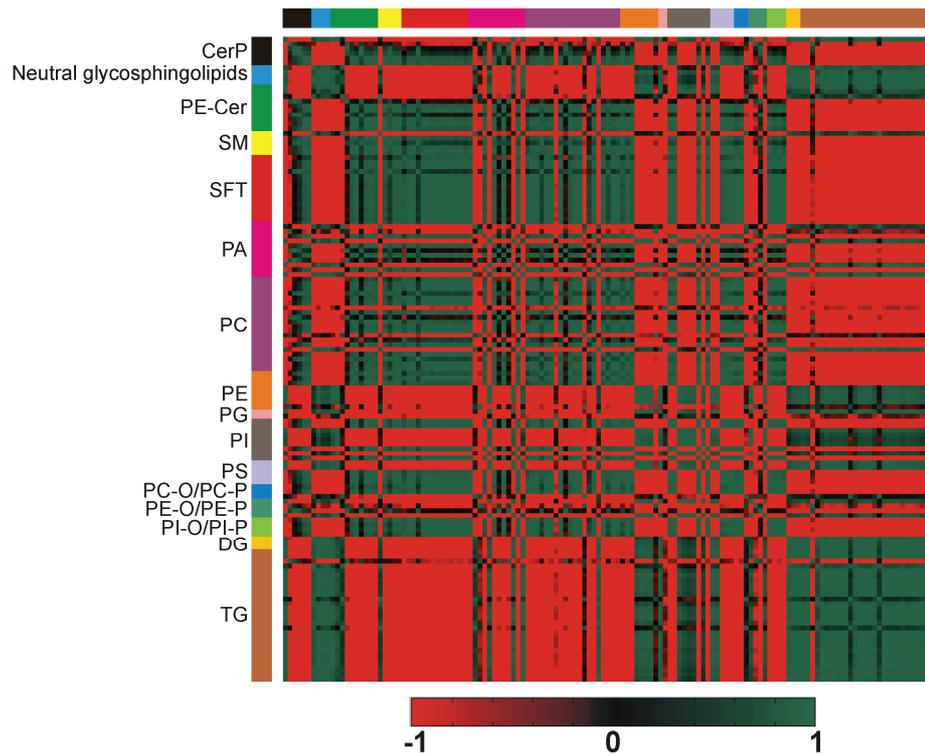


Fig 5.5.7. Mapa de correlación de las especies lipídicas en nervio ciático, teniendo en cuenta su abundancia relativa en las tres regiones.

### 5.5.3. Discusión

En las figuras 5.5.5 y 5.5.6 se observó que, como cabía esperar, en el tejido adiposo abundaban las TGs y DGs. Todos los nervios periféricos están parcialmente cubiertos por este tipo de tejido,<sup>6</sup> cuya función es, probablemente, la protección mecánica. El tejido adiposo detectado en las muestras está asociado a la capa conectivo-epineural que rodea al nervio. Aunque quizá, lo más llamativo que se observó fue la drástica disminución de sulfátidos (SFT) en el tejido adiposo. La presencia de SFTs en las fibras nerviosas probablemente se debía a que son los principales componentes de las células de Schwann en las vainas de mielina y a la abundancia de estas las capas que cubren los axones.<sup>7</sup> La abundancia de SFTs en el tejido conectivo podría explicarse por sus funciones en la membrana plasmática, donde actúan como señales moleculares para el

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.5. NERVIOS PERIFÉRICOS

reconocimiento, la adhesión y la señalización celular,<sup>8</sup> a fin de mantener la estructura de las fibras nerviosas.

En el mapa de correlación (Figura 5.5.7) se observó que todos los TGs, que están en las últimas filas y en las últimas columnas (en azul claro), correlacionaron muy bien con el resto de TGs, con las DGs, PEs, éteres de PE y con los gangliósidos. Observando el HeatMap de la figura 5.5.6, se vio que eran las especies cuya abundancia relativa es mayor en el tejido adiposo. Los SFTs, sin embargo mostraron una correlación completamente opuesta a todas estas clases, correlacionando bien con PCs, SMs, PE-Cer o PIs, todos ellos más abundantes en las fibras y en el tejido conectivo. Esto es una prueba más de lo observado previamente en las figuras 5.5.3, 5.5.5 y 5.5.6, que indicaban una composición lipídica característica en cada tipo de tejido.

### 5.5.4. Conclusiones

Se analizó la distribución de los lípidos en secciones longitudinales y transversales de nervio ciático de rata y se encontraron tres regiones con una composición lipídica característica. Estas regiones corresponden a las fibras, el tejido conectivo y el tejido adiposo que cubre el nervio. La mayor parte de la intensidad en el espectro de las fibras en modo de ionización positivo es debida a una sola especie de PC y en la composición del resto de los PCs se encontraron muy pocas insaturaciones. Los resultados mostraron que en el interior del nervio ciático de rata hay diferentes distribuciones lipídicas y que la región en la que son más abundantes podría corresponder con el 30% de los axones que se encuentran mielinizados.

También se encontró una importante cantidad de sulfátidos, no sólo en las fibras, sino también en el tejido conectivo.

Por último, cabe destacar que este ha sido el primer estudio empleando MALDI-IMS del lipidoma de nervios periféricos y muestra una detallada descripción de la composición y la distribución en los diferentes tipos de tejido que componen el nervio.

---

<sup>1</sup> Carriel V, Alaminos M, Garzón I, Campos A, Cornelissen M. "Tissue engineering of the peripheral nervous system." *Expert Review of Neurotherapeutics* **2014**, 14 (3), 301-318.

<sup>2</sup> Asato F, Butler M, Blomberg H, Gordh T. "Variation in rat sciatic nerve anatomy: Implications for a rat model of neuropathic pain." *J. Peripheral Nervous System* **2000**, 5 (1), 19-21.

<sup>3</sup> Schmalbruch H. "Fiber composition of the rat sciatic nerve." *Anat. Rec.* **1986**, 215 (1), 71-81.

<sup>4</sup> Kelsey J. L, Praemer A, Nelson L. M, Felberg A, Rice D. P. "Upper Extremity Disorders: Frequency, Impact, and Cost." Churchill Livingstone: London, 1997.

## **CAPÍTULO 5 – RESULTADOS. – 5.5. NERVIIO PERIFÉRICO**

---

<sup>5</sup> E. G. Bligh, W. J. Dyer. "A rapid method of total lipid extraction and purification." Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, **1959**, 37(8): 911-917, 10.1139/o59-099

<sup>6</sup> Ortiz-Hidalgo C, Weller R. O. "Peripheral Nervous System." In Histology for Pathologists, 4th edition ed.; Kluwer, W., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: **2012**.

<sup>7</sup> Quattrini A, Corbo M, Dhaliwal S. R, Sadiq S. A, Lugaresi A, Oliveira A, Uncini A, Abouzahr K, Miller J. R, Lewis L, Estes D, Cardo L, Hays A. P, Latov N. "Anti-Sulfatide Antibodies in Neurological Disease - Binding to Rat Dorsal-Root Ganglia Neurons." J. Neurological Sciences **1992**, 112 (1-2), 152-159.

<sup>8</sup> Hakomori S, Igarashi Y. "Functional-Role of Glycosphingolipids in Cell Recognition and Signaling." J. Biochem. **1995**, 118 (6), 1091-1103.

**SECCIÓN 5.6.**  
**ESTUDIO DE MODELOS DE LESIÓN EN**  
**MEDULA DE RATA**



## 5.6. Estudio de modelos de lesión en médula de rata

El objetivo de este estudio fue, la caracterización del lipidoma en medulas sanas, lesionadas por contusión y lesionadas por desmielinización, en busca de marcadores de lesión que permitieran hacer un seguimiento de la evolución de un tratamiento experimental en ratas. El estudio se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio de Neurología Molecular del Hospital Nacional de Parapléjicos (HNP) en Toledo y con HistoCell, S.L.

### 5.6.1. Preparación y análisis de muestras

Las muestras de médula de rata fueron proporcionadas por el HNP. Para producir el modelo de inflamación por desmielinización, los animales recibieron una inyección por nivel rostro-caudal de 1 µl de LPC al 1% en suero salino a nivel del tracto corticospinal. Las inyecciones se realizaron en un total de 3 niveles rostro-caudales separados por 1 mm entre sí. Para ello, se utilizó una aguja de 33G y una jeringa NanoFil de 10 µl acoplada a un microinyector y un sistema estereotáxico. Cada inyección se realizó a una velocidad de administración de 0,5 µl/min. Finalmente, tras cada inyección la aguja se mantuvo en su posición durante 4 minutos más con objeto de minimizar el potencial reflujo de la solución.<sup>1-4</sup>

El modelo de lesión moderada por contusión se realizó aplicando un impacto de 200 kd sobre la médula espinal con ayuda de un contusor mecanizado modelo Infinite Horizon (Precision Systems and Instrumentation, LLC).<sup>1-4</sup>

Los animales fueron sacrificados mediante la administración de una dosis terminal de pentobarbital, para ser perfundidos intaaorticamente con 150 ml de suero salino heparinizado y 300 ml de paraformaldehído al 4%. A continuación las médulas fueron extraídas inmediatamente, postfijadas durante 4 horas en la misma solución fijadora, crioprotectadas en una solución de sacarosa al 30% durante 72 horas, congeladas en medio de congelación Neg50 y almacenadas a -20 ° hasta su utilización. Finalmente, las médulas fueron cortadas en un criostato para la obtención de secciones transversales y longitudinales de 30 µm de grosor que se distribuyeron en 10 series de cortes paralelos.

### MALDI-Imaging-MS

Para preparar las muestras para la imagen por espectrometría de masas se siguió el procedimiento de sublimación, descrito en el apartado 3.1.2.3, empleando las matrices MBT y DAN. A continuación se midieron por MALDI-IMS, tal y como se describe en el apartado 3.3.2.3, utilizando los parámetros descritos en la tabla A-XIV de los apéndices, en el equipo LTQ Orbitrap XL.

Los datos se trataron y analizaron empleando el software dedicado (MSIAnalyst, NorayBioinformatics S. L.) seleccionando los picos cuya intensidad superaba el 1% de la intensidad máxima en el espectro promedio, realineando los espectros

mediante el método Xiong<sup>5</sup> asumiendo un desalineado máximo de 0.02 Da y normalizando todos los espectros frente a su TIC, ver apartado 4.2.3.1.

Se llevó a cabo un análisis multivariable de los datos con el objetivo de identificar las diferentes áreas de interés en los tejidos, principalmente sustancia blanca y gris, mediante PCA, descrito en el apartado 4.4.1, y mediante el algoritmo de clústering k-means<sup>6</sup> que incorpora el software MSAnalyst. Los espectros promedio de todos los clústeres se alinearon en una única matriz mediante un programa diseñado en Matlab, ver 4.5.1. Empleando una base de datos de lípidos generada en Matlab, tal y como se describe en el apartado 4.5.3, se llevó a cabo la asignación preliminar de las posibles especies detectadas mediante MALDI-IMS y posteriormente se confirmó mediante UHPLC-MS<sup>E</sup>. Las asignaciones se muestran en la tabla 5.6.1 y 5.6.2. Para clasificar los diferentes tipos de tejido se empleó PCA, utilizando como variables todos los aductos en primer lugar y finalmente la suma de los aductos de cada especie, con ayuda del software Unscrambler v9.7. En el CD de material suplementario se incluyen las tablas con todas las imágenes y la asignación preliminar de médula sana en CD-II.6.2 y CD-II.6.3, médula lesionada por contusión en CD-II.6.4 y CD-II.6.5, y médula desmielinizada CD-II.6.6 y CD-II.6.7.

#### UHPLC-ESI-MS<sup>E</sup>

Partiendo de extractos de lípidos de las médulas a concentración de 1 mg/ml disueltos en cloroformo, se prepararon alícuotas de 150 µl en cloroformo/metanol (1:2), ver sección 3.2, que se analizaron en el sistema LC/MS, ver 3.4.1.1. Los datos obtenidos se analizaron empleando el software de identificación de lípidos SimLipid (Premier Biosoft International, Corina Way, Palo Alto, CA - USA) y por comparación con estándares de PC, LPC, PE, PI, PA, PS, PG, DAG, TAG, SM (Avanti Polar Lipids, Inc.), preparados en las mismas condiciones que el extracto. Para facilitar el trabajo se redujo la lista preliminar a una sola especie por cada clase de lípido, m/z, aducto iónico formado y tiempo de retención, mediante un programa escrito en MatLab.

#### 5.6.2. Caracterización del lipidoma en médulas sanas

Las imágenes de lípidos obtenidas sobre secciones de médulas sanas reflejaron fielmente la anatomía básica de una sección transversal de médula de rata.<sup>7</sup> En ellas se identificaron inequívocamente la sustancia blanca (fig 5.6.1.a), la sustancia gris (fig 5.6.1.b), e incluso el ganglio de la raíz dorsal donde se junta con el cuerno dorsal de la materia gris (fig 5.6.1.c). En la figura 5.6.3, se muestran las imágenes de algunos canales másicos en modo de ionización positivo.

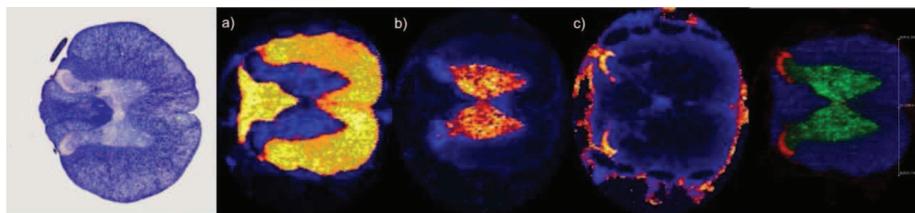


Fig 5.6.1. Distribución espacial de algunos canales másicos en modo de ionización positivo para un corte de médula sana medido a 25µm de resolución espacial en modo de ionización positivo.

El análisis por PCA de todos los clústeres de médula sana, en modo de ionización positivo, permitió la identificación de tres tipos de tejido mediante la componente 2 (CP2, figura 5.6.2): sustancia gris (SG) en color morado, sustancia blanca (SB) en azul claro y el ganglio de la raíz dorsal (astas), en lila, quedando los promedios, en gris, en una zona intermedia entre los tres tipos, pero más próximos a la sustancia gris.

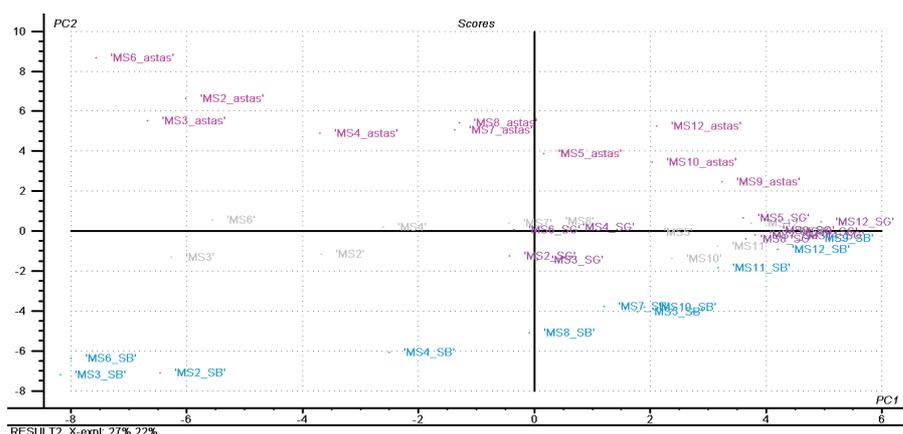


Fig 5.6.2. PCA de los clústeres determinados por k-means, de los cortes de médula sana en modo de ionización positivo.

Tabla 5.6.1. Asignaciones de lípidos en médula sana, en modo de ionización positivo. (Las abundancias relativas (%RA) se han normalizado para un valor de 100 en el pico 760.5851 de los promedios)

m/z exp	Lípido	Aductos	error (PPM)	% RA promedios	% RA SB	% RA SG	% RA astas
713.4545	*[PA_34:1 + K]+	K,Na	-2.96	0.32	0.03	0.17	0.62
697.4809	*[PA_34:1 + Na]+	K,Na	-3.51	0.15	0.01	0.04	0.34
739.472	*[PA_36:2 + K]+	K,Na	-5.36	6.49	7.36	8.03	9.07
723.497	*[PA_36:2 + Na]+	K,Na	-4.01	2.68	1.64	1.93	4.97
747.4923	*[PA_40:7 + H]+	H,Na	5.63	0.04	0.00	0.00	0.00
709.52	*[PA_O-38:5 + H]+	H	-3.89	0.17	0.30	0.01	0.08
742.5355	*[PC_31:0 + Na]+	Na	1.14	0.04	0.01	0.00	0.05
734.5725	*[PC_32:0 + H]+	H,K,Na	-3.33	12.53	2.50	20.35	40.19
772.528	*[PC_32:0 + K]+	H,K,Na	-2.67	3.04	0.58	2.86	6.69

**CAPITULO 5 – RESULTADOS. 5.6-ESTUDIO DE MODELOS DE LESIÓN EN MÉDULA DE RATA**

756.5546	*[PC_32:0 + Na]+	H,K,Na	-3.44	2.58	0.29	0.93	11.49
732.5584	*[PC_32:1 + H]+	H,Na	-5.45	0.59	0.36	0.56	2.02
760.5851	*[PC_34:1 + H]+	H,K,Na	0.80	100.00	101.50	167.85	114.64
798.5433	*[PC_34:1 + K]+	H,K,Na	-2.14	23.75	23.76	21.90	21.02
782.5692	*[PC_34:1 + Na]+	H,K,Na	-1.98	19.90	10.10	7.71	33.05
758.5718	*[PC_34:2 + H]+	H,Na	-2.30	1.27	1.21	1.70	2.52
780.5548	*[PC_34:2 + Na]+	H,Na	-3.59	0.16	0.08	0.03	0.40
788.6184	*[PC_36:1 + H]+	H,K,Na	-1.77	35.99	49.60	57.01	26.65
826.576	*[PC_36:1 + K]+	H,K,Na	-3.76	8.86	12.25	8.19	5.24
810.6012	*[PC_36:1 + Na]+	H,K,Na	-2.78	7.44	4.82	2.54	8.01
786.6029	*[PC_36:2 + H]+	H,K,Na	-1.96	8.82	14.35	11.76	6.85
824.5595	*[PC_36:2 + K]+	H,K,Na	-2.74	2.43	4.15	2.03	1.40
808.5866	*[PC_36:2 + Na]+	H,K,Na	-4.08	2.01	1.54	0.19	2.12
784.5922	*[PC_36:3 + H]+	H,K,Na	-8.28	0.11	0.04	0.04	0.14
806.5731	*[PC_36:3 + Na]+	H,K,Na	-6.76	0.03	0.01	0.00	0.05
782.5692	*[PC_36:4 + H]+	H,K,Na	1.09	12.90	9.13	23.23	26.78
820.527	*[PC_36:4 + K]+	H,K,Na	-1.29	2.51	2.16	2.81	2.62
804.5544	*[PC_36:4 + Na]+	H,K,Na	-2.98	2.98	0.71	0.91	6.16
816.6501	*[PC_38:1 + H]+	H,K,Na	-2.20	1.25	2.53	0.86	0.51
854.6071	*[PC_38:1 + K]+	H,K,Na	-3.41	0.25	0.65	0.12	0.08
838.6382	*[PC_38:1 + Na]+	H,K,Na	-9.48	0.11	0.13	0.01	0.06
814.6351	*[PC_38:2 + H]+	H	-3.00	1.53	3.26	1.12	0.43
810.6012	*[PC_38:4 + H]+	H,Na	0.19	5.04	5.70	10.65	14.39
832.5868	*[PC_38:4 + Na]+	H,Na	-4.20	1.23	0.60	0.45	3.98
806.5731	*[PC_38:6 + H]+	H,K,Na	-3.78	3.89	1.20	13.95	2.43
844.5272	*[PC_38:6 + K]+	H,K,Na	-1.49	0.65	0.32	1.54	0.34
828.5572	*[PC_38:6 + Na]+	H,K,Na	-6.28	0.16	0.00	0.13	0.09
811.5848	*[PG_O-38:2 + Na]+	Na	-2.30	0.11	0.27	0.01	0.00
703.5757	*[SM_d34:1 + H]+	H,Na	-0.44	0.34	0.04	0.04	1.28
725.5607	*[SM_d34:1 + Na]+	H,Na	-4.64	0.80	0.02	0.04	1.91
731.6097	*[SM_d36:1 + H]+	H,K,Na	-4.11	0.68	0.67	0.75	1.78
769.568	*[SM_d36:1 + K]+	H,K,Na	-7.05	0.93	0.81	0.66	1.50
753.5909	*[SM_d36:1 + Na]+	H,K,Na	-3.01	0.51	0.11	0.12	1.31
825.6301	*[SM_d40:1 + K]+	K,Na	-5.97	0.07	0.06	0.00	0.20
809.6526	*[SM_d40:1 + Na]+	K,Na	-1.69	0.05	0.01	0.00	0.12
815.6994	*[SM_d42:1 + H]+	H,K,Na	1.46	0.00	0.00	0.00	0.49
853.6629	*[SM_d42:1 + K]+	H,K,Na	-7.53	0.19	0.03	0.05	0.84
837.6849	*[SM_d42:1 + Na]+	H,K,Na	-2.82	0.32	0.01	0.05	0.71
813.6873	*[SM_d42:2 + H]+	H,K	-2.90	1.93	3.22	1.15	3.04
851.6428	*[SM_d42:2 + K]+	H,K	-2.32	2.07	3.38	0.74	2.75
849.6421	*[TG_49:5 + K]+	K	-5.53	0.28	0.25	0.05	0.05
853.7256	*[TG_50:2 + Na]+	Na	0.54	0.04	0.00	0.00	0.02
834.6016	[PC_38:3 + Na]+	Na	-3.18	1.01	0.26	3.82	0.38
866.6588	[PC_40:1 + Na]+	Na	3.17	0.64	1.15	0.30	0.16
746.6084	[PC_O-34:1 + H]+ / [PC_P-34:0 + H]+	H,Na	-2.63	10.96	22.88	7.99	5.63
768.5918	[PC_O-34:1 + Na]+ /[PC_P-34:0 + Na]+	H,Na	-4.44	1.62	2.46	0.50	1.45
744.5955	[PC_O-34:2 + H]+/ [PC_P-34:1 + H]+	H,K	-6.33	1.09	2.41	0.36	0.37
772.6243	[PC_O-36:2 + H]+/ [PC_P-36:1 + H]+	H,K,Na	-2.86	3.99	9.32	1.85	1.14
810.583	[PC_O-36:2 + K]+/ [PC_P-36:1 + K]+	H,K,Na	-6.20	0.18	0.41	0.04	0.03
794.6055	[PC_O-36:2 + Na]+/ [PC_P-36:1 + Na]+	H,K,Na	-1.84	0.41	0.77	0.10	0.18
794.6055	[PC_O-38:5 + H]+/ [PC_P-38:4 + H]+	H,K	1.18	0.00	0.00	0.00	0.00

**CAPITULO 5 – RESULTADOS. 5.6-ESTUDIO DE MODELOS DE LESIÓN EN MÉDULA DE RATA**

\* Especies confirmadas por UHPLC-MS

El análisis PCA de los resultados obtenidos en modo de ionización negativo, no permitió distinguir SB de SG, probablemente debido a que fue necesario recrystallizar la matriz para hacer las medidas.

**Tabla 5.6.2. Asignaciones de lípidos en médula sana, en modo de ionización negativo. (Las abundancias relativas (%RA) se han normalizado para un valor de 100 en el pico 888.624)**

m/z exp	Lípido	error (ppm)	% RA
715.4648	[PG_32:3 - H]-	-13.62	1.43
716.5891	[CerP_d41:0 - H]-	9.34	1.05
744.4561	[PENMe_36:8 - H]-	5.92	2.63
762.5654	[PS_O-35:0 - H]-	-0.54	1.09
774.5988	[PE_38:0 - H]-	3.23	1.81
788.5962	[GlcCer_d41:5 - H]-	9.94	4.10
790.5892	[PS_O-37:0 - H]-	8.97	6.82
824.7036	[GlcCer_d43:1 - H]-	-6.92	3.23
826.7183	[GlcCer_d43:0 - H]-	-5.70	5.48
860.6223	[PE_45:6 - H]-	-6.21	3.42
	[PENMe_44:6 - H]-	-6.15	3.42
	[PE_45:5 - H]-	-6.72	9.23
862.6384	[PENMe_44:5 - H]-	-6.66	9.23
867.5274	[PG_44:11 - H]-	-11.23	5.30
867.6171	[PG_43:4 - H]-	-6.39	2.17
878.6268	[PS_O-44:5 - H]-/[PS_P-44:4 - H]-	0.90	5.30
	[PE_46:4 - H]-	-4.21	1.50
878.6676	[PENMe_45:4 - H]-	-4.15	1.50
885.5499	*[PI_38:4 - H]-	-0.56	28.04
886.5711	[Sulfatide_t41:4 - H]-	0.29	2.86
886.6284	[PENMe_46:7 - H]-	4.80	3.52
888.624	*[Sulfatide_d42:2 - H]-	-0.67	100.00
	[PE_47:5 - H]-	-8.08	3.49
890.6711	[PENMe_46:5 - H]-	-8.02	3.49
892.6657	[PI-Cer_d42:0 - H]-	-1.69	1.15
895.5818	[PGP_O-40:2 - H]-/[PGP_P-40:1 - H]-	1.27	1.89
897.581	[PI_O-40:5 - H]-/[PI_P-40:4 - H]-	5.34	1.67
905.5155	[PI_40:8 - H]-	2.88	1.59
906.6602	[PS_O-46:5 - H]-/[PS_P-46:4 - H]-	-1.44	3.18
907.5381	[PI_40:7 - H]-	-4.79	1.81
923.579	[PGP_41:2 - H]-	-1.24	3.07
949.4869	[PIP_37:5 - H]-	-2.63	1.21
975.6422	[PGP_O-46:4 - H]-	3.42	1.24
991.6383	[PGP_46:3 - H]-	2.17	1.16

\* Especies confirmadas por UHPLC-MS

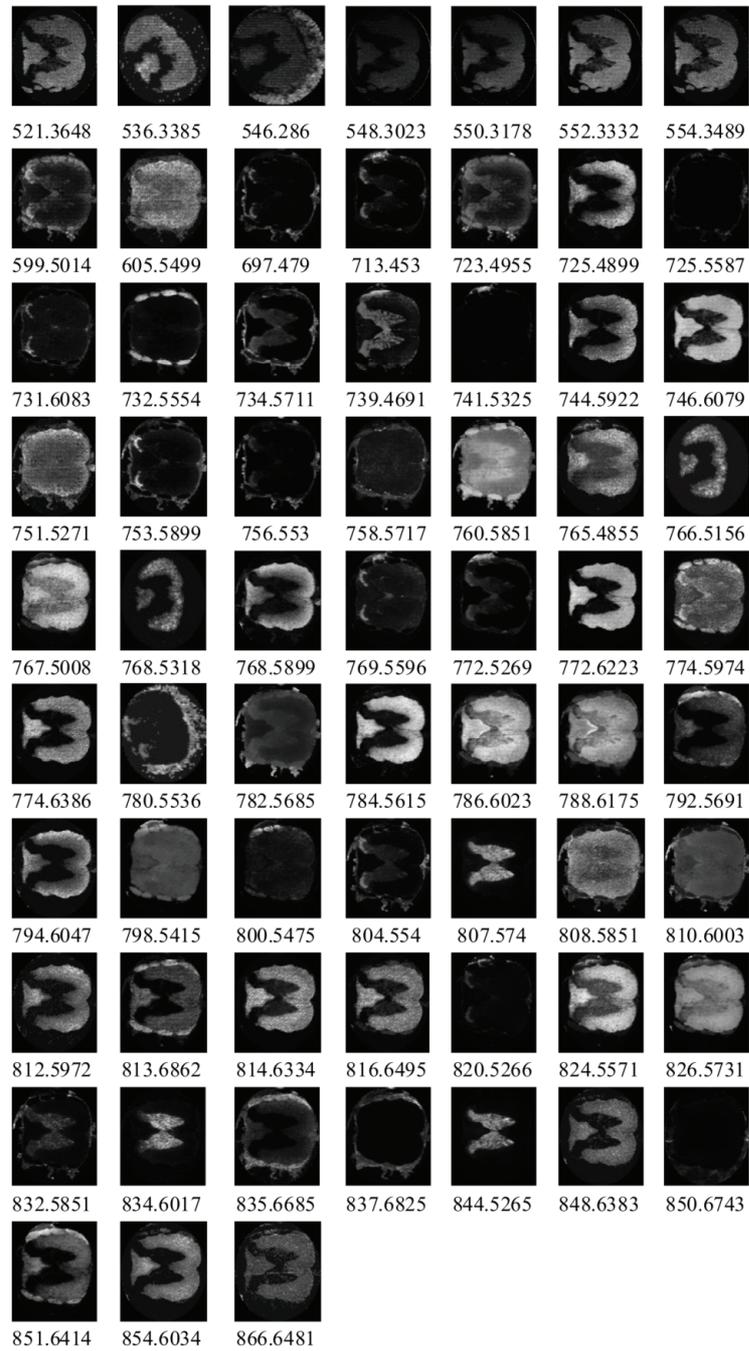


Fig 5.6.3. Distribución espacial de algunos de los canales másicos detectados en médulas sanas en MALDI-Imaging en modo de ionización positivo

**5.6.3. Caracterización del lipidoma en médulas lesionadas por contusión o por desmielinización parcial o general en modo de ionización positivo**

El análisis de las médulas lesionadas, se vio complicado por los daños del tejido que resultaba en muchos casos en una falta de división clara entre las áreas anatómicas de la médula. Así, se hizo una clasificación preliminar de los clústeres obtenidos mediante k-means y a continuación se comprobó mediante PCA si se obtenía una separación clara entre tipos de tejido.

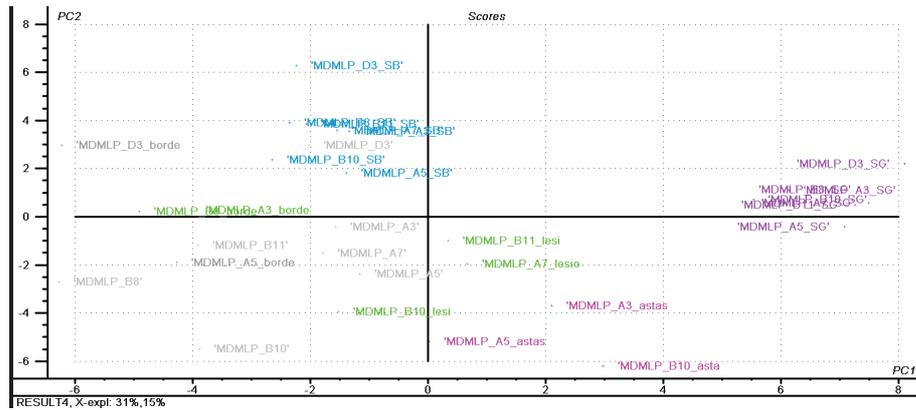


Fig 5.6.4. PCA de los clústeres determinados por k-means, de los cortes de médula desmielinizada parcialmente en modo de ionización positivo.

En la figura 5.6.4, se muestra cómo, a pesar de la dificultad descrita, en los cortes de médula parcialmente desmielinizada medidos en modo de ionización positivo, los clústeres de cada tipo de tejido se pudieron clasificar correctamente como sustancia gris (SG, en morado), sustancia blanca (SB, en azul), bordes, en gris oscuro, lesión, en verde y astas, en lila.

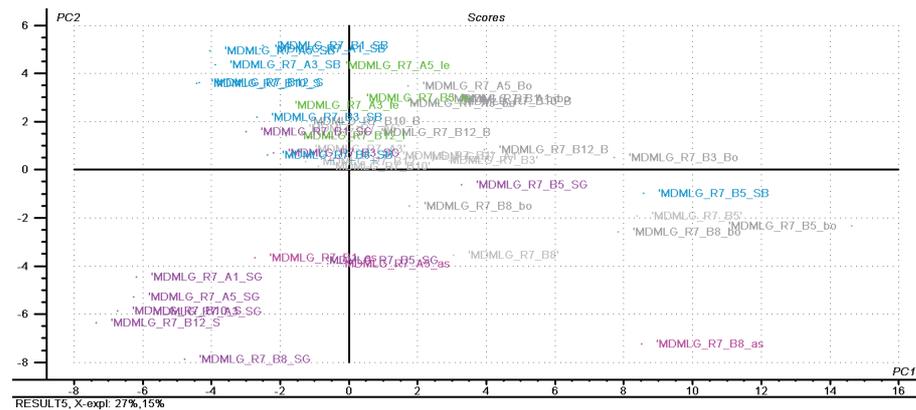


Fig 5.6.5. PCA de los clústeres determinados por k-means, de los cortes de médula con desmielinización general en modo de ionización positivo.

En el caso de los datos recogidos en modo de ionización positivo para las médulas con desmielinización general, figura 5.6.5, SG, en morado y SB en azul, se distinguieron perfectamente, mientras que aunque agrupados, los otros tipos de tejido menos definidos como los bordes, en gris oscuro, la lesión, en verde y las astas, en lila, son más difíciles de distinguir entre sí.

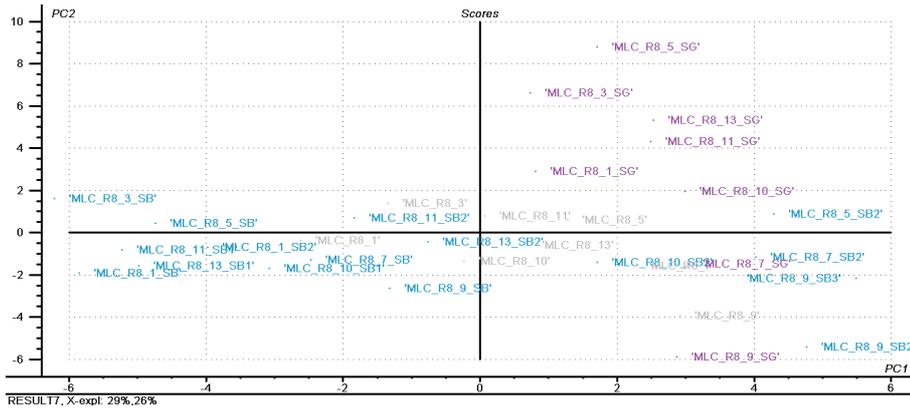


Fig 5.6.6. PCA de los clústeres determinados por k-means, en los espectros en modo de ionización positivo de los cortes de médula lesionada por contusión.

En médula lesionada por contusión (fig. 5.6.6), pese a la dificultad de la asignación de los clústeres a un tipo de tejido u otro, se consiguió una clasificación aceptable de la SB, en azul, y SG, en morado, si bien, aquellos clústeres denominados SB2, parecían tener más similitud con los clústeres de SG que con el resto de clústeres de SB. SB2 comprenden los clústeres más alejados del centro de la médula, por lo que bien podrían corresponderse con las astas, que presentaron una composición muy parecida a la de SG en el resto de muestras.

El siguiente paso fue hacer un PCA de todos los clústeres, para comprobar si estos tenían preferencia por agruparse según el tipo de tejido o según el tipo de lesión. Tal y como se observa en la figura 5.6.7.a, al hacer el PCA sobre los espectros en modo de ionización positivo, se consiguió una muy buena separación de los clústeres en función del tipo de lesión: médula sana (MS) en color gris; médula lesionada por contusión (MLC), en lila; y médula con desmielinización general (MDMLG), marrón, y parcial (MDMLP), gris claro, que se agruparon conjuntamente. Además, como se ve en la figura 5.6.7.b, cada conjunto de experimentos estaba definido también por un conjunto de aductos perfectamente diferenciados. Es decir, la lesión parece afectar a la composición de toda la médula y no sólo a aquellas partes visiblemente dañadas por la contusión o por los LPCs.

Se agruparon SG y SB, que fueron las regiones con una composición más específica y distinguible en todos los tipos de muestra y se ignoraron astas, SB2,



CAPITULO 5 – RESULTADOS. 5.6-ESTUDIO DE MODELOS DE LESIÓN EN MÉDULA DE RATA

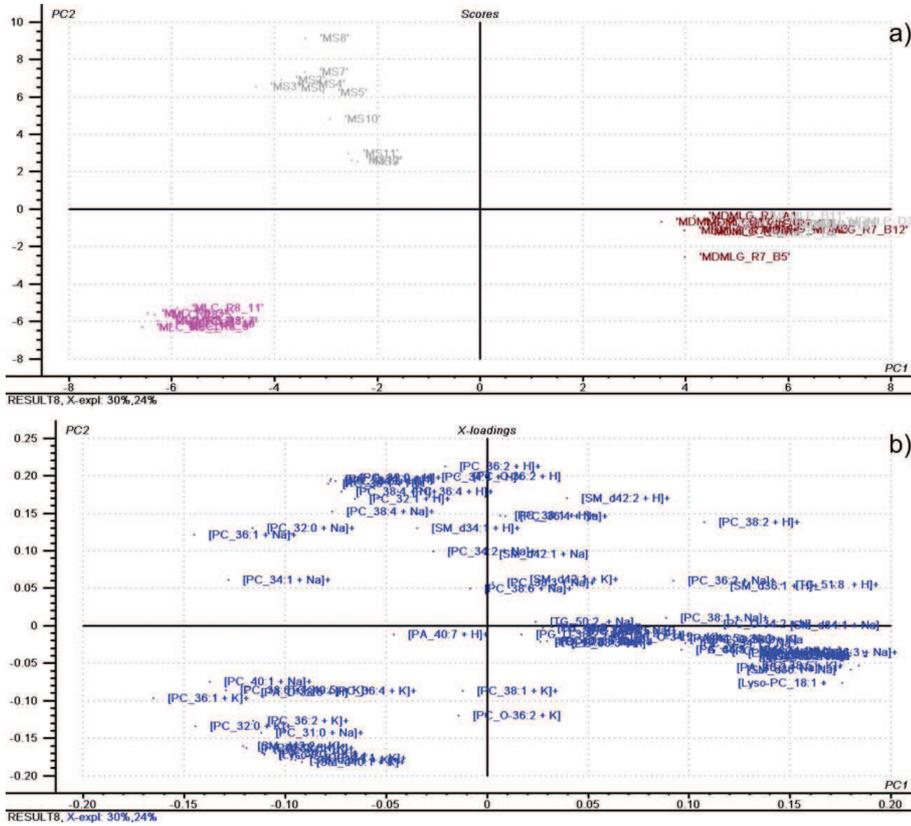


Fig 5.6.8. PCA de los promedios en modo de ionización positivo. a) Muestras o scores usando la nomenclatura "Tipo\_NºSección". b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

Tabla 5.6.3. Aductos de lípidos característicos en los promedios de los tres tipos de muestra.

MLC	MDML	MS
[Lyso-PC_18:1 + K]+	[Lyso-PC_18:1 + H]+	[SM_d34:1 + H]+
[PA_O-38:5 + H]+	[Lyso-PC_18:1 + Na]+	[PC_32:1 + H]+
[PA_34:1 + K]+	[PA_34:1 + Na]+	[PC_32:0 + H]+
[PA_36:2 + K]+	[PC_O-30:2 + Na]+	[PC_O-34:1 + H]+
[PC_31:0 + Na]+	[PA_36:2 + Na]+	[PC_32:0 + Na]+
[PA_38:5 + K]+	[SM_d34:1 + Na]+	[PC_34:2 + H]+
[SM_d36:1 + K]+	[SM_d36:1 + H]+	[PC_34:1 + H]+
[PC_32:0 + K]+	[PC_O-34:2 + H]+	[PC_O-36:2 + H]+
[PC_34:1 + K]+	[PA_40:6 + H]+	[PC_34:2 + Na]+
[PC_36:4 + K]+	[SM_d36:1 + Na]+	[PC_34:1 + Na]+
[PC_36:2 + K]+	[PC_O-34:1 + Na]+	[PC_36:4 + H]+
[SM_d40:1 + K]+	[PA_40:7 + Na]+	[PC_36:2 + H]+
[PC_36:1 + K]+	[PC_33:0 + Na]+	[PC_36:1 + H]+
[PC_38:6 + K]+	[PC_36:3 + H]+	[PC_38:6 + H]+
[TG_49:5 + K]+	[PC_O-36:3 + Na]+	[PC_36:1 + Na]+
[SM_d42:2 + K]+	[PC_O-38:5 + H]+	[PC_38:4 + H]+
[PC_40:1 + Na]+	[PG_36:1 + Na]+	[PC_38:6 + Na]+
	[PC_36:3 + Na]+	[PC_38:4 + Na]+
	[PA_44:5 + H]+	
	[PC_O-36:3 + K]+	
	[PC_36:2 + Na]+	
	[SM_d40:1 + Na]+	
	[PC_38:2 + H]+	
	[PA_44:5 + Na]+	
	[PC_38:1 + Na]+	

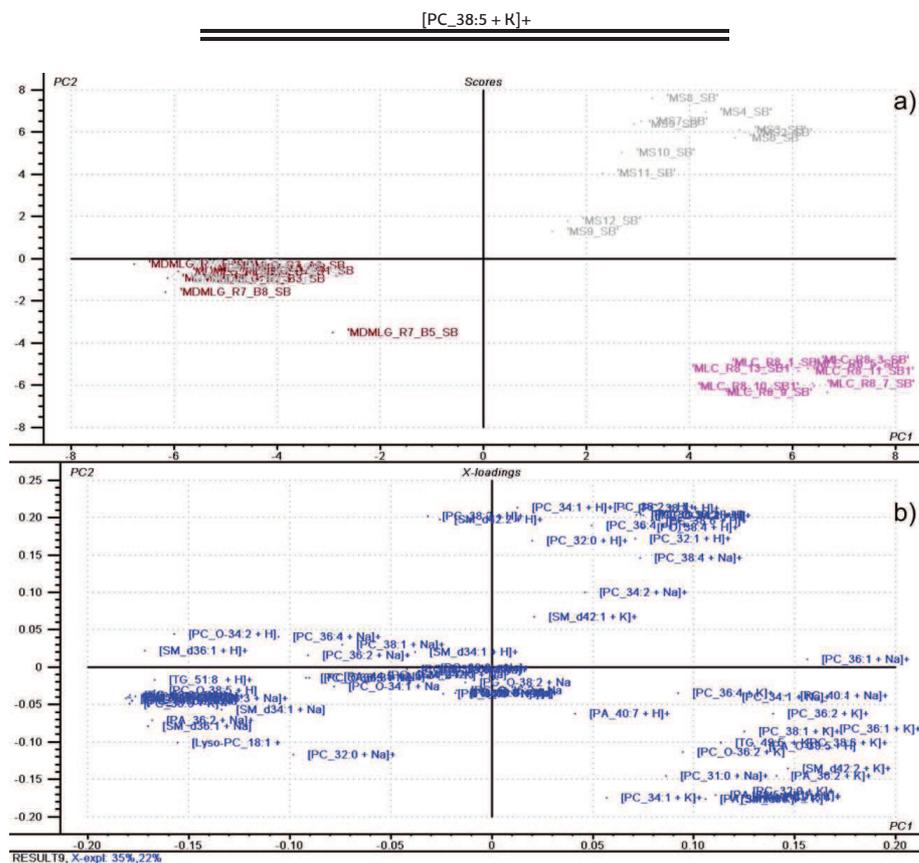


Fig 5.6.9. PCA de todos los clústeres de SB determinados por *k*-means en modo de ionización positivo. a) Muestras o scores usando la nomenclatura "Tipo\_NºSección\_Clúster". b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

Si en lugar de emplear los espectros promedio sobre toda la sección se emplean únicamente los clústeres de SB se obtienen resultados similares, primando el catión de los aductos en la clasificación. En la tabla 5.6.4 se muestran los aductos característicos de cada tipo de muestra en la sustancia blanca.

Tabla 5.6.4. Aductos de lípidos característicos en la SB de los tres tipos de muestra.

MLC	MDML	MS
[Lyso-PC_18:1 + K]+	[Lyso-PC_18:1 + H]+	[PC_32:1 + H]+
[PA_O-38:5 + H]+	[Lyso-PC_18:1 + Na]+	[PC_32:0 + H]+
[PA_34:1 + K]+	[PA_34:1 + Na]+	[PC_O-34:1 + H]+
[PA_36:2 + K]+	[SM_d34:1 + H]+	[PC_34:2 + H]+
[PC_31:0 + Na]+	[PC_O-30:2 + Na]+	[PC_34:1 + H]+
[PA_40:7 + H]+	[PA_36:2 + Na]+	[PC_O-36:2 + H]+
[PA_38:5 + K]+	[SM_d34:1 + Na]+	[PC_34:2 + Na]+
[SM_d36:1 + K]+	[SM_d36:1 + H]+	[PC_36:4 + H]+
[PC_32:0 + K]+	[PC_O-34:2 + H]+	[PC_36:2 + H]+
[PC_34:1 + Na]+	[PA_40:6 + H]+	[PC_36:1 + H]+
[PC_34:1 + K]+	[SM_d36:1 + Na]+	[PC_38:6 + H]+
[PC_O-36:2 + K]+	[PC_O-34:1 + Na]+	[PC_38:4 + H]+
[PC_36:1 + Na]+	[PA_40:7 + Na]+	[SM_d42:2 + H]+

CAPITULO 5 – RESULTADOS. 5.6-ESTUDIO DE MODELOS DE LESIÓN EN MÉDULA DE RATA

[PC_36:4 + K]+	[PC_33:0 + Na]+	[PC_38:2 + H]+
[PC_36:2 + K]+	[PE_38:3 + H]+	[PC_38:1 + H]+
[SM_d40:1 + K]+	[PG_34:1 + Na]+	[PC_38:4 + Na]+
[PC_36:1 + K]+	[PC_O-34:2 + K]+	[SM_d42:1 + K]+
[PC_38:6 + K]+	[PC_36:3 + H]+	
[TG_49:5 + K]+	[PC_O-36:3 + Na]+	
[SM_d42:2 + K]+	[PC_O-36:2 + Na]+	
[PC_38:1 + K]+	[PC_O-38:5 + H]+	
[PC_40:1 + Na]+	[PG_36:1 + Na]+	
	[PC_36:4 + Na]+	
	[PC_36:3 + Na]+	
	[PA_44:5 + H]+	
	[PC_O-36:3 + K]+	
	[PC_36:2 + Na]+	
	[SM_d40:1 + Na]+	
	[PG_O-38:2 + Na]+	
	[TG_48:8 + Na]+	
	[PC_38:6 + Na]+	
	[PA_44:5 + Na]+	
	[PC_O-38:5 + K]+	
	[PC_38:3 + Na]+	
	[PC_40:6 + H]+	
	[SM_d42:1 + Na]+	
	[PC_38:1 + Na]+	
	[PC_38:5 + K]+	
	[PC_40:6 + Na]+	
	[PC_40:6 + K]+	

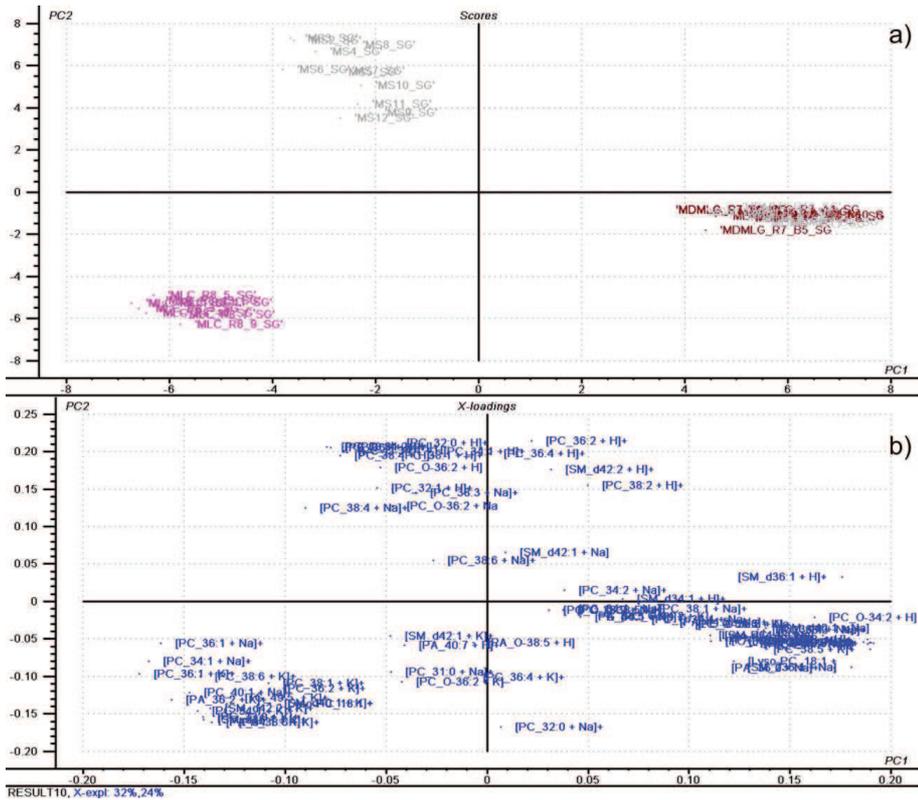


Fig 5.6.10. PCA de todos los clústeres de SG determinados por *k*-means en modo de ionización positivo. a) Muestras o scores usando la nomenclatura "Tipo\_NºSección\_Clúster". b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

Como cabía esperar, lo mismo ocurre si se emplean los clústeres de SG para hacer la clasificación de los aductos. Una vez más, se observó cómo el catión del aducto tuvo una mayor influencia en la separación que las especies lipídicas. Como en el análisis con todos los clústers, se observó una mayor tendencia a la protonación en la médula sana (MS), a formar el aducto con sodio en los desmielinizados (MDMLP y MDMLG), y con potasio en los lesionados por contusión (MLC). En la tabla 5.6.5 se muestran los aductos característicos de cada tipo de muestra en sustancia gris.

Tabla 5.6.5. Aductos de lípidos característicos en la SG de los tres tipos de muestra.

MLC	MDML	MS
[Lyso-PC_18:1 + K] <sup>+</sup>	[Lyso-PC_18:1 + H] <sup>+</sup>	[PC_32:1 + H] <sup>+</sup>
[PA_34:1 + K] <sup>+</sup>	[Lyso-PC_18:1 + Na] <sup>+</sup>	[PC_32:0 + H] <sup>+</sup>
[PA_36:2 + K] <sup>+</sup>	[PA_34:1 + Na] <sup>+</sup>	[PC_O-34:1 + H] <sup>+</sup>
[PA_38:5 + K] <sup>+</sup>	[SM_d34:1 + H] <sup>+</sup>	[PC_34:2 + H] <sup>+</sup>
[SM_d36:1 + K] <sup>+</sup>	[PC_O-30:2 + Na] <sup>+</sup>	[PC_34:1 + H] <sup>+</sup>
[PC_32:0 + K] <sup>+</sup>	[PA_36:2 + Na] <sup>+</sup>	[PC_O-36:2 + H] <sup>+</sup>
[PC_34:1 + Na] <sup>+</sup>	[SM_d34:1 + Na] <sup>+</sup>	[PC_36:1 + H] <sup>+</sup>
[PC_34:1 + K] <sup>+</sup>	[SM_d36:1 + H] <sup>+</sup>	[PC_O-36:2 + Na] <sup>+</sup>
[PC_36:1 + Na] <sup>+</sup>	[PC_O-34:2 + H] <sup>+</sup>	[PC_38:6 + H] <sup>+</sup>
[PC_36:2 + K] <sup>+</sup>	[PA_40:6 + H] <sup>+</sup>	[PC_38:4 + H] <sup>+</sup>
[SM_d40:1 + K] <sup>+</sup>	[SM_d36:1 + Na] <sup>+</sup>	[PC_38:1 + H] <sup>+</sup>
[PC_36:1 + K] <sup>+</sup>	[PC_O-34:1 + Na] <sup>+</sup>	[PC_38:6 + Na] <sup>+</sup>
[PC_38:6 + K] <sup>+</sup>	[PA_40:7 + Na] <sup>+</sup>	[PC_38:4 + Na] <sup>+</sup>
[TG_49:5 + K] <sup>+</sup>	[PC_33:0 + Na] <sup>+</sup>	[PC_38:3 + Na] <sup>+</sup>
[SM_d42:2 + K] <sup>+</sup>	[PG_34:1 + Na] <sup>+</sup>	
[PC_38:1 + K] <sup>+</sup>	[PC_34:2 + Na] <sup>+</sup>	
[PC_40:1 + Na] <sup>+</sup>	[PC_O-34:2 + K] <sup>+</sup>	
	[PC_36:3 + H] <sup>+</sup>	
	[PC_O-36:3 + Na] <sup>+</sup>	
	[PC_O-38:5 + H] <sup>+</sup>	
	[PG_36:1 + Na] <sup>+</sup>	
	[PC_36:4 + Na] <sup>+</sup>	
	[PC_36:3 + Na] <sup>+</sup>	
	[PA_44:5 + H] <sup>+</sup>	
	[PC_O-36:3 + K] <sup>+</sup>	
	[PC_36:2 + Na] <sup>+</sup>	
	[SM_d40:1 + Na] <sup>+</sup>	
	[PG_O-38:2 + Na] <sup>+</sup>	
	[PA_44:5 + Na] <sup>+</sup>	
	[PC_O-38:5 + K] <sup>+</sup>	
	[PC_38:1 + Na] <sup>+</sup>	
	[PC_38:5 + K] <sup>+</sup>	

- Las PC-O también pueden ser PC-P con una insaturación menos

Para eliminar la influencia de los aductos en el análisis, se sumaron todos los aductos de cada especie y se hizo de nuevo el análisis, figura 5.6.11. Empleando todos los clústeres se observó, que de nuevo, la MLC, en lila, y la MS, en gris, seguían apareciendo bien diferenciadas, mientras que la diferencia entre MDMLP y MDMLG, en gris claro y marrón respectivamente, no fueron suficientes como para permitir su separación en el análisis estadístico.

CAPITULO 5 – RESULTADOS. 5.6-ESTUDIO DE MODELOS DE LESIÓN EN MÉDULA DE RATA

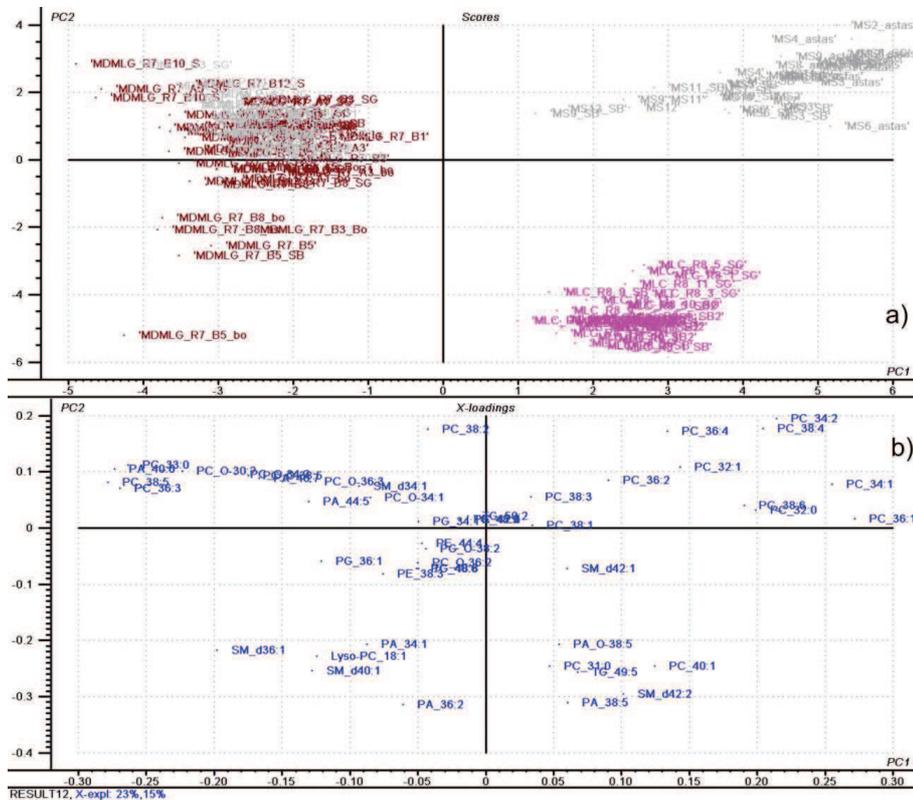


Fig 5.6.11. PCA de todos los clústeres determinados por k-means en modo de ionización positiva, utilizando la suma de los aductos de cada especie como variables. a) Muestras o scores usando la nomenclatura "Tipo\_NºSección\_Clúster". b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

Para determinar si la diferencia en la composición lipídica influye más en la clasificación de los tejidos que el tipo de aducto formado en cada tipo de tejido, se realizó de nuevo el análisis PCA de los clústeres, pero esta vez con los aductos sumados. Como se observa en la figura 5.6.12, para todos los tipos de muestra: MS, MLC, MDMLP y MDMLG, se obtuvo una separación prácticamente idéntica a la obtenida empleando los aductos. Esto demuestra que la relación de aductos, tan relevante entre los distintos tipos de muestras, no presenta diferencias significativas dentro de un mismo tipo de muestra, ni influye en la clasificación entre SB, SG y astas.

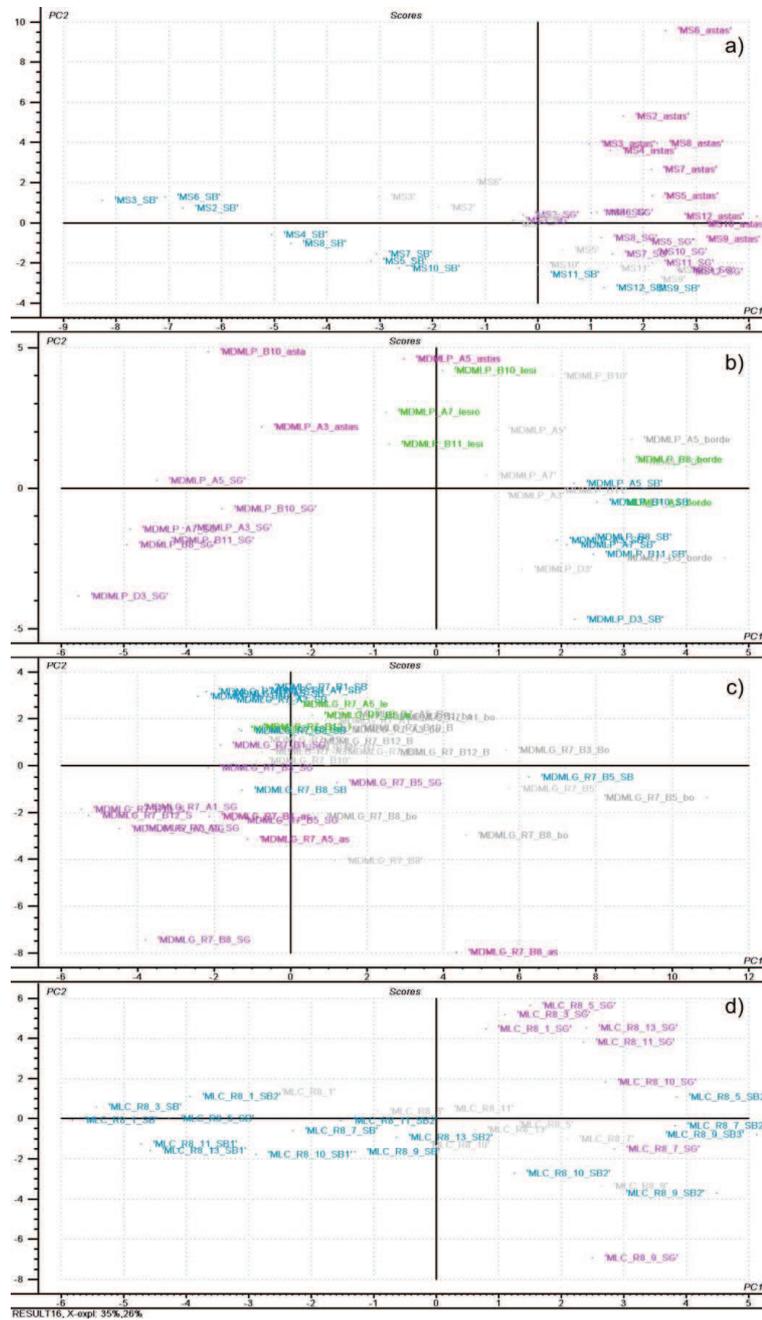


Fig 5.6.12. PCA de los clústeres determinados por k-means en modo de ionización positivo, utilizando la suma de los aductos de cada especie como variables. a) MS. b) MDMLP. c) MDMLG. d) MLC.

A continuación se hizo el análisis de los promedios, SG y SB, por separado con los aductos sumados como variables, para comprobar si la diferencia en el perfil

**CAPITULO 5 – RESULTADOS. 5.6-ESTUDIO DE MODELOS DE LESIÓN EN MÉDULA DE RATA**

lipídico entre cada tipo de muestra se mantenía para los distintos tejidos, obteniendo una separación igualmente buena que en el caso del análisis empleando todos los clústeres (ver figuras 5.6.2 y 5.6.4-5.6.6)

Cuando se hizo el PCA sobre los promedios de los cortes empleando las sumas de los aductos como variables, figura A-XV de los apéndices, se obtuvo una buena clasificación de MS, MLC y las desmielinizadas, MDMLP y MDMLG, que aparecen juntas. Además, se vieron algunos grupos de especies lipídicas asociadas a cada agrupación de cortes. Al hacer el PCA sobre los clústeres de SB, figura A-XVI de los apéndices, se obtuvo, al igual que en los promedios, una buena clasificación de los diferentes tipos de muestra, con cada tipo de muestra asociado a un grupo de lípidos. Al hacer el PCA sobre los clústeres de SG, figura A-XII, se obtuvo, al igual que en los promedios y en los de SB, una buena clasificación de los diferentes tipos de muestra, con cada tipo de muestra asociado a un grupo de lípidos. En la tabla 5.6.6 se muestran las especies características de cada muestra en cada tipo de tejido y en los promedios. Es decir, existe una sólida diferencia en la composición lipídica de cada tipo de muestra y tejido, que se manifiesta en cada uno de los análisis realizados, además de una demostrada diferencia en el tipo de aducto preferencial.

**Tabla 5.6.6. Aductos de lípidos característicos de los tres tipos de muestra en los promedios, SB y SG.**

Promedios			SB			SG		
MLC	MDML	MS	MLC	MDML	MS	MLC	MDML	MS
PA_38:5	PA_40:6	PC_32:0	PA_38:5	PA_40:6	PC_32:1	Lyso-PC_18:1	PA_40:6	PC_32:0
PA_O-38:5	PA_40:7	PC_32:1	PA_O-38:5	PA_40:7	PC_34:1	PA_34:1	PA_40:7	PC_32:1
PC_31:0	PA_44:5	PC_34:1	PC_31:0	PA_44:5	PC_34:2	PA_36:2	PA_44:5	PC_34:1
PC_40:1	PC_33:0	PC_34:2	PC_32:0	PC_33:0	PC_36:1	PA_38:5	PC_33:0	PC_34:2
SM_d42:2	PC_36:3	PC_36:1	PC_40:1	PC_36:3	PC_36:2	PA_O-38:5	PC_36:3	PC_36:1
TG_49:5	PC_38:5	PC_36:2	SM_d42:2	PC_38:3	PC_36:4	PC_31:0	PC_38:5	PC_36:2
	PC_O-30:2	PC_36:4	TG_49:5	PC_38:5	PC_38:1	PC_40:1	PC_O-30:2	PC_38:1
	PC_O-34:1	PC_38:4		PC_40:6	PC_38:2	SM_d36:1	PC_O-34:1	PC_38:3
	PC_O-34:2	PC_38:6		PC_O-30:2	PC_38:4	SM_d40:1	PC_O-34:2	PC_38:4
	PC_O-36:3			PC_O-34:2	PC_38:6	SM_d42:1	PC_O-36:3	PC_38:6
	PC_O-38:5			PC_O-36:2	PC_O-34:1	SM_d42:2	PC_O-38:5	PC_O-36:2
	PG_36:1			PC_O-36:3		TG_49:5	PG_34:1	
	SM_d34:1			PC_O-38:5			PG_36:1	
				PE_38:3			PG_O-38:2	
				PG_34:1			SM_d34:1	
				PG_36:1				
				PG_O-38:2				
				SM_d34:1				
				SM_d42:1				
				TG_48:8				

5.6.4. Estudio de las médulas tratadas en modo de ionización positivo

Una vez caracterizados los cambios en el lipidoma introducidos por las lesiones, es posible evaluar si un tratamiento determinado tiene efecto en la recuperación del animal tras la lesión. Para este estudio, se probaron 4 tratamientos diferentes sobre médulas lesionadas por contusión:

1. Tratamiento con ASC de rata (LTR, Verde en los gráficos)
2. Tratamiento con ASC de rata modificadas (LTRM, Azul claro en los gráficos)
3. Tratamiento con ASC humanas (LTH, Azul oscuro en los gráficos)
4. Tratamiento con ASC humanas modificadas (LTHM, Rojo en los gráficos)

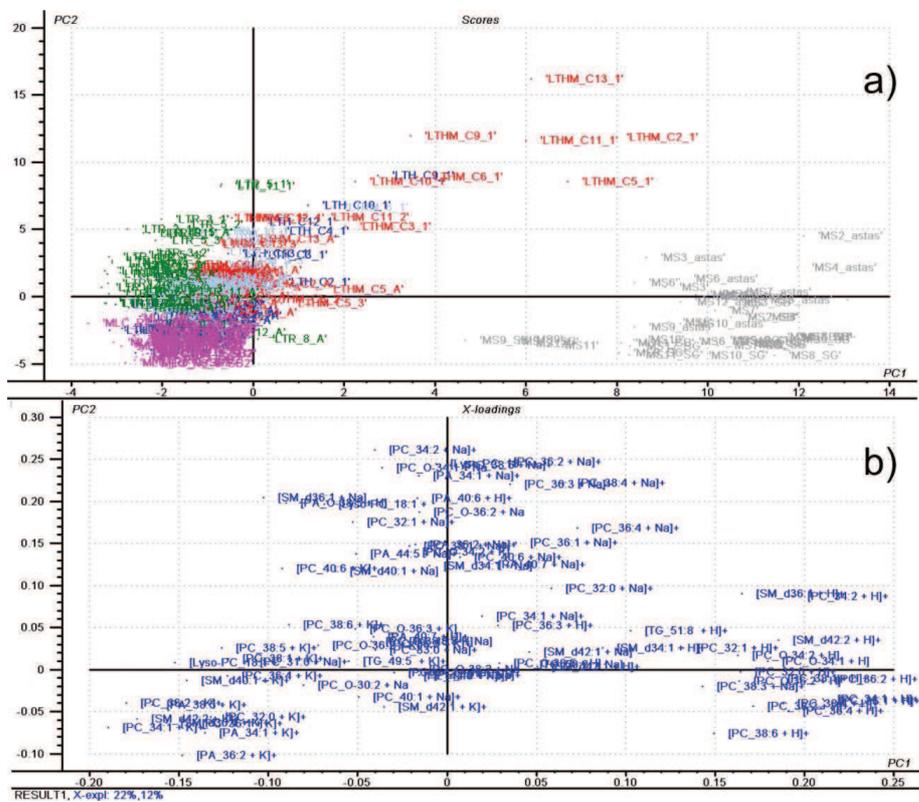


Fig 5.6.13. PCA de todos los clústeres determinados por k-means en modo de ionización positivo. a) Muestras o scores usando la nomenclatura "Tipo\_NºSección\_Clúster". b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

En primera aproximación, se emplearon como variables los aductos de lípidos detectados e identificados, se compararon todos los clústeres y promedios y se realizó un análisis PCA para comprobar si los diversos tratamientos resultaron en un cambio en la evolución de la lesión, que quedase reflejado en un cambio en el

lipidoma suficientemente importante como para permitir una clasificación acorde al tipo de tratamiento o por tipo de tejido, dentro de cada médula.

Ya que en la mayor parte de los casos fue difícil distinguir la sustancia blanca (SB) de la sustancia gris (SG) en médulas tan dañadas, los clústeres se etiquetaron con un número, asignando el 1 al clúster más interior del corte, y aumentando con la distancia al centro de la sección.

En la figura 5.6.13 se observa claramente que el lipidoma de todas las muestras tratadas es similar, quedando todas las muestras agrupadas en torno al eje de coordenadas, excepto las correspondientes al clúster 1 de las muestras tratadas con ACS humanas u humanas modificadas. Al analizar las proyecciones de los aductos, se observó que el agrupamiento viene motivado por el catión con el que formaron el aducto los lípidos. Todos los aductos de las médulas contusionadas y casi todos los de las que recibieron algún tipo de tratamiento se agruparon en torno a los aductos con  $K^+$ , mientras que las médulas sanas, o control, se agruparon en torno a los aductos con  $H^+$ , sin embargo, los clústeres del tipo 1 de las LTHM, se agruparon en torno a los aductos con  $Na^+$ . Esto parece indicar que el tratamiento con ACS de humano modificadas produjo un cambio en el ratio  $Na^+/K^+/H^+$  en al menos una de las regiones de las médulas. Se consideró conveniente analizar cada tipo de muestra por separado para clasificar los diferentes tipos de tejido y a continuación, comparar los tejidos equivalentes en los diferentes tipos de muestra.

#### Lesión y tratamiento con ASC de rata (LTR):

En la figura 5.6.14 se muestran las tinciones de los cortes de medula de rata lesionada por contusión y tratadas con ASC de rata. Los cortes más próximos al centro de la lesión son los que van del 6 al 10.

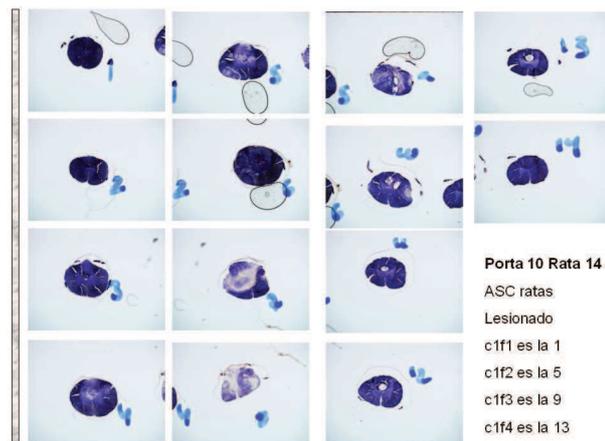


Fig 5.6.14. Tinción de los cortes de médula lesionada por contusión y tratada con ASC de rata (LTR)

El análisis estadístico por PCA sólo fue capaz de realizar cierta clasificación de los diferentes tipos de tejido en las muestras tratadas con ASC de Rata. Cuando se emplearon las PCs 2 y 3. Como se observa en la figura 5.6.15, los promedios se quedaron entre los clústeres 1 y 2 o superior. Es muy posible, que los clústeres 1 correspondieran al hueso producido en el tejido debido a la contusión donde se inyectaron las células o incluso a tejido necrótico dentro del corte. Se observó también, que los clústeres de las secciones más próximas a la lesión, 6, 7, 8 y 9, estaban muy agrupados.

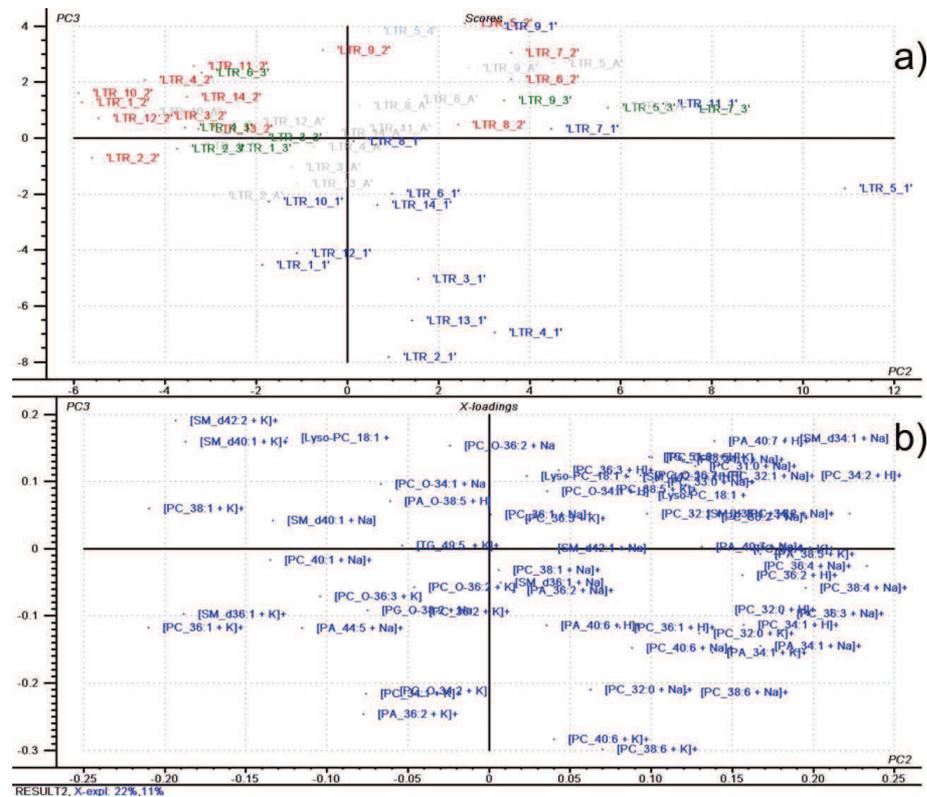


Fig 5.6.15. Proyección de los CP 2 y 3 obtenidos por PCA de todos los clústeres de LTR determinados por k-means en modo de ionización positivo. a) Muestras o scores usando la nomenclatura "Tipo\_NºSección\_Clúster". b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

Cuando en vez de emplear en la clasificación los espectros promedio sobre cada clúster se usan los espectros promedio sobre todo el tejido se observó cierta tendencia de los promedios sobre las secciones 6, 7, 8 y 9 a agruparse en los cuadrantes uno y cuatro, pero sin una separación clara. Tampoco se obtuvo una separación clara cuando se emplearon únicamente los clústeres 1. Sin embargo, con los clústeres 2, figura 5.6.16, se observó una clara agrupación de los cortes más próximos a la lesión, distanciados a lo largo de la PC1 del resto de cortes. Los clústeres 2 corresponden, como se ha explicado más arriba, a la sección de tejido

que rodea la parte central de la sección (clúster 1). Es decir, el tejido más próximo a las células inyectadas.

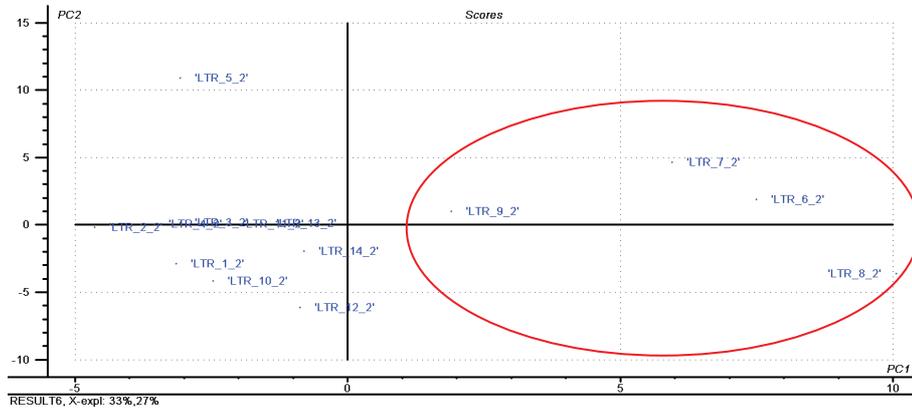


Fig 5.6.16. PCA de todos los clústeres 2 de LTR determinados por k-means en modo de ionización positivo.

**Lesión y tratamiento con ASC de rata modificadas (LTRM):**

En la figura 5.6.17 se muestran las tinciones de los cortes de médula lesionada por contusión y tratada con ASC de rata modificadas. Al igual que en las LTR, las secciones 6, 7, 8 y 9 son los más próximos a la lesión.

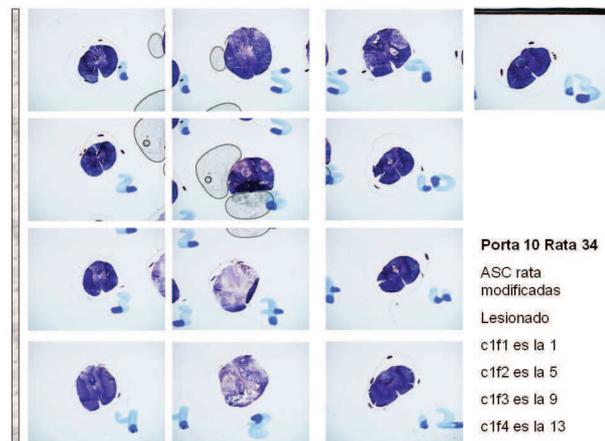


Fig 5.6.17. Tinción de los cortes de médula lesionada por contusión y tratada con ASC de rata modificadas (LTRM)

Todo intento para establecer una clasificación de las secciones empleando los promedios sobre toda la sección o sobre los distintos clústeres definidos sobre cada muestra fue en vano.

**Lesión y tratamiento con ASC humanas (LTH):**

En la figura 5.6.18 se muestran las tinciones de los cortes de médula lesionada por contusión y tratada con ASC humanas. La lesión se localiza en la sección 7 y próxima a las secciones 5, 6 y 8. La forma de la lesión es evidente a simple vista, dando idea de la magnitud del daño producido con el tratamiento.

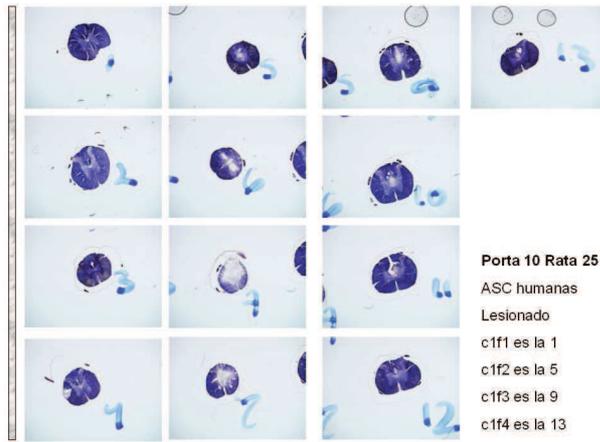


Fig 5.6.18. Tinción de los cortes de médula lesionada por contusión y tratada con ASC humanas (LTH)

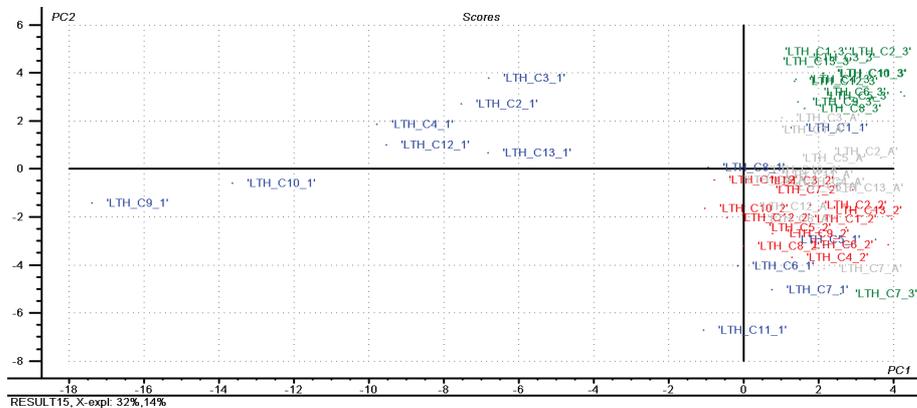


Fig 5.6.19. PCA de todos los clústeres de LTH determinados por k-means en modo de ionización positivo.

En este caso los promedios sobre los clústeres 1, donde se inyectaron las células, permitieron establecer una separación clara entre las secciones más alejados de la lesión y el resto de las secciones, tal y como se muestra en la figura 5.6.19. Se analizó además cada grupo de clústeres por separado para estudiar la influencia de la proximidad a la lesión en el lipidoma. En los clústeres 2 y 3 no se encontró correlación. Sin embargo, en el PCA sobre los clústeres 1, figura 5.6.20, se observó una separación entre los cortes más próximos y los más alejados de la



con la distancia del corte a la lesión. Probablemente, los cambios en el lipidoma queden enmascarados por los cambios en los aductos y sea necesario el análisis de las muestras con los aductos sumados en cada canal másico.

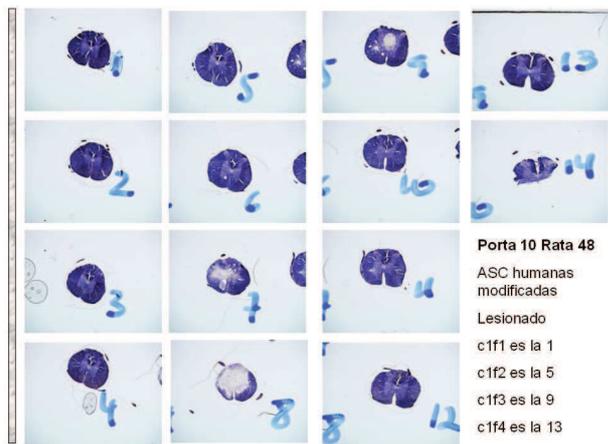


Fig 5.6.21. Tinción de los cortes de médula lesionada por contusión y tratada con ASC humanas modificadas (LTHM)

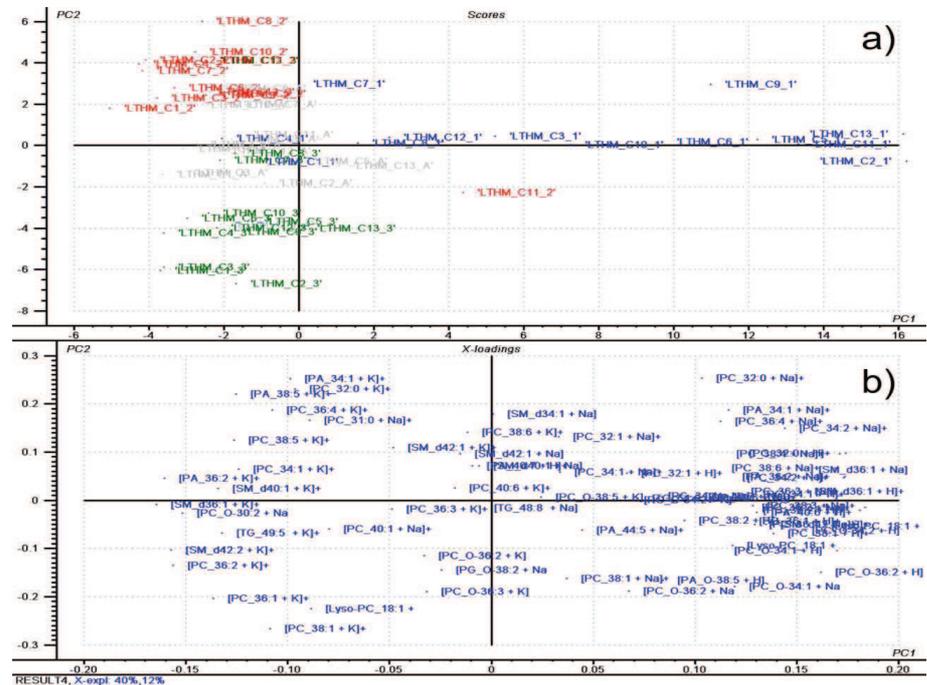


Fig 5.6.22. PCA de todos los clústeres de LTHM determinados por k-means en modo de ionización positivo. a) Muestras o scores usando la nomenclatura "Tipo\_NºSección\_Clúster". b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

**Análisis de los clústeres y los promedios**

También en este caso se realizó un análisis por separado de los promedios y de cada tipo de tejido (clúster) en las secciones, excepto que debido al extenso daño que presentaron las lesiones, se agruparon los tejidos en únicamente dos clústeres.

Al analizar los promedios, al igual que con todos los clústeres, figura 5.6.23, se observó una clara separación entre los de MS y el resto. Sin embargo, en la CP2 se observó una evolución en tratamientos con células humanas hacia menos especies potasiadas que en MLC, aumentando la contribución de especies mas sodiadas. Esto, probablemente se debió a que el lípidoma de las células humanas inyectadas era diferente al de las ratas.

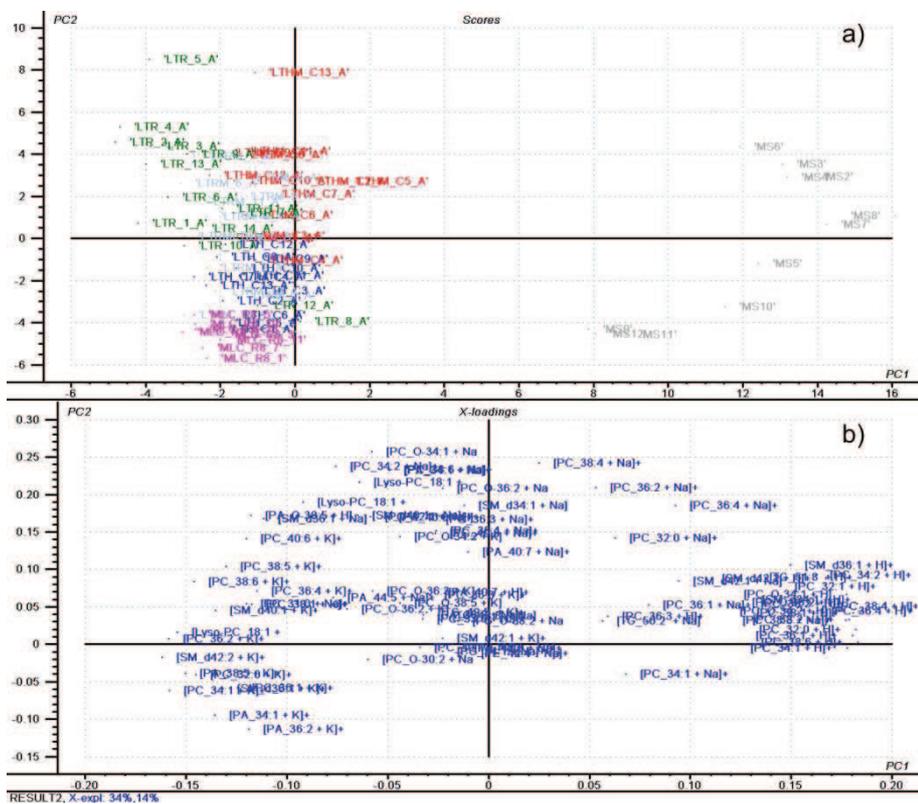


Fig 5.6.23. PCA de todos los promedios en modo de ionización positivo. a) Muestras o scores usando la nomenclatura "Tipo\_NºSección\_A". b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

Fue difícil distinguir SG de SB en médulas tan dañadas. No obstante, al analizar los clústeres de SG en MLC y MS junto con los clústeres 1 de las muestras tratadas, figura 5.6.24, se observó la misma clasificación que con los promedios, siendo, una vez más, los clústeres 1 de LTHM los que más variaban respecto al

resto de tratamientos y la lesión. Sin embargo, aunque variaban respecto a la contusión, parece que la evolución, al igual que en los promedios, en lugar de ir hacia especies protonadas, como en MS, iban hacia especies sodiadas. Ya que el clúster 1 fue donde se inyectaron las células en todos los tratamientos, también era lógico pensar que estas diferencias se debieron únicamente a la presencia de células humanas en esa región del tejido.

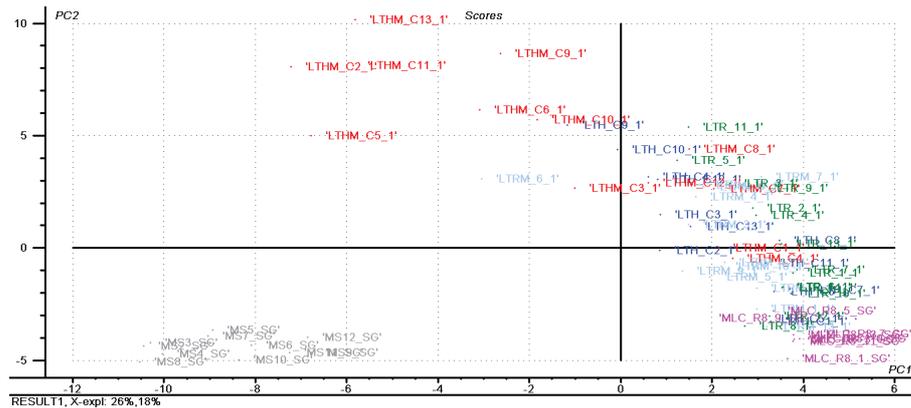


Fig 5.6.24. PCA de todos los clústeres 1 con la SG en modo de ionización positivo.

Al igual que en el estudio de las muestras con distintos tipos de lesión, se vio que el catión con el que formaban el aducto los lípidos tenía mucho peso en el análisis, dificultando la determinación de los posibles cambios en la composición lipídica debida a los tratamientos. Por lo tanto se optó por sumar los aductos para emplear la abundancia relativa de las especies lipídicas como variables en el PCA.

Cuando se hizo PCA empleando las sumas de los aductos como variables, figura 5.6.25, se observó una clasificación bastante similar a la obtenida con los aductos. La MS parecía correlacionar bien con las especies más abundantes de PC.

Al estudiar cada tipo de tratamiento por separado no fue posible clasificar los distintos tipos de tejido dentro de cada corte, a excepción de LTHM, donde si fue posible agrupar los clústeres por tipo de tejido según la numeración establecida previamente. Al resultar imposible diferenciar los tejidos, se consideró más conveniente comparar directamente los promedios en busca de diferencias.

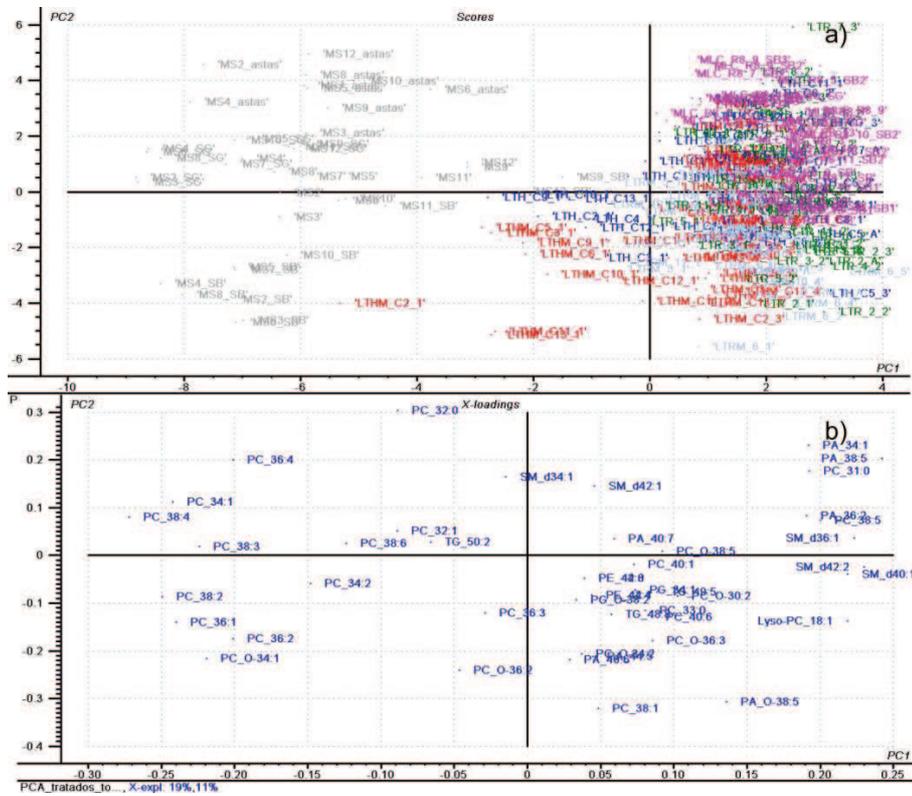


Fig 5.6.25. PCA de todos los clústeres obtenidos por *k*-means, con la suma de los aductos como variables y en modo de ionización positivo. a) Muestras o scores usando la nomenclatura “Tipo\_NºSección\_Clúster”. b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

Al hacer el PCA sobre los promedios se separaron muy bien MS del resto. Para buscar diferencias entre los tratamientos se extrajeron del análisis los promedios de MS y se repitió el PCA, figura 5.6.26. Se observó una evolución a lo largo de la PC1 de los diferentes tratamientos, donde LTR y LTH son las más próximas a la lesión, separadas entre sí por la PC2, mientras que LTHM y LTRM aparecen juntas y más alejadas.

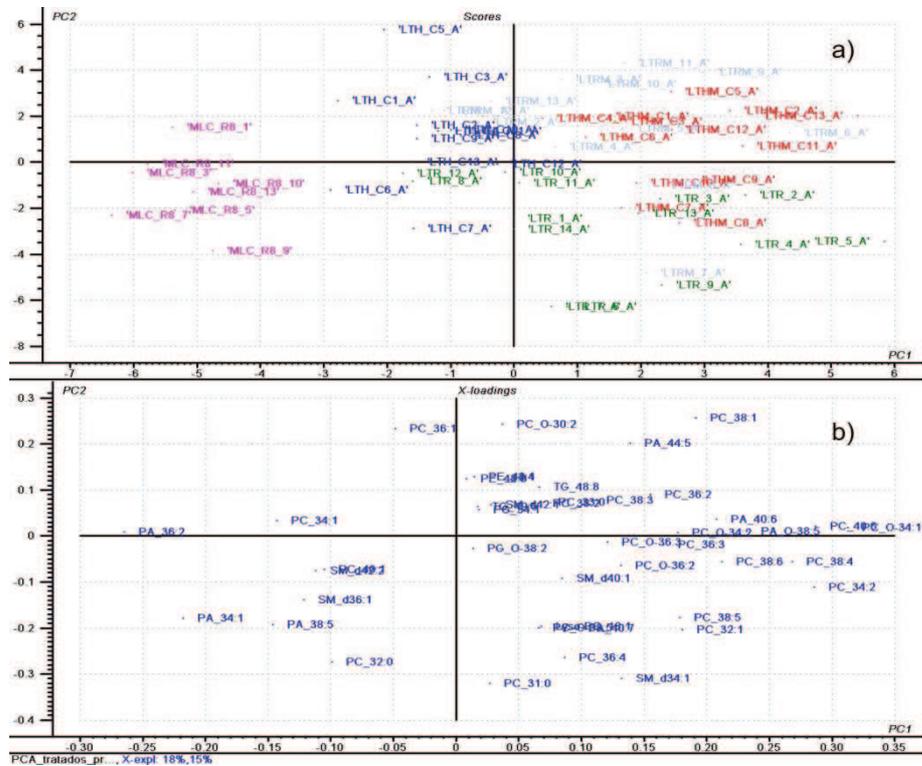


Fig 5.6.26. PCA de todos los promedios, con la suma de los aductos como variables y en modo de ionización positivo. a) Muestras o scores usando la nomenclatura "Tipo\_N°Sección\_A". b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

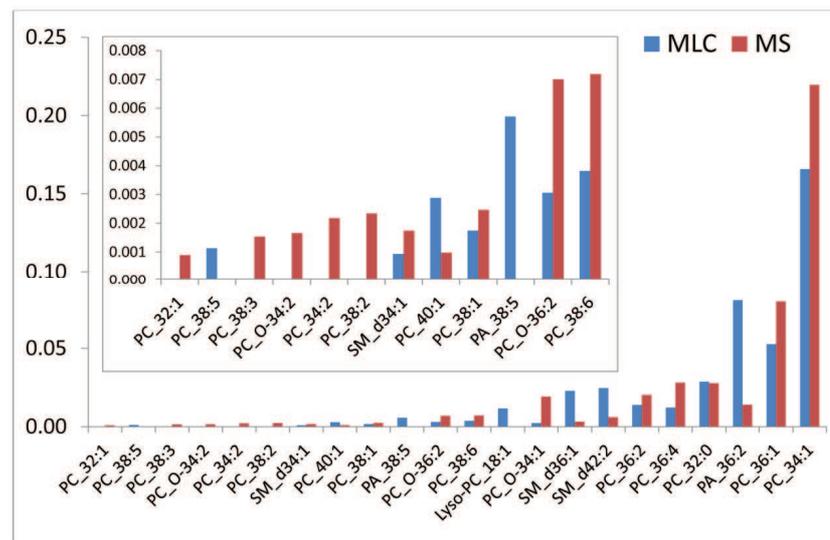


Fig 5.6.27. Comparación de las especies más reproducibles que presentan diferencias entre MS y MLC.

Para comparar los promedios de MS y MLC, las especies cuya desviación estándar no superaba la abundancia relativa se consideraron como las más reproducibles en todos los cortes. Al representarlas, figura 5.6.27, se pudo ver cuáles eran las especies que mas habían variado.

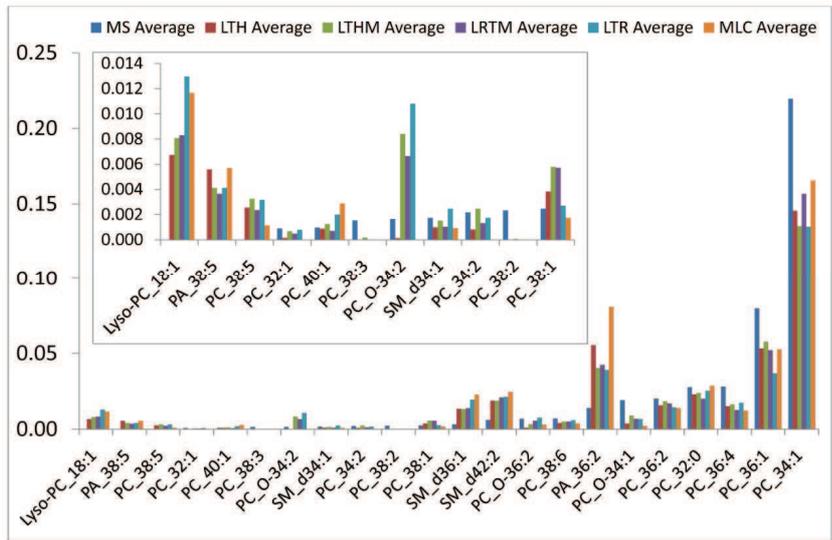


Fig 5.6.28. Comparación en todos los tratamientos de las especies más reproducibles que presentaban diferencias entre MS y MLC.

Se observaron los lípidos que marcaban las diferencias entre MS y MLC en los promedios de los diferentes tratamientos, figura 5.6.28. Se vio una disminución en la LPC 18:1 en LTH, LTHM y LTRM respecto a la médula contusionada, lo que correspondería con una evolución positiva, ya que en médula sana no se veía. Al mismo tiempo, se observó un aumento de los plasmalógenos de PC en las médulas tratadas, lo cual también concordaría con una evolución positiva, ya que se observaron en médula sana más abundantes que en médula contusionada. Se observó también un aumento en PC 38:5 y PC 32:1 y una disminución de la PC 40:1.

5.6.5. Caracterización del lipidoma en médulas lesionadas por desmielinización parcial o general en modo de ionización negativo

Se compararon las muestras de médula sana con las de los modelos de inflamación por desmielinización parcial y general en modo de ionización negativo. En MALDI-MS el modo de ionización negativo habitualmente solo permite detectar las especies lipídicas que han perdido un protón, de forma que, no existe el problema de los aductos descrito para la detección en positivo.

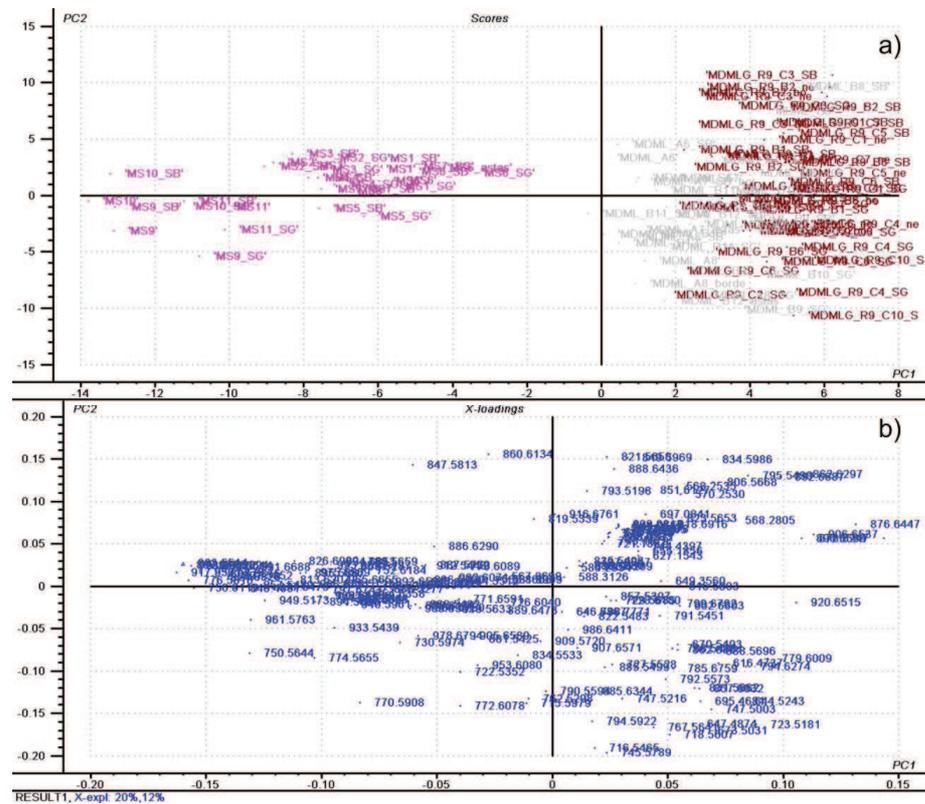


Fig 5.6.29. PCA de todos los clústeres obtenidos por k-means en modo de ionización negativo. a) Muestras o scores usando la nomenclatura "Tipo\_NºSección\_Clúster". b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

En el PCA de los datos en modo de ionización negativo, figura 5.6.29, se observó una muy buena distinción entre los clústeres de MS y los clústeres de MDMLP y MDMLG. Sin embargo, el análisis de cada tipo de muestra individualmente, demuestra que las diferencias en la composición de los tejidos no es suficiente como para diferenciarlos, seguramente debido a la pérdida de resolución causada por la recristalización de la matriz. Por tanto se decidió emplear directamente los promedios de los cortes para hacer el análisis.

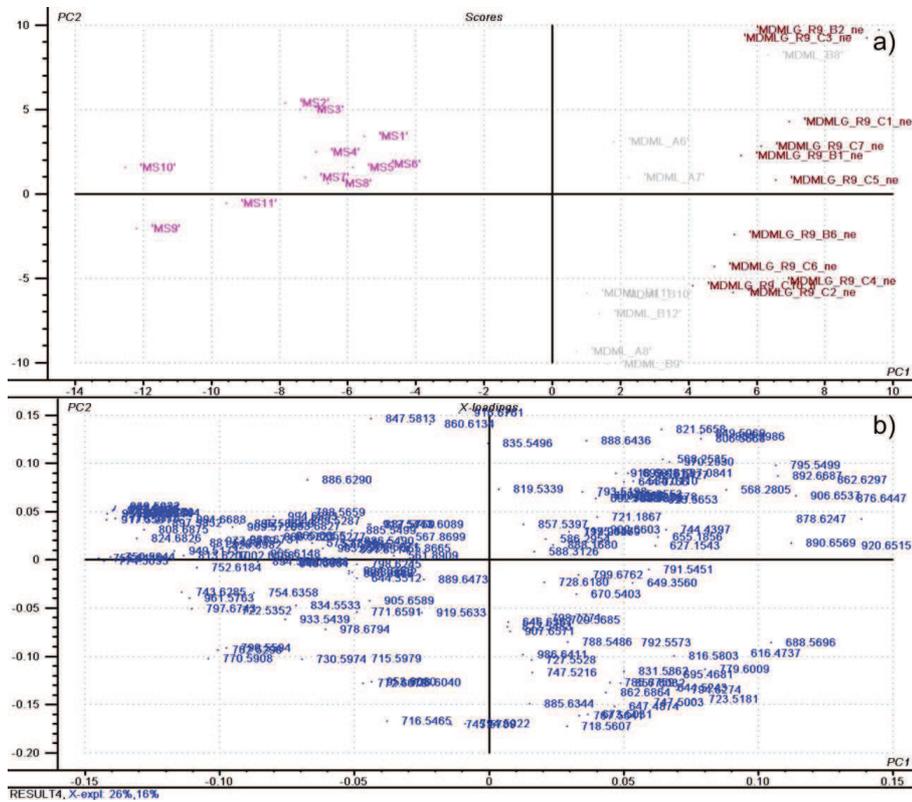


Fig 5.6.30. PCA de los promedios en modo de ionización negativa. a) Muestras o scores usando la nomenclatura "Tipo\_NºSección". b) Influencia de las Variables o loadings en el análisis.

En el PCA sobre los promedios, figura 5.6.33, se observó una clara separación a lo largo de la CP1 de MS con respecto a las médulas desmielinizadas. Además, también se consiguió, en menor medida, separar MDMLP y MDMLG, con MDMLP más próxima a la MS, lo cual tiene sentido, ya que la lesión era mayor en MDMLG. De esta forma, se concluyó, que la variación de los lípidos que definen esta separación en la zona positiva de la CP1 era característico de la lesión por inflamación.

Tabla 5.6.7. Asignación de los lípidos que más aumentan, de más a menos, en las muestras de médula lesionada por desmielinización. En la columna CP1 se muestra el valor de la proyección de cada lípido sobre la componente principal 1.

m/z exp	CP1	lipid	error (ppm)
878.6247	0.138	[PS_O-44:5 - H]-/ [PS_P-44:4 - H]-	3.29
920.6515	0.133	[Sulfatide_t43:1 - H]-	-2.06
876.6447	0.131	[PE_46:5 - H]-	4.06
876.6447	0.131	[PENMe_45:5 - H]-	4.11
862.6297	0.124	[PE_45:5 - H]-	3.37
862.6297	0.124	[PENMe_44:5 - H]-	3.43
906.6537	0.114	[PS_O-46:5 - H]-/ [PS_P-46:4 - H]-	5.72

CAPITULO 5 – RESULTADOS. 5.6-ESTUDIO DE MODELOS DE LESIÓN EN MÉDULA DE RATA

890.6569	0.112	[PI-Cer_d42:1 - H]-	-9.33
890.6569	0.112	[PE_47:5 - H]-	7.86
890.6569	0.112	[PENMe_46:5 - H]-	7.92
892.6687	0.107	[PI-Cer_d42:0 - H]-	-5.05
795.5499	0.106	No Matches	-
688.5696	0.105	No Matches	-
616.4737	0.0917	[GlcCer_d28:0 - H]-	8.34
834.5986	0.0858	[PE_43:5 - H]-	3.24
834.5986	0.0858	[PENMe_42:5 - H]-	3.30
779.6009	0.08	[PE-Cer_d43:4 - H]-	7.36
806.5668	0.0786	[PE_41:5 - H]-	3.97
806.5668	0.0786	[PENMe_40:5 - H]-	4.04
849.5969	0.0786	No Matches	-
723.5181	0.0761	No Matches	-
816.5803	0.0687	[PS_38:1 - H]-	-5.81
744.4397	0.0657	[Sulfatide_d32:4 - H]-	-5.43
644.5243	0.0645	No Matches	-
821.5658	0.0641	No Matches	-
823.5653	0.0609	[PI_O-34:0 - H]-	5.88
851.6127	0.0576	No Matches	-
747.5003	0.0557	No Matches	-
792.5573	0.0511	[PE_40:5 - H]-	-3.72
918.6916	0.0471	[PE_49:5 - H]-	3.92
918.6916	0.0471	[PENMe_48:5 - H]-	3.98
785.6759	0.0449	No Matches	-
862.6864	0.0433	[GlcCer_t45:4 - H]-	-10.73
902.6603	0.0396	[PE_48:6 - H]-	3.99
902.6603	0.0396	[PENMe_47:6 - H]-	4.05
692.7685	0.0395	No Matches	-
888.6436	0.0362	[PE_47:6 - H]-	5.24
888.6436	0.0362	[PENMe_46:6 - H]-	5.29
793.5198	0.0347	[PI_O-32:1 - H]-/[PI_P-32:0 - H]-	4.27
767.5641	0.0334	[PE-Cer_t41:4 - H]-	8.00
799.6762	0.0333	[PE-Cer_d44:1 - H]-	-8.64
670.5403	0.0324	No Matches	-
797.9047	0.0298	No Matches	-
797.9516	0.0298	No Matches	-
788.5486	0.0292	[PS_36:1 - H]-	-5.51
728.618	0.0206	No Matches	-
798.7771	0.0178	No Matches	-
747.5216	0.0159	[PG_34:1 - H]-	-5.28
727.5528	0.0156	No Matches	-
857.5397	0.0127	[PGP_36:0 - H]-	-10.26
986.6411	0.0124	No Matches	-
907.6571	0.00771	[PI_O-40:0 - H]-	7.65
646.6367	0.00713	No Matches	-
822.5483	0.00687	[Sulfatide_t36:1 - H]-	-9.96
822.5483	0.00687	[PI-Cer_t36:1 - H]-	1.57
819.5339	0.00369	[PI_O-34:2 - H]-/[PI_P-34:1 - H]-	6.03

Como se observa en la tabla 5.6.7, muchos de los picos no pudieron ser asignados y algunas de las asignaciones fueron dudosas, ya que no fue posible hacer UHPLC-MS de un extracto de lípidos de las muestras lesionadas por desmielinización para completar la asignación. Sin embargo, parece factible definir una huella digital en espectrometría de masas en modo de ionización negativo del modelo de inflamación por desmielinización.

### 5.6.6. Conclusiones

En este capítulo se ha explorado el empleo de la IMS para la caracterización de los cambios producidos en el lipidoma de médulas de rata en tres modelos de lesión: desmielización parcial, desmielinización general y contusión. En contra de lo sucedido en otros estudios presentados en esta memoria, no fue necesario desarrollar nuevos algoritmos o metodologías de análisis ni preparación de muestra, lo que permitió medir un elevado número de secciones, tanto en modo de ionización positivo, como negativo (283 secciones en total). A pesar del elevado número de secciones medidas por cada tipo de lesión, correspondieron todas ellas a un único individuo, por lo que si bien el estudio permite evaluar la capacidad del método analítico, no permite sacar conclusiones biológicamente relevantes.

Por otro lado, los resultados obtenidos sobre muestras de un mismo individuo demuestran que la técnica presenta una elevada reproducibilidad, y que por tanto, no sería necesaria la inclusión de un número elevado de individuos en un estudio biológicamente relevante. También se demuestra, que no es necesario medir un número elevado de secciones por individuo, sino que tres cortes, uno en el epicentro de la lesión y otro a cada lado, deberían bastar para tener una descripción de los cambios en el lipidoma debidos a la lesión y/o al tratamiento.

Respecto al análisis de datos, se ha puesto una vez mas de manifiesto la importancia de los aductos, tanto como elemento diagnóstico, como factor a tener en cuenta durante el análisis de las variaciones de lípidos cuando se emplea el modo de detección positivo. Al igual que en el análisis de xenógrafos, se ha demostrado en este capítulo que existe una correlación clara entre el estado fisiológico de las células y su relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Este punto, hasta ahora inexplorado en la imagen por espectrometría de masas será desarrollado en futuros estudios, ya que puede convertirse en una importante herramienta diagnóstica. Por ejemplo, tal como se demuestra en la figura 5.6.31, los aductos permiten una clara clasificación de las muestras en MS, MLC y MDML, ya que había una clarísima predisposición hacia los aductos protonados en MS, potasiados en MLC y sodiados en MDML. No obstante, como se puede observar en la misma figura, también fue posible distinguirlos mediante el lipidoma, ya que destacaba una mayor presencia de las PCs más abundantes en MS y un aumento de las PAs y SMs en todos los tipos de lesión. En el CD de material suplementario se adjuntan dos representaciones de la matriz de correlación entre los clústeres, CD-II.6.10 y CD-II.6.11, empleando como variables aductos y especies respectivamente. En estas representaciones se observa de nuevo cómo los aductos marcan una clara diferencia entre MS, MDML y MLC, mientras que la composición lipídica no varía tanto entre MS y MLC. En CD-II.6.12 y CD-II.6.13 se observó además una correlación entre la mayor parte de las especies lipídicas, excepto algunas TGs entre sí y algunas PEs, entre si también. Por otro lado, los aductos con potasio solo correlacionaban entre ellos, a diferencia de los otros dos tipos de aductos, que presentaron cierta correlación cruzada.

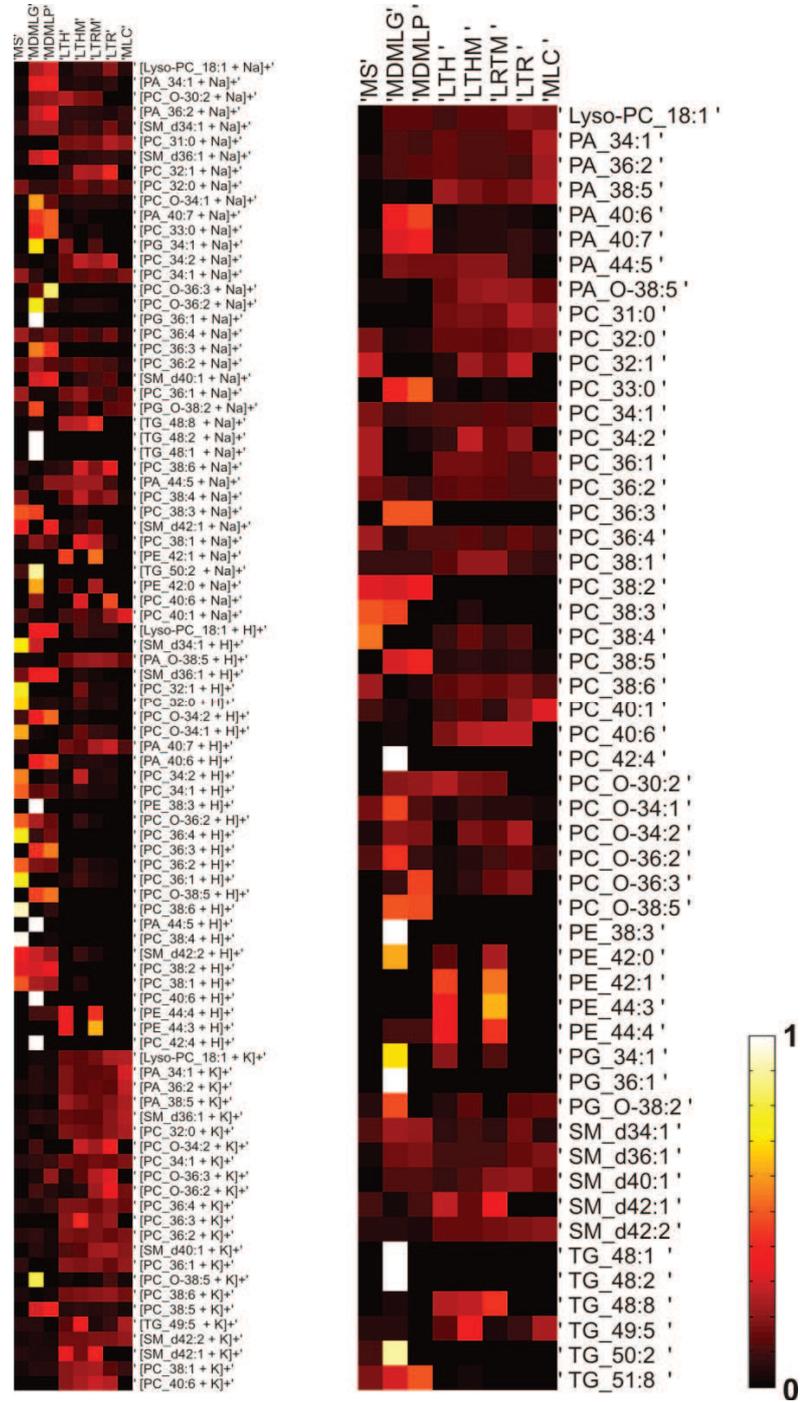


Fig 5.6.31. Heatmap de las especies, dcha, y los aductos, izda, en los promedios de los diferentes tipos de lesión y tratamiento de médulas de rata.

En modo de ionización negativo no fue posible hacer una asignación precisa de los lípidos, pero aun así fue posible identificar una huella lipídica característica de la lesión MDML, que además mostró una progresión paralela a la gravedad de la lesión. A pesar de lo preliminar de la asignación, parece que en la lesión disminuyó la PI 18:0/20:4, que es un reservoreo conocido de ácido araquidónico, y aumentaron las PEs (ver figura 5.6.32).

En el estudio de la influencia de los tratamientos en el lipidoma, el análisis empleando todos los aductos en modo de ionización positivo mostró la existencia de diferencias en la abundancia relativa de aductos en el clúster correspondiente a la zona donde se inyectaron las células en los tratamientos LTH y LTHM, principalmente debido a un aumento de las especies sodiadas. Muy probablemente, los cambios observados en este clúster son debidos a la presencia de las células humanas incluidas en el tratamiento. Al repetir el estudio con las sumas de los aductos en busca de diferencias en el perfil lipídico, se observó un aumento de los éteres de PC y de la mayor parte de las PCs en todos los tratamientos. Sin embargo, este estudio tan limitado no permite concluir si los sutiles cambios observados se deben a la presencia de células extrañas o a un cambio en el estado de la lesión (mejora o empeoramiento).

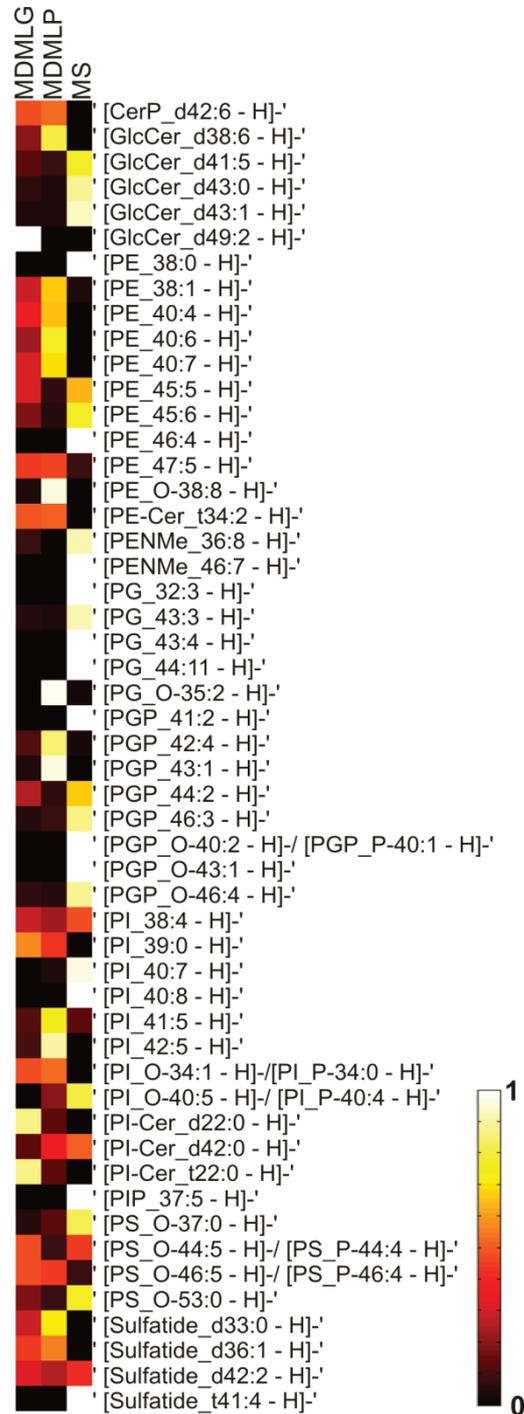


Fig 5.6.32. Heatmap de los lípidos detectados y asignados provisionalmente en modo de ionización negativo en los promedios de MDMLG, MDMLP y MS.

<sup>1</sup> Fernandez-Martos, C.M., P. Gonzalez, and F.J. Rodriguez, Acute leptin treatment enhances functional recovery after spinal cord injury. PLoS One, 2012. 7(4): p. e35594.

<sup>2</sup> Fernandez-Martos, C.M., et al., Differential expression of wnts after spinal cord contusion injury in adult rats. PLoS One, 2011. 6(11): p. e27000.

<sup>3</sup> Gonzalez, P., et al., The Ryk receptor is expressed in glial and fibronectin-expressing cells after spinal cord injury. J Neurotrauma, 2013. 30(10): p. 806-17

<sup>4</sup> Gonzalez, P., et al., Spatio-temporal expression pattern of frizzled receptors after contusive spinal cord injury in adult rats. PLoS One, 2012. 7(12): p. e50793

<sup>5</sup> Xiong, X. C.; Xu, W.; Eberlin, L. S.; Wiseman, J. M.; Fang, X.; Jiang, Y.; Huang, Z. J.; Zhang, Y. K.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. "Data Processing for 3D Mass Spectrometry Imaging". J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012, 23 (6), 1147-1156

<sup>6</sup> Arthur, D.; Vassilvitskii, S. "k-means++: the advantages of careful seeding. Society for Industrial and Applied Mathematics" New Orleans, Louisiana, 2007; pp 1027-1035.

<sup>7</sup> Nachum Dafny. "Chapter 3: Anatomy of the Spinal Cord". Neuroscience Online. <http://neuroscience.uth.tmc.edu/s2/chapter03.html>

**CAPÍTULO 6**  
**CONCLUSIONES**



### 6. CONCLUSIONES

Los estudios presentados en esta memoria claramente demuestran la necesidad que existe en el campo de la imagen por espectrometría de masas de nuevas herramientas analíticas que permitan un análisis rápido y fiable de los datos. En el momento de comenzar la tesis, los programas informáticos para tratamiento de datos de MALDI-IMS eran muy limitados, permitiendo casi exclusivamente la visualización de los datos en forma de imágenes y en el mejor de los casos, un burdo análisis estadístico. Fue necesario el desarrollo de las herramientas que se han ido presentando en los sucesivos capítulos y que permiten:

1. Captar los datos, alinearlos, recalibrarlos y normalizarlos.
2. Obtener rápidamente un informe con todas las imágenes de todos los picos.
3. Seleccionar áreas en las imágenes y obtener el espectro promedio de esas zonas.
4. Clasificar áreas en función de la similitud de sus espectros (clusterización).

Durante la realización de este trabajo, tanto las herramientas de análisis como la tecnología de MALDI-IMS han ido evolucionando vertiginosamente. En la actualidad existen equipos capaces de recoger miles de espectros en poco más de una hora, por lo que el desarrollo tecnológico debe ir necesariamente acompañado de avances en los algoritmos que permitan analizar toda esa ingente cantidad de datos en un tiempo razonable, de manera automática o al menos, con una mínima intervención del usuario. El siguiente paso en nivel de complejidad supone el desarrollo de software que permita el análisis secuencial de una serie de experimentos y de encontrar variaciones o tendencias entre grupos tratado/control por ejemplo. En este sentido, en los capítulos 5.4, 5.5 y 5.6 se ha demostrado que los estudios sistemáticos de este tipo presentan dificultades añadidas: primero, es necesario identificar las diferentes áreas de cada tipo de muestra, para luego encontrar los cambios en el perfil lipídico de cada región de interés por separado. De hecho, este punto reafirma la utilidad de la técnica de MALDI-IMS, ya que permite identificar áreas dentro de los tejidos (tejido necrosado, conjuntivo, diversas áreas anatómicas... etc), lo que conduce a una identificación más precisa de los cambios debidos a procesos patológicos o a tratamientos.

El tratamiento estadístico de múltiples muestras fue posible gracias al desarrollo de nuevas herramientas de análisis, integradas en una aplicación informática capaz de alinear, normalizar, recalibrar, eliminar los picos de matriz y eliminar los picos de la distribución isotópica de conjuntos de espectros y generar un único conjunto de datos. A su vez estos conjuntos de datos pueden analizarse mediante una herramienta desarrollada capaz de hacer PCA o una combinación de PCA y el algoritmo RankCompete, bien para extraer información, como qué

## CAP 6 - CONCLUSIONES

---

especies definen unos tipos de muestra, bien para clasificar las muestras en función de su similitud.

Un punto importante, y que quizá sea la mayor aportación de este trabajo, es la demostración de que se deben tener en cuenta los cambios en los aductos entre tejidos y entre muestras. Los resultados presentados en este trabajo parecen indicar que cada tipo de tejido presenta una relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  característica y cambiante según el estado fisiológico. Como se demostró en el capítulo 5.4, el tejido necrosado presenta una cantidad de sodio notablemente superior que el tejido tumoral viable, y también se observaron cambios en las concentraciones de sodio y potasio en los diversos modelos de daño medular, comparados con la médula sana. Incluso los tratamientos aplicados en el capítulo 5.6 parecen indicar que también modifican el sutil equilibrio entre aductos. Así, los valores de las concentraciones relativas de aductos, un valor hasta ahora despreciado en los estudios por IMS, pueden llegar a constituir en sí mismos un excelente indicador del estado metabólico de un tejido y de si algún factor ha sacado las células de su homeostasis.

La segunda derivada de este estudio, es que los cambios en los aductos son a veces tan importantes que pueden llegar a ocultar cualquier otro cambio en el perfil lipídico de las muestras, como se demostró en el capítulo 5.4. De hecho, existen en la literatura numerosos estudios en los que los resultados parecen estar afectados de este error. Una vez conocido el problema, se puede abordar de diversas formas. Una de ellas, es el empleo de una sal (de sodio, potasio o litio), que permita desplazar el equilibrio hacia un único aducto. De este modo, se pierde la información aportada por la relación de la concentración de aductos, pero se evita el problema de su variación y se reduce considerablemente la complejidad de los espectros, facilitando enormemente la asignación de las especies lipídicas. Sin embargo, en este trabajo se ha empleado una aproximación distinta, consistente en la identificación de todas las especies posibles detectadas en modo de ionización positivo y su suma en un único canal másico. De este modo, el análisis no se lleva a cabo sobre canales másicos sino sobre especies. Esta segunda aproximación es mucho más compleja, y ha requerido de la construcción de software apropiado para la identificación de lípidos, incluyendo una base de datos con más de 30.000 especies, pero tiene la ventaja de respetar la concentración original de aductos, que como ya se ha comentado, contiene una valiosa información.

Se debe resaltar que la determinación de la relación sodio/potasio no es tampoco una tarea menor. Es necesario identificar especies cuyos aductos no solapen con ninguna otra especie, para suponiendo que la relación de aductos en todas las especies se mantiene constante, extrapolar aquellas para las que si existe solapamiento. Para llevar a cabo este análisis se programó una subrutina capaz de deconvolucionar cada pico y extraer cuál es la aportación de cada una de las especies que lo comparten. Este programa funciona solamente como

## **CAP 6 - CONCLUSIONES**

---

aproximación, asumiendo que la relación de aductos en todas las especies de una clase de lípidos en un mismo tipo de tejido es aproximadamente similar.

En resumen, los estudios presentados en este trabajo demuestran la utilidad de la técnica de imagen por espectrometría de masas, a pesar de encontrarse en una etapa incipiente y de que es necesario el desarrollo de nuevas metodologías de análisis y mejor equipamiento para que se pueda explotar todo su potencial.



## **GLOSARIO**



---

(m/z)	Relación masa/carga
2OHOA	Ácido 2-hidroxioléico
9-AA	9-aminoacridina
AGC	Control automático de ganancia ( <i>Automatic Gain Control</i> )
AMS	Espectrometría de masas de acelerador ( <i>Accelerator Mass Spectrometry</i> )
ANOVA	Análisis de la varianza ( <i>ANalysis Of VAriance</i> )
APCl	Ionización química a presión atmosférica ( <i>Atmospheric-Pressure Chemical Ionization</i> )
Calutron	<i>California University cyclotron</i>
Cer	Ceramida
CerP	Ceramida fosfato
CHCA	Ácido $\alpha$ -cyano-4-hydroxicinámico
CI	Ionización química ( <i>Chemical ionization</i> )
CID	Disociación inducida por colisiones ( <i>Collision-Induced Dissociation</i> )
CL	glicerofosfoglicerofosfoglicerol o cardiolipina
CP	Componente principal ( <i>Principal Component</i> )
CT	Tejido conectivo ( <i>Connective Tissue</i> )
Cx	Corteza cerebral ( <i>CorteX</i> )
Da	Dalton
DAG	Diacilglicerol
DAN	1,5-diaminonaftaleno
DESI	Desorción e ionización por electrospray ( <i>Desorption ElectroSpray Ionization</i> )
DHA	2,6-dihidroxiacetofenona
DHB	Ácido dihidroxibenzoico
DIOS	Desorción/ionización en silicio ( <i>Desorption/Ionization On Silicon</i> )
EI	Ionización electrónica ( <i>Electron Ionization</i> )
ESI	Ionización por electrospray ( <i>Electrospray Ionization</i> )
FA	Acilos grasos ( <i>Fatty Acyls</i> )
FAB	Bombardeo de átomos rápidos ( <i>Fast Atom Bombardment</i> )
FT	Transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform</i> )
FT-ICR	Resonancia de ion ciclotrón por transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i> )
FTMS	Espectrometría de masas por transformada de Fourier ( <i>Fourier Transform Mass Spectrometry</i> )
FWHM	Anchura a media altura ( <i>Full Width at Half Maximum</i> )

## GLOSARIO

---

GL	Glicerolípidos
GOI	Grupo de interés ( <i>Group Of Interest</i> )
GP	Glicerofosfolípidos
HCD	Disociación por alta energía de colisión o disociación de alta energía en C-trap ( <i>Higher-energy Collisional Dissociation or Higher-energy C-trap Dissociation</i> )
HNP	Hospital nacional de parapléjicos
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión ( <i>High-Pressure Liquid Chromatography</i> )
HPLC-ESI-MS	Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray ( <i>Tandem High-Pressure Liquid Chromatography- Electrospray Ionization</i> )
ICP	Plasma acoplado inductivamente ( <i>Inductively Coupled Plasma</i> )
IMS	Imagen por espectrometría de masas ( <i>Imaging Mass Spectrometry</i> )
IRMS	Espectrometría de masas de relación isotópica de alta precisión ( <i>Isotope-Ratio Mass Spectrometer</i> )
IT	Trampa iónica ( <i>Ionic Trap</i> )
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas ( <i>Tandem Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> )
LDI	Ionización por desorción láser ( <i>Laser Desorption/Ionization</i> )
LMCO	Límite de masa más baja ( <i>low mass cut-off</i> )
LPC	Lyso-Fosfatidilcolina
LTH	Lesión y tratamiento con ASC humanas
LTHM	Lesión y tratamiento con ASC humanas modificadas
LTR	Lesión y tratamiento con ASC de rata
LTRM	Lesión y tratamiento con ASC de rata modificadas
MAG	Monoacilglicerol
MALDI	Ionización por desorción láser asistida por una matriz ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> )
MBT	2-mercaptobenzotiazol
MDMLG	médula con desmielinización general
MDMLP	médula con desmielinización parcial
MIP2C	Manosil diinositol
MIPC	Manosil inositol
MLC	Médula lesionada por contusión
MS	Médula sana
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem ( <i>Tandem Mass Spectrometry</i> )

---

NALDI	Desorción/ionización en superficies nanoestructuradas ( <i>Nanostructure-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> )
PA	Ácidos fosfatídico
PC	Glicerofosfolina o fosfatidilcolina
PCA	Análisis por componentes principales ( <i>Principal Component Analysis</i> )
PDMS	Espectrometría de masas por desorción por plasma ( <i>Plasma Desorption Mass Spectrometry</i> )
PE	Glicerofosfoetanolamina o fosfatidiletanolamina
PE-Cer	Fosfoetanolamina
PEG	Polietilenglicol
PG	Glicerofosfoglicerol o fosfatidilglicerol
PGP	Glicerofosfoglicerol fosfato o fosfatidilglicerol fosfato
PI	Glicerofosfoinositol o fosfatidilinositol
PI-Cer	Fosfoinositol
PK	Poliquétidos
PQD	Disociación por pulsosQ ( <i>Pulsed-Q Dissociation</i> )
PR	Lípidos prenoles
PS	Glicerofosfoerina o fosfatidilserina
qTOF	Tandem cuadrupolo/tubo de vuelo ( <i>Tandem Quadrupole-Time Of Flight</i> )
ROI	Región de interés ( <i>Region Of Interest</i> )
RW	Paseo aleatorio ( <i>Random Walk</i> )
S/R	Señal/ruido
SB	Sustancia Blanca
SG	Sustancia Gris
SIMS	Espectrometría de masas de haz de iones secundarios ( <i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i> )
SL	Sacarolípidos
SM	Esfingomielina
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SP	Esfingolípidos
ST	Lípidos esteroideos
TAG	Triacilglicerol
TFA	Ácido trifluoroacético
TIC	Corriente iónica total ( <i>Total Ion Current</i> )
TLC	Cromatografía líquida en capa fina ( <i>Thin Layer</i> )

## GLOSARIO

---

	<i>Chromatography</i>
TOF	Tiempo de vuelo ( <i>Time Of Flight</i> )
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra-alta presión (UltraHigh-Pressure Liquid Chromatography)

## **APÉNDICES**



**A-I Cronología de la espectrometría de masas.**

- 1886 E. Goldstein observa por primera vez los rayos de canal
- 1897 J.J. Thomson descubre el electrón
- 1898 W. Wien deflece los rayos de canal mediante campos eléctricos y magnéticos
- 1901 W. Kaufman crea el predecesor del primer espectrómetro de masas de parábola
- 1906 J.J. Thomson recibe el premio Nobel en Física por sus estudios sobre la conducción de electricidad en gases
- 1907 J.J. Thompson construye su primer espectrómetro de masas
- 1909 R. Millikan y H. Fletcher determinan la carga de un electrón.
- 1910 J.J. Thomson detecta emisión secundaria
- 1911 W. Wien recibe el premio Nobel en Física por sus estudios sobre las leyes de la radiación térmica
- 1913 J.J. Thomson observa la línea 22 en el espectro del neón y publica "Rays of positive electricity"
- 1918 A.J. Dempster diseña su Espectrómetro de masas de campo magnético enfocado 180°, que emplea fuentes de ionización térmica y electrónica
- 1921 F. Soddy recibe el premio Nobel en Química por el descubrimiento de los isótopos de elementos radiactivos
- 1922 F. Aston recibe el premio Nobel en Química por el descubrimiento de los isótopos de elementos inactivos
- 1923 G. de Havensy reconoce el valor de los isótopos como trazadores biológicos
- 1927 L. Loeb descubre el mecanismo por el que los iones positivos pueden ionizar átomos.
- 1928 Se hace el primer estudio de ionización y espectrometría de masas del agua
- 1931 E.O. Lawrence inventa el Ciclotrón
- 1932 H. Urey descubre el Deuterio
- 1936 Aparece la espectrometría de masas de ion secundario (SIMS)  
A.J. Dempster describe la ionización por chispa
- 1937 Investigadores de la universidad de Columbia emplean la espectrometría de masas para investigar isótopos de hidrógeno en compuestos orgánicos
- 1938 Bleakney y J. Hipple describen el analizador de masas cicloidial  
Se funda la Consolidated Engineering Corporation (CEC)
- 1939 Se demuestran por primera vez las variaciones en las relaciones isotópicas en la naturaleza  
Se emplean por primera vez isótopos de nitrógeno en el estudio del metabolismo de las proteínas.  
E.O. Lawrence recibe el premio Nobel en Física por inventar el Ciclotrón
- 1940 A.O. Nier y J. Dunning determinan que el  $^{235}\text{U}$  es el isótopo fisiónable del uranio.  
A.O. Nier desarrolla su espectrometro de masas de enfoque único usando un sector magnético de 60°

## APÉNDICES

---

- Westinghouse Electric empieza a desarrollar un espectrómetro de masas portable comercial
- 1942 E.O. Lawrence lidera el desarrollo del el "Calutron" para la separación de isótopos de uranio
- 1943 CEC instala su primer espectrómetro de masas comercial (Modelo 21-101) en la Atlantic Refining Company en Filadelfia.
- 1944 La Oficina Nacional de Standards de Estados Unidos publica 15 hidrocarburos empleables como standards de calibrado para la espectrometría de masas
- 1945 CEC presenta la computadora analógica Modelo 30-103 para el análisis de mezclas de hidrocarburos
- 1946 Se publica en Physical Review la primera descripción del espectrómetro de tubo de vuelo (TOF)  
Metropolitan Vickers fabrica el primer espectrómetro de masas MS-1
- 1947 General Electric empieza a fabricar espectrómetros de masas comerciales  
La Oficina Nacional de Standards de Estados Unidos y el Instituto Americano del Petroleo inician la distribución del espectro de masas de referencia y crean la librería de espectros de masas
- 1948 Se desarrolla la espectrometría de masas de resonancia de ión ciclotrón  
H. Wood Investiga la síntesis de glicogeno en hígado de ratas empleando componentes marcados isotópicamente
- 1949 Investigadores de la Oficina Nacional de Standards de Estados Unidos describen la resonancia de Ión Ciclotrón como un método preciso para determinar la constante de Faraday
- 1950 Se pone en marcha en la universidad de Chicago el primer espectrómetro de masas para relaciones isotópicas de gases de alta precisión  
CEC introduce el Espectrómetro Modelo 21-103  
Se miden las abundancias de  $^{13}\text{C}$  y  $^{18}\text{O}$  de aproximadamente 0.01%
- 1952 A.O. Nier y G. Johnson diseña el espectrómetro demasas de doble enfoque, que enfoca iones en un único punto  
A.J. Martin y R.L. Synge reciben el premio Nobel de química por la invención de la cromatografía de partición
- 1953 Se observa el fenómeno de ionización de campo en la Universidad de Chicago  
W. Paul publica los primeros artículos sobre la espectrometría de masas de cuadrupolo y los detectores de trampa iónica
- 1954 Se desarrolla la espectrometría de masas de alta resolución para el estudio de compuestos orgánicos en las Imperial Chemical Industries de Reino Unido
- 1956 Se emplea la espectrometría de masas para determinar la afinidad protónica  
Se analizan por primera vez Esteroides mediante espectrometría de masas
- 1957 Phillip-Morris Company demuestra por primera vez el tandem cromatografía de gases - espectrometría de masas GC-MS
- 1958 CEC presenta Mascot, el primer digitalizador de espectros de masas comercial  
Bendix presenta el espectrómetro de masas de tubo de vuelo y se demuestra la monitorización de múltiples iones.

- Primeras medidas de la atmosfera por espectrometría de masas mediante un filtro de masas de cuadrupolo
- 1959 El MIT emplea la espectrometría de masas para secuenciación de pépticos y oligonucleótidos  
Dow Chemical conecta la cromatografía de gases a un espectrómetro de masas de tubo de vuelo
- 1960 Bendix presenta la primera sonda de inserción directa para sólidos.  
CEC presenta su modelo 21-110
- 1961 Atlas-MAT presenta el primer analizador de gases residuales basado en un diseño de cuadrupolo  
Se emplean métodos de datación por potasio-argón para determinar que las rocas de Minnesota son de la era Precambria
- 1962 Se describe el microscopio iónico de espectrometría de masas de ión secundario en Francia  
El MIT emplea por primera vez la espectrometría de masas para estudiar la estructura de nucleósidos.
- 1964 Se presenta por primera vez el concepto de búsqueda computacional en espectros de masas
- 1966 Investigadores de la Universidad de Stanford describen un instrumento ión-ciclotrón de doble resonancia  
Se desarrolla la espectrometría de masas de ionización química  
Investigadores del MIT utilizan métodos computacionales para secuenciar oligopéptidos a partir de sus espectros
- 1968 Se presenta la ionización por electrospray (ESI), para el estudio de macromoléculas en la universidad de North-Western  
Investigadores australianos emplean librerías computerizadas para identificar espectros de compuestos desconocidos
- 1969 Se presenta el primer GC-MS con un sistema computerizado de datos  
Nace la sociedad americana de espectrometría de masas (ASMS)
- 1970 Comienza el desarrollo de algoritmos para comparación automatizada de librerías de espectros de masas para la identificación de componentes desconocidos
- 1971 IBM desarrolla la espectrometría de masas de descarga brillante  
Se desarrolla el espectrómetro de masas de reflectrón en Leningrado  
Se empieza a emplear la GC-MS en el diagnóstico de enfermedades metabólicas  
Se desarrolla la espectrometría de masas de ion secundario estático en la universidad de Colonia
- 1972 Se desarrolla la espectrometría de analizador de masas por energía cinética de los iones
- 1974 Se presenta la espectrometría de masas de resonancia de ión-ciclotrón por transformada de Fourier FT-ICR  
Se desarrolla la ionización química a presión atmosférica para el tandem cromatografía de líquidos con espectrometría de masas LC-MS
- 1975 Un espectrómetro de masas viaja a bordo de la nave espacial Viking de la NASA en su misión a Marte
- 1976 Se desarrolla la espectrometría de masas por desorción por plasma PDMS y su aplicación en el estudio de biomoléculas en la Universidad de Texas A&M

## APÉNDICES

---

- 1977 Se presenta el espectrómetro de masas de cuadrupolo en tandem  
Se presenta la espectrometría de masas de acelerador
- 1979 Investigadores en Canadá desarrollan la teoría de la evaporación iónica inducida por un campo
- 1980 Se desarrolla en la Universidad de Iowa la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, ICP-MS  
Se presenta el primer espectrómetro de masas de triple cuadrupolo comercial
- 1981 Investigadores en Reino Unido presentan el bombardeo de átomos rápidos, FAB
- 1982 Se obtiene el espectro completo de la insulina mediante FAB y métodos de ionización por desorción de partículas.
- 1983 Se presenta el primer ICP-MS para análisis elemental
- 1984 Se presenta el primer analizador de trampa iónica  
Investigadores de la universidad de Yale emplean ESI-MS para analizar biomoléculas pequeñas
- 1985 Se emplean componentes "absorbentes" para asistir la ionización láser de componentes "no absorbentes".
- 1986 Se conecta la cromatografía líquida a la espectrometría de masas mediante ESI
- 1987 Se presenta la espectrometría de masas de electroforesis capilar, que emplea ESI  
Se presenta la ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI)
- 1988 Se se demuestra la ionización por electrospray de proteínas en el rango entre 5.000 y 40.000 daltons
- 1989 Se presenta el primer espectrometro de masas ESI comercial  
W. Paul comparte el premio nobel en física por su trabajo en el desarrollo de la trampa iónica
- 1991 Se secuencian Oligonucleótidos mediante ESI-MS
- 1992 R. Marcus recibe el premio Nobel en Química por su teoría de reacciones de transferencia electrónica en sistemas químicos
- 1993 La espectrometría de masas se emplea en el campo emergente de la Proteómica
- 1994 Se presentan el microelectrospray y el nanoelectrospray
- 1999 Alexander Makarov presenta el analizador Orbitrap

**A-II Picos del DAN en modo de ionización negativo.**

558.10765	597.86037	618.16503	634.18272	655.23989	692.93184	772.19874	799.26427
562.89679	600.19874	619.17118	635.17993	656.24274	699.49278	772.22306	799.34962
565.35804	601.20034	619.23523	636.19149	656.87855	701.5109	773.22163	848.92282
567.37024	602.21002	620.17407	637.19342	657.25408	742.53866	774.23027	863.56209
568.37782	603.21669	620.23815	637.24814	657.88507	744.55402	775.24089	883.59487
569.38813	604.2259	621.18506	638.16716	658.25515	745.28399	776.24531	891.60035
573.90281	605.22627	621.2495	638.20989	664.15413	746.26928	777.25168	914.29201
578.86598	606.24053	622.18687	638.2647	666.17057	746.29237	777.32541	916.31193
581.19444	607.20627	622.24553	639.21039	667.16594	747.2951	778.25995	918.32808
583.20667	607.24024	623.19695	639.26533	667.21807	748.29984	778.31743	929.301
585.22409	608.21988	623.26168	640.18876	668.22233	749.31435	779.27031	930.3083
586.2098	608.25386	624.20368	640.22549	669.22884	750.31543	779.33608	931.31726
587.2035	609.22467	624.26258	641.2246	670.23759	751.32625	780.25792	932.29547
588.22128	609.25873	625.20693	641.27989	671.24876	752.33141	780.32376	932.32777
589.21463	610.23177	625.24239	642.20772	672.24238	753.34628	781.28858	933.32921
590.22136	610.26597	625.27185	642.25683	672.8559	760.29459	781.34636	934.09487
591.22527	611.11585	626.23032	642.48459	673.26458	761.30188	782.33784	934.3431
591.37201	611.27003	626.27771	643.08818	681.15736	762.30315	783.36435	935.34774
592.23714	612.25363	627.25628	643.24848	682.17307	763.3144	788.23473	946.33094
593.24619	612.28234	627.29188	647.11334	682.94144	764.31976	789.23933	948.34764
593.38824	613.13061	628.28465	648.16614	683.1776	765.32698	790.24586	1014.90513
594.25234	613.28557	629.27394	649.12767	684.18426	766.33624	791.25442	1021.65967
594.39473	614.13606	629.29768	649.17142	685.23391	766.53676	792.26481	1041.67187
595.26102	614.26833	630.15186	650.17907	686.23836	767.33947	792.85507	1047.66978
595.40377	614.29139	630.3013	651.18279	687.24503	768.35272	793.2519	1049.68488
595.85973	615.14393	631.1574	651.20797	687.54474	769.19863	794.2746	1180.89563
596.26678	615.29967	631.29528	652.21398	688.25389	769.34378	795.2654	
597.27504	616.1485	632.16548	653.23507	689.24446	770.36911	796.29197	
597.30297	617.15556	633.16389	654.22686	689.26503	771.21022	797.27809	

**A-III Picos del MBT en modo de ionización positivo.**

168.99765	554.88335	669.8107	962.92038	1098.7238	1239.6575	1509.9479	1713.7767
169.98994	554.99203	671.25748	963.25921	1098.8133	1241.6804	1510.8573	1714.0046
170.99353	555.90225	671.39551	963.63213	1099.2745	1242.6813	1515.7514	1715.0106
182.01045	556.89415	672.910696	964.63331	1099.7292	1243.6917	1519.7062	1716.0175

## APÉNDICES

---

189.9766	557.00839	674.90991	965.64739	1100.2738	1243.7829	1521.1625	1716.9043
199.96693	557.88623	675.13855	965.73244	1102.5875	1244.6951	1521.7455	1717.2539
212.11964	558.01323	676.92531	966.64603	1103.5912	1245.6996	1522.7443	1718.4781
213.1231	558.88845	677.15165	1003.6263	1104.5408	1261.8632	1525.9491	1721.6726
216.10332	559.0058	680.48999	1004.6303	1107.5781	1267.7786	1527.6963	1725.0519
227.0653	559.86834	681.49395	1005.6418	1107.6686	1269.7083	1527.8091	1726.0541
231.12721	560.87089	682.45563	1005.7262	1109.6006	1269.8023	1533.8636	1727.0572
232.13498	561.393444	682.88435	1006.6428	1109.7752	1269.8878	1534.5108	1727.9798
233.13794	561.89878	684.89157	1007.742	1111.2646	1270.7176	1537.901	1728.0748
242.01077	562.3974	686.90766	1008.7461	1111.6146	1270.8032	1538.9043	1728.9845
254.11729	562.8866	689.16164	1009.582	1111.7056	1271.8996	1539.9085	1729.0796
257.02213	563.39917	692.86833	1009.6729	1111.7897	1273.916	1541.2452	1729.9901
259.0379	563.90739	693.2077	1009.7578	1112.3012	1274.6638	1549.2101	1730.0853
260.04123	564.91066	693.22591	1010.2369	1112.6167	1274.9218	1549.9478	1731.0919
269.02158	565.28631	693.37861	1010.5889	1112.7078	1278.6888	1550.559	1739.9441
270.02985	565.90135	694.8817	1010.6739	1114.5334	1285.7068	1550.9513	1740.9456
271.01767	566.8819	695.88647	1010.7649	1115.7366	1287.7213	1551.875	1741.9617
275.99917	566.99413	696.65364	1013.6125	1118.5586	1287.8086	1551.9674	1742.5937
290.00213	567.87778	696.87952	1014.5338	1123.651	1288.726	1552.8804	1742.9649
291.00971	569.00963	697.3664	1015.3525	1124.6552	1292.2384	1552.9729	1744.258
300.99385	569.3175	697.65878	1019.436	1125.6607	1296.691	1553.8868	1747.0831
301.99782	569.85173	697.88166	1019.6205	1129.7822	1297.6973	1553.9794	1747.5247
303.0098	570.31209	699.46932	1019.7067	1130.2415	1302.6845	1554.8826	1752.4211
332.97555	571.02558	701.39923	1021.5426	1130.5287	1305.8885	1560.2019	1758.0344
333.96825	571.867	701.48698	1021.7215	1131.2473	1311.8112	1565.7593	1759.0376
334.98072	572.02724	702.40059	1022.7281	1132.2472	1313.7345	1565.8529	1765.6075
335.96521	573.02117	704.882129	1023.6495	1133.2485	1313.8244	1566.7665	1765.9579
336.95756	573.8748	706.899079	1023.7361	1134.28	1313.9144	1569.8528	1768.8781
346.98222	574.03588	715.28316	1024.25	1134.5543	1314.7427	1569.9821	1770.0876
354.9485	575.01941	716.86532	1024.5597	1135.7032	1314.8238	1570.0526	1771.087
355.95132	575.22268	717.370099	1024.6527	1135.79	1317.7653	1571.264	1772.0169
356.94439	577.23771	717.86729	1025.2541	1136.7091	1317.9461	1581.0179	1772.1014
364.93924	577.40807	718.86044	1027.6774	1137.6293	1329.7317	1581.921	1773.018
365.9424	578.036683	721.98054	1035.5971	1137.7163	1329.8233	1582.6226	1773.1026
366.9351	578.24263	724.84069	1037.3372	1137.8105	1330.7401	1582.9319	1774.0199
386.92008	578.383162	726.8544	1037.6087	1138.6377	1331.7496	1583.9319	1774.1046
388.10485	579.90398	727.85884	1037.7161	1138.7248	1331.8322	1586.6272	1775.1075

## APÉNDICES

427.38048	581.001454	728.85049	1038.2785	1138.8119	1332.751	1588.0611	1783.9012
428.38259	581.8482	731.18718	1039.2779	1139.7347	1333.7536	1589.6766	1785.9815
449.36172	583.20566	741.39424	1039.6262	1139.8219	1340.2472	1592.3025	1786.9944
486.007413	583.88218	741.529267	1040.2725	1140.7386	1345.6311	1593.708	1802.0615
487.015773	584.02082	742.39458	1041.2749	1140.8259	1349.9222	1593.8883	1803.0592
487.942923	584.86976	743.49653	1041.7321	1141.6637	1357.8475	1593.9725	1804.0723
488.023233	585.84645	745.22708	1046.5068	1141.8386	1357.942	1594.983	1805.9849
491.027372	585.85985	745.42316	1047.326	1142.5826	1361.7888	1595.1515	1814.1038
498.936252	586.07693	745.51161	1047.6527	1142.6701	1362.4633	1595.9102	1815.1116
500.93812	586.96529	746.42781	1048.6529	1142.8453	1373.7549	1595.9945	1816.0471
500.95719	587.08084	748.83799	1049.5774	1143.2396	1373.8512	1596.7778	1816.1202
501.93101	587.86105	749.345163	1049.6674	1143.583	1374.8523	1596.9105	1817.0418
501.96926	588.07116	750.267486	1049.7509	1146.614	1375.7775	1596.9949	1817.1296
503.11017	588.98026	750.83208	1050.5804	1147.6124	1375.8643	1597.9117	1818.1399
504.83743	589.98352	753.9516	1050.6705	1151.7001	1376.7808	1598.0083	1828.4665
505.95803	590.97577	759.31145	1051.6815	1153.6225	1376.8676	1598.9139	1830.0038
507.28092	591.83992	763.18067	1051.7717	1155.6389	1377.7851	1600.8363	1846.0838
507.92269	591.98141	778.862534	1052.6875	1155.728	1385.1973	1602.3017	1847.0883
509.93797	593.85546	780.80889	1052.7714	1156.6416	1393.947	1602.5077	1848.0936
509.9532	595.88132	781.32444	1053.6109	1156.7308	1401.7876	1603.7205	1851.3855
510.0903	596.17275	782.32814	1053.6949	1158.5616	1401.8768	1603.9268	1853.193
510.1665	598.9659	783.31721	1053.7854	1162.5881	1402.7897	1605.129	1858.1319
511.9193	600.9818	785.42158	1054.6132	1167.6753	1405.8223	1605.1776	1859.1462
511.95432	602.99669	785.92506	1054.6973	1169.6909	1416.8318	1606.6003	1860.1463
512.18202	603.83969	786.42485	1054.7879	1172.2954	1417.7896	1608.0248	1861.0713
512.9582	603.92661	787.52191	1056.2263	1173.2895	1417.8703	1609.7928	1861.1623
513.028182	605.84645	789.482598	1057.2259	1174.2924	1419.799	1610.794	1862.164
513.94963	609.31279	789.53845	1057.6352	1175.213	1419.89	1613.9991	1867.52
514.312773	610.96439	790.45304	1058.2268	1175.2891	1420.345	1615.2495	1871.0933
514.95277	611.96715	795.91046	1058.5586	1178.5848	1420.8002	1625.949	1872.945
515.05214	612.98099	796.525041	1059.2227	1179.7324	1420.8913	1626.9528	1874.0482
516.327791	613.34532	798.7137	1059.2618	1180.736	1421.8025	1627.9576	1874.7228
517.91083	614.3482	798.78195	1059.5615	1181.7485	1422.7957	1635.9922	1875.0449
518.343468	615.83837	799.039229	1060.2591	1181.8329	1432.4473	1638.007	1876.58
519.94334	615.85569	799.055251	1060.5723	1182.747	1433.6876	1639.0095	1890.1078
520.8338	615.99144	799.30687	1061.2578	1182.8392	1436.0188	1639.9376	1891.1174
520.92364	617.339525	803.33561	1061.578	1183.8468	1437.2534	1640.0255	1902.1669

## APÉNDICES

---

521.00296	618.04751	810.07607	1062.258	1184.7632	1444.6324	1640.9419	1903.1704
521.027141	618.93683	813.287907	1062.5786	1184.8556	1445.8262	1641.0299	1904.1748
521.93601	620.93459	822.641843	1063.253	1185.6883	1450.8564	1641.9346	1905.1015
522.13208	620.95213	827.88115	1063.4626	1185.7732	1455.6925	1642.0226	1905.18
522.60128	621.95614	829.44512	1063.6461	1185.8657	1458.1828	1643.0288	1906.186
522.94004	622.95085	830.44803	1064.7087	1186.6068	1459.1827	1646.1287	1906.4848
523.27687	623.95383	831.54789	1065.5691	1186.7768	1460.1838	1651.8855	1918.0662
523.60496	626.49547	832.662013	1065.7072	1186.8694	1461.1858	1653.8153	1920.8467
523.93111	627.22955	833.47678	1065.7532	1187.6115	1461.9037	1653.9043	1924.6859
523.9515	630.93818	833.56772	1067.5831	1190.6408	1462.9075	1654.006	1925.2125
525.03635	631.117158	834.48246	1067.6753	1195.6323	1463.8277	1655.3667	1926.5539
525.29103	631.94251	834.679979	1067.7676	1195.726	1463.9124	1658.0296	1930.3461
525.94905	632.9342	843.3337	1068.5922	1197.6501	1464.8336	1658.1189	1934.1335
526.04022	632.95225	847.36463	1068.678	1198.661	1464.9183	1664.1952	1935.1464
527.89617	634.93366	848.555793	1069.3119	1199.6653	1465.8404	1669.9826	1935.967
528.90366	634.96993	848.65889	1070.2772	1199.7595	1466.8377	1670.9888	1941.7417
529.92556	637.8365	850.673824	1071.2769	1200.6709	1475.7412	1671.983	1945.514
530.91345	638.33291	873.47417	1072.2779	1204.2634	1475.8055	1672.9264	1946.1952
531.93423	638.49444	873.56198	1074.5372	1205.2669	1477.7141	1673.9353	1947.1851
532.93936	639.330068	874.47495	1079.2981	1206.2637	1482.1568	1674.9321	1947.4774
533.28357	640.59078	875.57534	1079.6198	1207.2617	1483.3111	1680.9319	1948.2083
533.93569	642.93457	875.7369	1081.6401	1208.2609	1484.6072	1682.0262	1948.2895
538.08583	644.93212	876.57972	1082.6422	1217.8401	1485.9159	1682.5086	1949.216
539.08953	644.95378	876.74157	1083.5582	1222.6078	1488.56	1683.0303	1949.2973
539.89452	646.373734	877.50234	1083.6525	1223.7556	1489.8413	1684.0483	1950.2083
541.92682	648.28732	877.59075	1085.6707	1224.7592	1491.8534	1684.9627	1960.9434
542.06271	650.90878	887.35828	1085.7585	1225.683	1493.8696	1685.0542	1964.8377
542.985373	652.92787	891.39246	1090.5263	1225.7722	1494.8847	1685.9694	1970.6761
543.92746	653.34102	912.460043	1091.6771	1225.8614	1494.994	1686.061	1972.6611
545.01006	653.93147	915.57275	1092.6797	1226.689	1496.1523	1687.0556	1978.5344
545.92233	654.93421	917.50208	1093.6016	1226.7783	1500.0416	1694.9123	1982.4311
545.95126	655.44438	917.5861	1093.6904	1227.7856	1501.4697	1695.9148	1983.1151
547.0254	656.28221	918.50059	1093.7861	1227.875	1502.6906	1697.843	1988.4152
547.93063	657.36997	919.6061	1094.6067	1229.7143	1503.913	1697.9355	1992.3282
549.25376	657.45915	920.60804	1094.6957	1229.804	1503.9681	1698.9407	1993.0135
550.315951	658.37425	921.53234	1095.7092	1229.8936	1505.2583	1701.1127	1993.232
550.63296	660.89345	921.61691	1095.7983	1230.6356	1505.3687	1701.4574	1994.2917

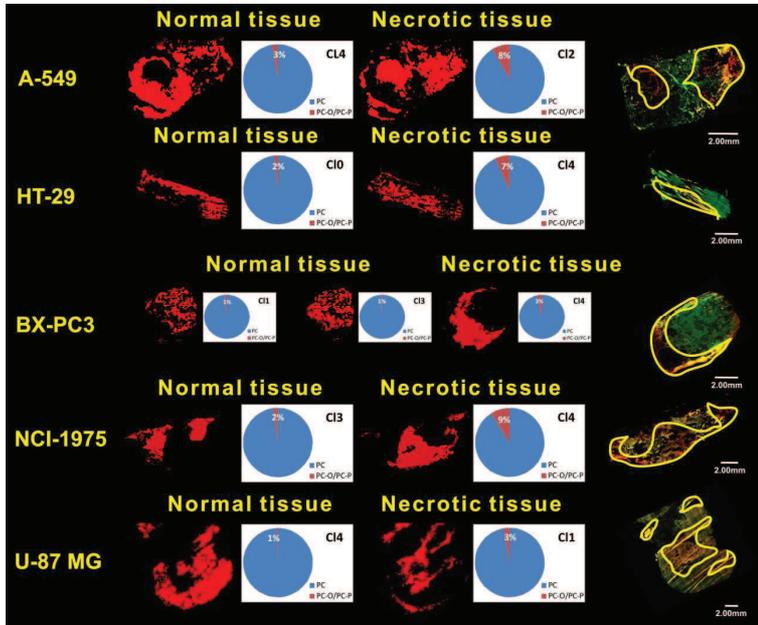
## APÉNDICES

---

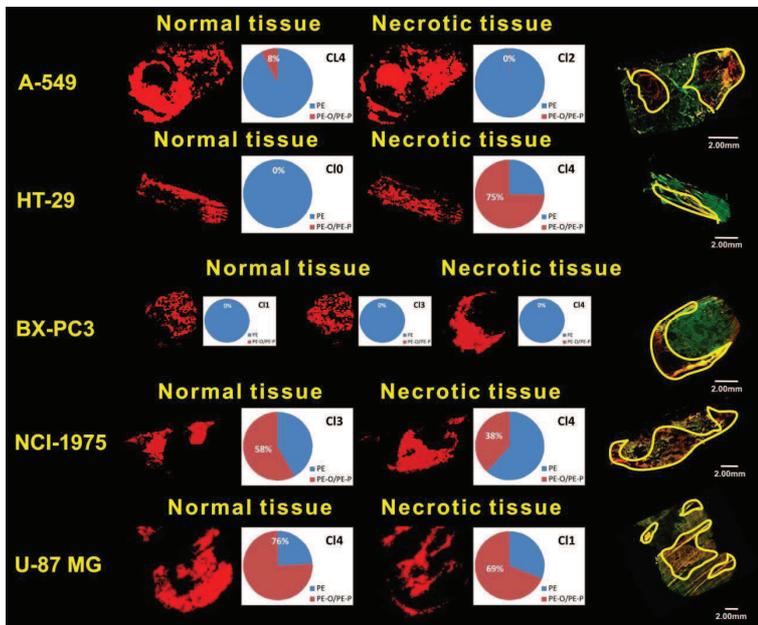
551.29089	662.91084	922.62215	1096.7104	1230.7171	1505.8433	1702.0543	1994.359
551.63527	663.91492	931.3838	1096.7996	1230.8966	1505.9206	1702.7178	1998.2858
551.8924	664.92453	934.88456	1097.6305	1231.2312	1506.5944	1703.0631	
552.331665	665.91046	935.88994	1097.7199	1232.2277	1506.6828	1704.2721	
552.8957	666.9051	959.59803	1097.8092	1233.2336	1506.9259	1705.8152	
553.90912	668.62331	961.5274	1098.2767	1234.6668	1507.9433	1709.3216	
554.10376	669.62731	961.61191	1098.6413	1235.6674	1508.9395	1713.7231	

## APÉNDICES

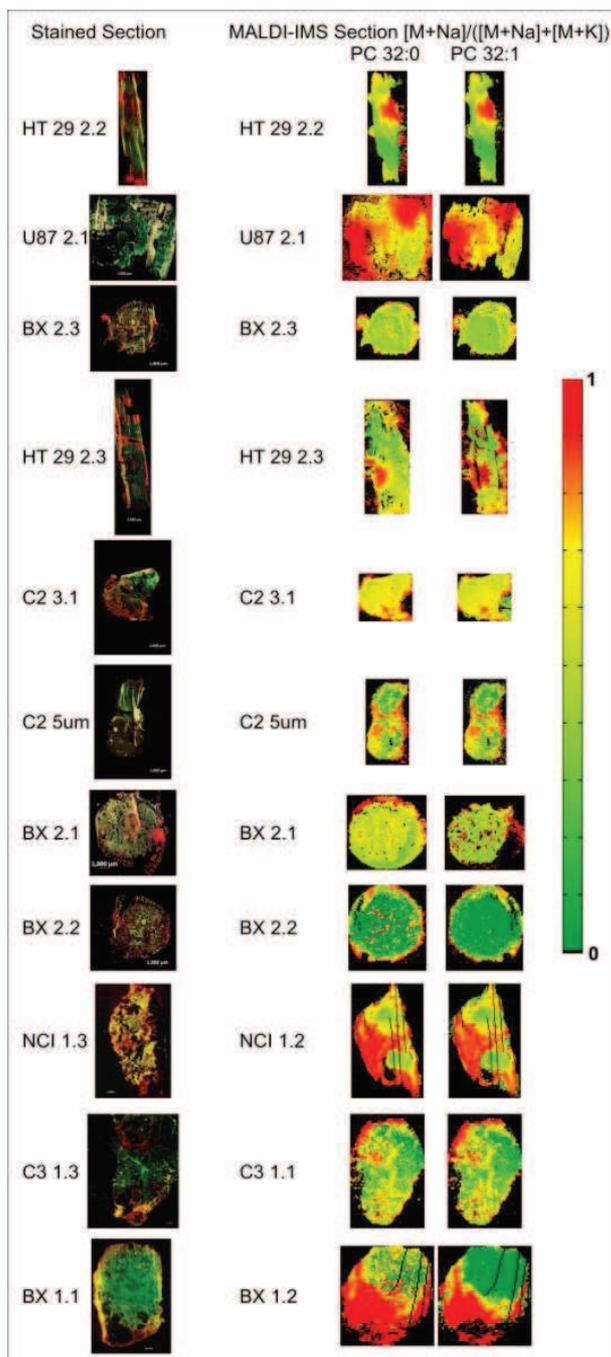
A-IV. Proporción de éteres de PC en los clústeres de los xenografos A-549, BX-PC3, HT-29, NCI-1975 y U-87 MG tras recalculer las intensidades.



A-V. Proporción de éteres de PE en los clústeres de los xenografos A-549, BX-PC3, HT-29, NCI-1975 y U-87 MG tras haber recalculado las intensidades.

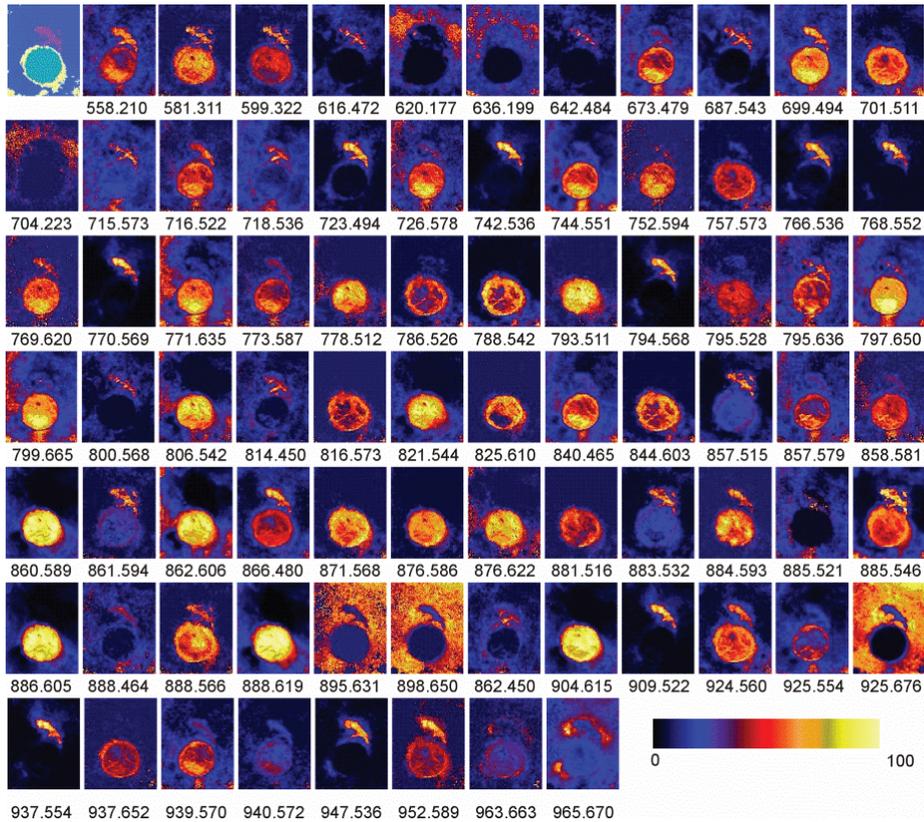


A-VI. Comparación entre la relación  $[M+Na]/([M+Na]+[M+K])$  para las especies PC 32:0 y PC 32:1, y las áreas necróticas del tejido teñidas de amarillo-rojo con Naranja de acridina.

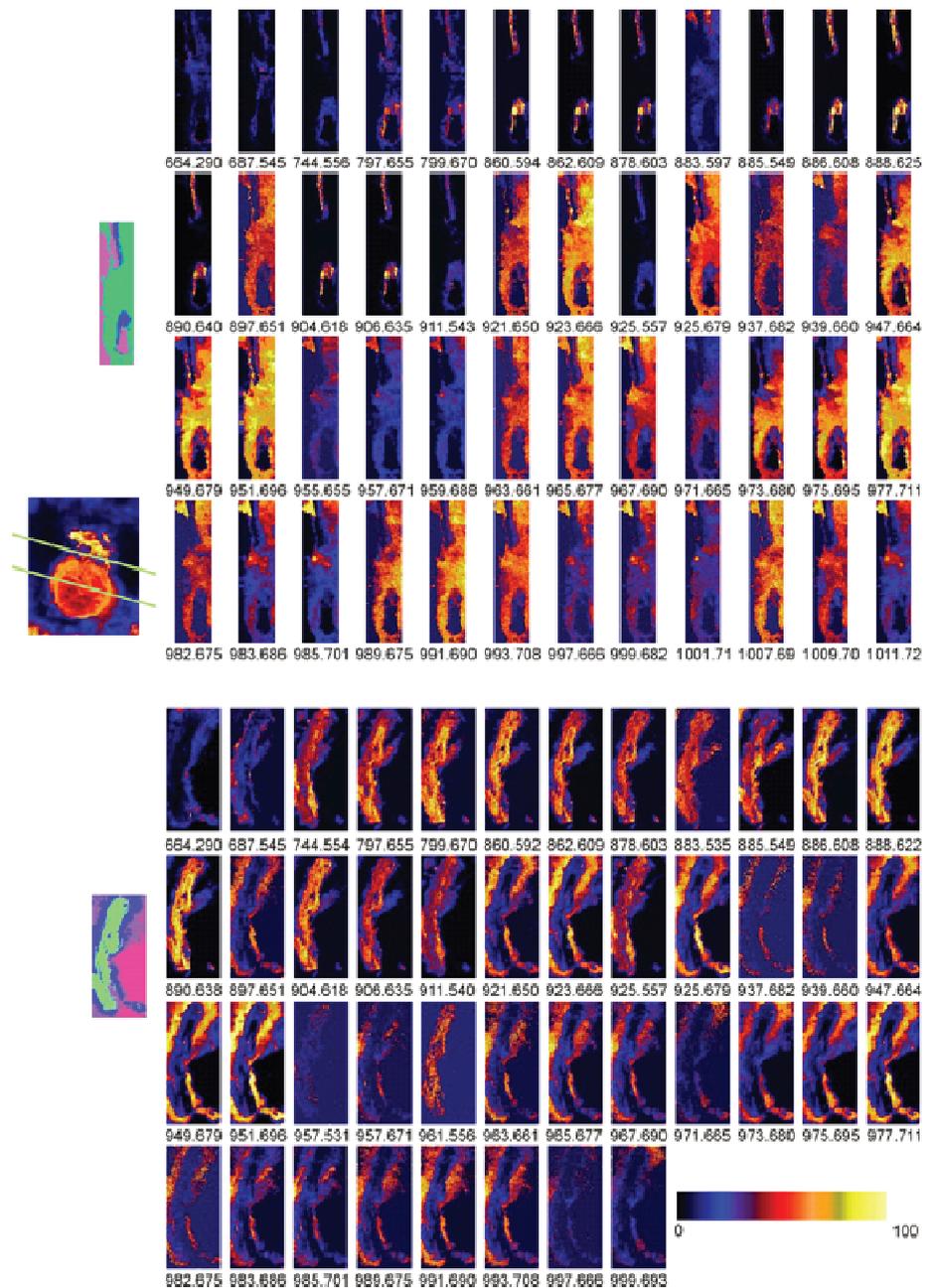


## APÉNDICES

A-VII. Imágenes de algunos canales másicos seleccionados de una sección transversal del nervio ciático en modo de ionización negativo y empleando DAN como matriz. Resolución espacial: 50  $\mu\text{m}$ , 10 disparos por píxel. Resolución en masa: 100.000.

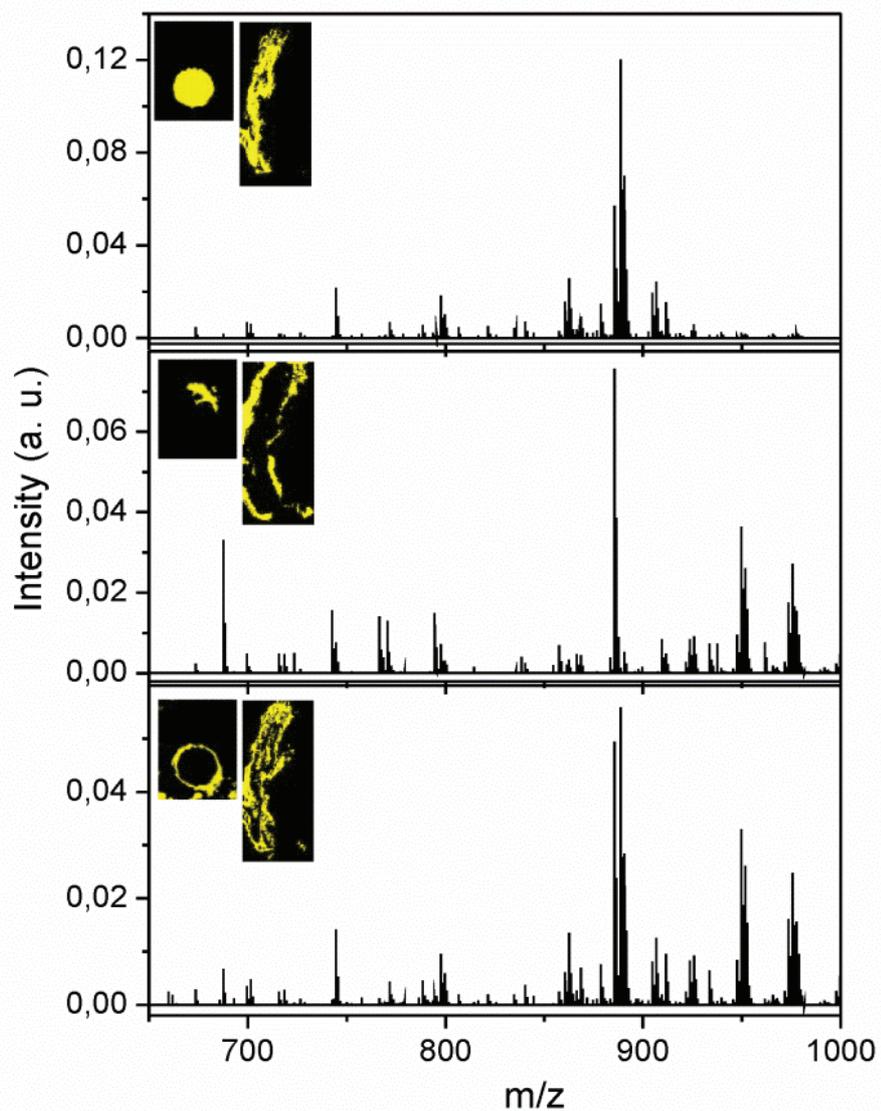


A-VIII. Imágenes de algunos canales máscicos seleccionados de secciones longitudinales de nervio ciático en modo de ionización negativo y empleando MBT como matriz. Resolución espacial: 100 y 50  $\mu\text{m}$ , 10 disparos por píxel. Resolución en masa: 100.000.



## APÉNDICES

A-IX. Espectros promedio de las diferentes regiones identificadas por clusterización k-means en modo de ionización NEGATIVO.



**A-X. Asignaciones en MALDI-IMS y HPLC-ESI-MS/M de Glicerofosfolípidos en nervio ciático.**

Species	Adduct		Tentative Structure
	IMS	ESI	
LPA(17:0)	+K <sup>+</sup>		
PA(32:0)	-H <sup>+</sup>		
PA(34:1)	-H <sup>+</sup>		
PA(34:2)	-H <sup>+</sup>		
PA(36:1)	-H <sup>+</sup>		
PA(36:2)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(18:0/18:1)
PA(38:2)	+K <sup>+</sup>		
PA(38:4)	-H <sup>+</sup>		
PA(40:1)	-H <sup>+</sup>		
PA(41:6)	+ [MBT + H] <sup>+</sup>		
PA(42:4)		-H <sup>+</sup>	
PA(43:4)		-H <sup>+</sup>	
PA(43:6)		-H <sup>+</sup>	
PC(30:0)	+H <sup>+</sup>		
PC(32:0)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub>	(16:0/16:0)
PC(32:1)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub>	(16:1/16:0) / (14:0/18:1)
PC(32:2)		+AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub>	(16:1/16:1)
PC(33:1)	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	(15:1/18:0)
PC(33:2)		+H <sup>+</sup>	
PC(34:0)	+Na <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	
PC(34:1)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(16:0/18:1)
PC(34:2)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(16:0/18:2) / (18:2/16:0) <sup>+</sup>
PC(34:3)	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	
PC(35:1)	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	(18:1/17:0)
PC(36:1)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub>	(18:0/18:1)
PC(36:2)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	
PC(36:3)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	
PC(36:4)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , + [MBT+H] <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(16:0/20:4)
PC(36:5)	+ [MBT+H] <sup>+</sup>		
PC(38:1)	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	
PC(38:2)		+H <sup>+</sup>	(18:0/20:2) / (18:1/20:1)
PC(38:3)		+H <sup>+</sup>	(18:1/20:2) / (18:0/20:3)
PC(38:4)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	
PC(39:1)		+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(21:0/18:1)
PC(40:1)	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	
PC(40:2)		+H <sup>+</sup>	
PC(41:6)		+H <sup>+</sup>	
PC(42:1)	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(18:1/24:0) / (24:0/18:1)
PC(46:0)		+H <sup>+</sup>	
LPC (O-16:0)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	
LPC (O-18:0)		+H <sup>+</sup>	
LPC (O-18:1) / (P-18:0)		+H <sup>+</sup>	
PC (O-32:1) / (P-32:0)		+H <sup>+</sup>	
PC (O-33:2)		+H <sup>+</sup>	
PC (O-34:0)		+H <sup>+</sup>	

## APÉNDICES

PC (O-34:1) / (P-34:0)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	
PC (O-34:2) / (P-34:1)	+Na <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	
PC (O-36:1) / (P-36:0)		+H <sup>+</sup>	
PC (O-36:2) / (P-36:1)		+H <sup>+</sup>	
PC (O-36:3) / (P-36:2)		+H <sup>+</sup>	
PC (O-36:5) / (P-36:4)	+H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	
PC (O-40:0)			+H <sup>+</sup>
PC (O-40:1) / (P-40:0)		+H <sup>+</sup>	
<hr/>			
LPE(18:0)		-H <sup>+</sup>	
LPE(18:1)		-H <sup>+</sup>	
LPE(20:0)		-H <sup>+</sup>	
LPE(20:1)		-H <sup>+</sup>	
PE(34:1)	-H <sup>+</sup>		
PE(34:2)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(16:1/18:1)
PE(36:1)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	(18:0/18:1)
PE(36:2)	-H <sup>+</sup>		
PE(36:3)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(18:2/18:1)
PE(36:4)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE(38:1)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(20:0/18:1)/(18:1/20:0)/ (16:0/22:1)
PE(38:2)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(18:1/20:1)
PE(38:4)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(18:0/20:4)
PE(38:5)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(18:1/20:4)
PE(38:6)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	(16:0/22:6)
PE(40:1)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(22:0/18:1) / (20:1/20:0)
PE(40:4)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE(40:5)		-H <sup>+</sup>	
PE(40:6)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(18:0/22:6)
PE(42:1)		-H <sup>+</sup>	(24:0/18:1)
LPE (P-16:0)		-H <sup>+</sup>	
LPE (O-18:1) / (P-18:0)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (P-32:1)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (O-32:1) / (P-32:0)		-H <sup>+</sup> / -H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (O-33:2) / (P-33:1)		-H <sup>+</sup>	
PE (O-34:1) / (P-34:0)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (O-34:2) / (P-34:1)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+(a)</sup>	
PE (O-34:3) / (P-34:2)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (O-34:4) / (P-34:3)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (O-35:2) / (P-35:1)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (P-35:2)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (O-36:2) / (P-36:1)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+(b)</sup>	
PE (O-36:3) / (P-36:2)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	
PE (O-36:4) / (P-36:3)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	
PE (O-36:5) / (P-36:4)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	
PE (O-38:0)		-H <sup>+</sup>	
PE (O-38:2) / (P-38:1)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (O-38:3) / (P-38:2)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (O-38:4) / (P-38:3)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (O-38:5) / (P-38:4)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PE (O-38:6) / (P-38:5)	+Na <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	
PE (P-38:6)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	

## APÉNDICES

PE (P-40:6)	+Na <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>
PE (O-40:5) / (P-40:4)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>
PE (O-40:6) / (P-40:5)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>
PE (O-40:8) / (P-40:7)	-H <sup>+</sup>	
PE (O-41:0)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>
PE (O-42:1) / (P-42:0)		-H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
PE (O-42:0)		-H <sup>+</sup>

a) Alternative assingment [PC (P-33:1) +H]<sup>+</sup>

b) Alternative assingment [PC (O-33:2) +H]<sup>+</sup> / [PC (P-33:2) +H]<sup>+</sup>

PS(34:1)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(16:0/18:1)
PS(36:1)	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	(18:0/18:1)
PS(36:2)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	(18:1/18:1) & (18:0/18:2)
PS(38:1)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(18:1/20:0)
PS(38:2)		-H <sup>+</sup>	(18:0/20:2) / (18:1/20:1)
PS(38:3)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(18:0/20:3)
PS(38:4)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(18:1/20:3) & (18:0/20:4)
PS(38:5)		-H <sup>+</sup>	
PS(40:1)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	(18:1/22:0)
PS(40:2)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PS(40:4)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(18:0/22:4) / (20:0/20:4)
PS(42:1)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PS(42:4)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	
PS(42:5)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(22:1/20:4) / (20:1/22:4)
PS(45:6)	-H <sup>+</sup>		
PS(52:0)	+K <sup>+</sup>		
PS(53:6)	+Na <sup>+</sup>		

PG(24:6)	-H <sup>+</sup>		
PG(34:0)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	(16:0/18:0)
PG(34:1)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(16:0/18:1) / (16:1/18:0)
PG(36:0)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(18:0/18:0) & (20:0/16:0)
PG(36:1)		-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>	(18:1/18:0)
PG(44:2)		-H <sup>+</sup>	
PG(44:4)		-H <sup>+</sup>	(20:4/24:0)
PG(45:5)	-H <sup>+</sup>		
PG(46:10)	-H <sup>+</sup>		

PI(34:1)		-H <sup>+</sup>	
PI(36:0)		-H <sup>+</sup>	(18:0/18:0)
PI(36:1)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(18:0/18:1)
PI(36:2)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(18:1/18:1) / (16:0/20:2)
PI(36:4)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(16:0/20:4)
PI(38:3)		-H <sup>+</sup>	(18:0/20:3)
PI(38:4)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	(18:0/20:4)
PI(38:5)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(18:1/20:4)
PI(38:6)	-H <sup>+</sup>		
PI(39:0)		-H <sup>+</sup>	
PI(40:4)	-H <sup>+</sup>		
PI(40:6)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	
PI(42:0)	-H <sup>+</sup>		
PI(42:1)	-H <sup>+</sup>		
PI(42:4)		-H <sup>+</sup>	
PI(42:5)		-H <sup>+</sup>	

## APÉNDICES

PI(42:6)		-H <sup>+</sup>
PI(44:1)	-H <sup>+</sup>	
PI(44:2)	-H <sup>+</sup>	
LPI(O-18:0)		
LPI(O-18:2)		
PI(O-32:0)	-H <sup>+</sup>	
PI(O-34:1)/(P-34:0)	-H <sup>+</sup>	
PI(O-38:4)/(P-38:3)	-H <sup>+</sup>	
PI(O-38:5)/(P-38:4)	-H <sup>+</sup>	

### A-XI. Asignaciones en MALDI-IMS y HPLC-ESI-MS/M de Esfingolípidos en nervio ciático.

Species	Adduct		Tentative Structure
	IMS	ESI	
Cer(38:0)		+H <sup>+</sup>	(18:0/20:0)
Cer(40:0)		+H <sup>+</sup>	(18:0/22:0)
Cer(40:1)		+H <sup>+</sup>	(18:1/22:0)
Cer(40:2)		+H <sup>+</sup>	(18:1/22:1)
Cer(42:0)		+H <sup>+</sup>	(18:0/24:0)
Cer(42:1)		+H <sup>+</sup>	(18:1/24:0)
Cer(42:2)		+H <sup>+</sup>	(18:1/24:1)
Cer(43:2)	-H <sup>+</sup>		
CerP(34:1)	-H <sup>+</sup>		
CerP(36:2)	-H <sup>+</sup>		
CerP(38:2)	-H <sup>+</sup>		
CerP(42:2)	+Na <sup>+</sup>		
CerP(42:3)	-H <sup>+</sup>		
CerP(44:2)	-H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	(18:1/26:1)
CerP(44:3)	+Na <sup>+</sup>		
SM(34:0)	+H <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	(18:0/16:0)
SM(34:1)	+H <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	(18:1/16:0)
SM(36:1)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	(18:1/18:0)
SM(36:2)		+H <sup>+</sup>	(18:1/18:1) / SM(18:2/18:0)
SM(38:0)		+H <sup>+</sup>	
SM(38:1)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(20:0/18:1)
SM(38:2)		+H <sup>+</sup>	(18:2/20:0)
SM(40:0)	+Na <sup>+</sup>	+AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub>	(18:0/22:0)
SM(40:1)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub>	(18:1/22:0) & (18:0/22:1)
SM(40:2)		+H <sup>+</sup>	(18:1/22:1)
SM(41:2)		+H <sup>+</sup>	
SM(42:0)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup>	
SM(42:1)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub>	(18:0/24:0)
SM(42:2)	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +AcO <sup>-</sup> , -CH <sub>3</sub>	(18:1/24:1)

## APÉNDICES

PE-Cer(36:1)	-H <sup>+</sup>
PE-Cer(37:1)	-H <sup>+</sup>
PE-Cer(38:1)	-H <sup>+</sup>
PE-Cer(40:1)	-H <sup>+</sup>
PE-Cer(42:2)	-H <sup>+</sup>
PE-Cer(43:1)	-H <sup>+</sup>
PE-Cer(44:1)	-H <sup>+</sup>
PE-Cer(44:2)	-H <sup>+</sup>
PE-Cer(44:3)	-H <sup>+</sup>

LacCer(32:0)		+H <sup>+</sup>	
LacCer(42:1)	+K <sup>+</sup>		
LacCer(42:2)	+K <sup>+</sup>		
LacCer(44:2)	+K <sup>+</sup>		
LacCer(44:3)	+K <sup>+</sup>		
LacCer(44:4)	+K <sup>+</sup>		
LacCer(46:2)	+K <sup>+</sup>		
LacCer(46:3)	+K <sup>+</sup>		
LacCer(46:4)	+K <sup>+</sup>		

HexCer(30:0)	-H <sup>+</sup>		
HexCer(30:1)	-H <sup>+</sup>		
HexCer(36:0)		-H <sup>+</sup>	(18:0/18:0)
HexCer(36:1)		+H <sup>+</sup> , -H <sup>-</sup>	(18:1/18:0)
HexCer(38:0)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>-</sup>	(20:0/18:0) / (18:0/20:0)
HexCer(38:1)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>-</sup>	(18:1/20:0)
HexCer(38:2)	-H <sup>+</sup>	+H <sup>+</sup>	(18:1/20:1)
HexCer(40:0)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>-</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(18:0/22:0)
HexCer(40:1)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>-</sup> , +AcO <sup>-</sup>	
HexCer(40:2)		+H <sup>+</sup>	(18:1/22:1)
HexCer(41:1)		-H <sup>-</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(18:1/23:0)
HexCer(42:0)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , -H <sup>-</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(18:0/24:0)
HexCer(42:1)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>-</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(18:0/24:1) & (18:1/24:0)
HexCer(42:2)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>-</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(18:1/24:1) / (18:2/24:0)
HexCer(44:1)		+H <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , -H <sup>-</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(18:1/26:0)
HexCer(44:2)		-H <sup>-</sup> , +AcO <sup>-</sup>	(18:1/26:1)

SFT(34:1)	-H <sup>+</sup>		
SFT(36:1)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(18:1/18:0)
SFT(36:3)	-H <sup>+</sup>		
SFT(38:0)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(18:0/20:0)
SFT(38:1)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(18:1/20:0)
SFT(40:0)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(18:0/22:0)
SFT(40:1)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(18:1/22:0)
SFT(40:2)	-H <sup>+</sup>		
SFT(41:1)	-H <sup>+</sup>		
SFT(41:2)	-H <sup>+</sup>		
SFT(42:0)		-H <sup>+</sup>	(18:0/24:0)
SFT(42:1)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(18:1/24:0) / (18:0/24:1)
SFT(42:2)	-H <sup>+</sup>	-H <sup>+</sup>	(18:1/24:1)
SFT(42:3)	-H <sup>+</sup>		
SFT(42:4)	-H <sup>+</sup>		
SFT(43:2)	-H <sup>+</sup>		
SFT(44:1)	-H <sup>+</sup>		

## APÉNDICES

SFT(44:2) -H<sup>+</sup>

### A-XII. Asignaciones en MALDI-IMS y HPLC-ESI-MS/M de Triglicéridos en nervio ciático.

Species	Adduct	
	IMS	ESI
TG(38:1)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(40:0)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(40:1)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(40:2)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(42:0)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(42:1)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(42:2)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(44:0)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(44:1)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(44:2)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>
TG(44:3)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(44:4)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(44:5)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(45:1)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(45:2)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(46:0)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(46:1)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(46:2)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>
TG(46:3)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup>
TG(46:4)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(46:5)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(46:6)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(47:0)	+ [MBT+H] <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(47:1)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(47:2)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(47:3)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(48:0)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(48:1)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(48:2)	+ [MBT+H] <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(48:3)	+ [MBT+H] <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>
TG(48:4)	+ [MBT+H] <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>
TG(48:5)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(48:6)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(49:0)	+ [MBT+H] <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(49:1)	+ [MBT+H] <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(49:2)	+ [MBT+H] <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(49:3)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(49:4)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(50:0)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(50:1)	+ [MBT+H] <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(50:2)	+ [MBT+H] <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>
TG(50:3)	+ [MBT+H] <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>
TG(50:4)	+ [MBT+H] <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>
TG(50:5)	+ [MBT+H] <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup> , +K <sup>+</sup> , +H <sup>+</sup>
TG(50:6)	+ [MBT+H] <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(50:7)		+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
TG(50:8)	+ [MBT+H] <sup>+</sup>	
TG(51:0)	+ [MBT+H] <sup>+</sup>	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , +Na <sup>+</sup>

## APÉNDICES

TG(51:1)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(51:2)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(51:3)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(51:4)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+, +\text{H}^+$
TG(51:5)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(52:0)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(52:1)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(52:2)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+, +\text{Na}^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(52:3)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+, +\text{Na}^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(52:4)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+, +\text{Na}^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+, +\text{H}^+$
TG(52:5)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+, +\text{Na}^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+, +\text{K}^+, +\text{H}^+$
TG(52:6)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+, +\text{K}^+, +\text{H}^+$
TG(52:7)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(53:0)		$+\text{NH}_4^+$
TG(53:1)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(53:2)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(53:3)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(53:4)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(53:5)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(53:6)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+$
TG(53:8)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	
TG(54:0)		$+\text{NH}_4^+$
TG(54:1)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(54:2)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(54:3)	$+\text{Na}^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+, +\text{H}^+$
TG(54:4)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+, +\text{Na}^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+, +\text{H}^+$
TG(54:5)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+, +\text{Na}^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+, +\text{K}^+, +\text{H}^+$
TG(54:6)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+, +\text{Na}^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+, +\text{K}^+, +\text{H}^+$
TG(54:7)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+, +\text{K}^+, +\text{H}^+$
TG(54:8)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(54:9)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	
TG(55:1)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(55:2)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(55:3)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(55:4)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(55:5)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+$
TG(55:6)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+$
TG(55:7)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	
TG(55:8)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	
TG(55:9)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	
TG(55:10)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+$
TG(56:0)		$+\text{NH}_4^+$
TG(56:1)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(56:2)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(56:3)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(56:4)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(56:5)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(56:6)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(56:7)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(56:8)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(56:9)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(56:10)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	
TG(57:1)		$+\text{NH}_4^+$
TG(57:2)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(57:3)		$+\text{NH}_4^+, +\text{Na}^+$
TG(57:4)		$+\text{NH}_4^+$
TG(57:9)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	
TG(57:10)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	
TG(57:11)	$+[\text{MBT}+\text{H}]^+$	

## APÉNDICES

TG(57:12)	$+[MBT+H]^+$	
TG(58:1)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(58:2)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(58:3)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(58:4)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(58:5)		$+NH_4^+$
TG(58:6)		$+NH_4^+$
TG(58:7)	$+[MBT+H]^+$	$+NH_4^+$
TG(58:8)	$+[MBT+H]^+$	$+NH_4^+$
TG(58:9)	$+[MBT+H]^+$	$+NH_4^+$
TG(58:10)	$+[MBT+H]^+$	$+NH_4^+$
TG(59:2)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(59:3)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(59:4)		$+NH_4^+$
TG(59:13)	$+[MBT+H]^+$	
TG(60:1)		$+NH_4^+$
TG(60:2)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(60:3)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(60:4)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(60:5)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(60:6)		$+NH_4^+$
TG(60:10)		$+NH_4^+$
TG(62:2)		$+NH_4^+$
TG(62:3)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(62:4)		$+NH_4^+, +Na^+$
TG(62:5)		$+NH_4^+$
TG(64:16)	$+[MBT+H]^+$	

### A-XIII. Asignaciones en MALDI-IMS y HPLC-ESI-MS/M de Diglicéridos en nervio ciático.

Species	Adduct		Tentative Structure
	IMS	ESI	
DG(32:1)	$+Na^+$	$+Na^+$	
DG(34:1)		$+Na^+$	(16:0/18:1)
DG(34:2)	$+Na^+$	$+Na^+, +K^+$	(16:0/18:2)
DG(34:3)	$+Na^+$		
DG(36:2)		$+Na^+$	(18:0/18:2)
DG(36:3)		$+Na^+, +K^+, +H^+, +NH_4^+$	(18:1/18:2)
DG(36:4)		$+Na^+, +H^+$	(18:2/18:2)
DG(38:4)		$+Na^+, +H^+, +NH_4^+$	(18:0/20:4)
DG(O-30:0)	$+Na^+$		
DG(O-30:1)	$+Na^+$		
DG(O-32:0)	$+Na^+$		
DG(O-32:1)	$+Na^+$		
DG(O-32:2)	$+Na^+$		
DG(O-32:3)	$+Na^+$		
DG(O-34:0)	$+Na^+$		
DG(O-34:1)	$+Na^+$		
DG(O-34:2)	$+Na^+$		
DG(O-34:3)	$+Na^+$		
DG(O-34:4)	$+Na^+$		

**A-XIV. Muestras de médula analizadas. Donde MS corresponde a muestras de médula sana, MC a médulas lesionadas por contusión, DMG a médulas con desmielinización general, DMP a médulas con desmielinización parcial, LTH corresponde a médulas tratadas con ASC humanas, LTHM a médulas tratadas con ASC humanas modificadas, LTR corresponde a médulas tratadas con ASC de rata y LTRM a médulas tratadas con ASC de rata modificadas.**

Sección	Mat riz	Resolución espacial (µm)	Modo de ionización	Laser Energy (µJ)	Resolución en masa	Rango de masas (Da)
120229_A1	MBT	100	+	35	100000	540-810
120229_A2	MBT	100	+	35	100000	300-560
120229_A3	MBT	100	+	35	100000	790-1050
120229_A4	MBT	100	+	35	100000	1000-1400
120229_B1	MBT	100	-	35	100000	700-950
120229_B2	MBT	100	-	35	100000	700-950
120229_B3	MBT	100	-	35	100000	1400-1650
120229_B4	MBT	100	-	35	100000	940-1200
120229_C2	MBT	25	-	35	100000	700-950
120229_C3	MBT	25	+	35	100000	600-800
130621_MS_NL1_TC20_11_B7	MBT	25	-	15	100000	550-1000
130621_MS_NL1_TC20_11_B3	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130621_MS_NL1_TC20_11_C2	MBT	100	-	15	100000	900-180
130621_MS_NL1_TC20_11_C8	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130621_MS_NL1_TC20_11_C7	MBT	100	+	15	100000	480-950
130621_MS_NL1_TC20_11_A6	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130621_MS_NL1_TC20_11_C1	MBT	100	+	15	100000	900-1800
130621_MS_NL1_TC20_11_B6	MBT	25	+	15	100000	480-950
130621_MS_NL1_TC20_11_B2	MBT	50	+	15	100000	480-950
130621_MS_NL1_TC20_11_A5	MBT	100	+	15	100000	480-950
130718_MS_SAL_1A	MBT	100	+	15	100000	480-1200
130718_MS_SAL_2B	MBT	100	+	15	100000	480-1200
130718_MS_PFA_4A	MBT	100	+	15	100000	480-1200
130718_MS_PFA_5B	MBT	100	+	15	100000	480-1200
131031_MS_25	MBT	25	+	15	60000	480-1200
131031_MS_501	MBT	50	+	15	60000	480-1200
131031_MS_502	MBT	50	+	15	60000	480-1200
131031_MS_503	MBT	50	+	15	60000	480-1200

## APÉNDICES

---

131031_MS_504	MBT	50	+	15	60000	480-1200
131031_MS_1001	MBT	100	+	15	60000	480-1200
131031_MS_1002	MBT	100	+	15	60000	480-1200
131031_MS_1003	MBT	100	+	15	60000	480-1200
131031_MS_1004	MBT	100	+	15	60000	480-1200
131031_MS_1005	MBT	100	+	15	60000	480-1200
131031_MS_1006	MBT	100	+	15	60000	480-1200
131031_MS_25n	DAN	25	-	20	60000	550-1200
131031_MS_501n	DAN	50	-	20	60000	550-1200
131031_MS_502n	DAN	50	-	20	60000	550-1200
131031_MS_503n	DAN	50	-	20	60000	550-1200
131031_MS_504n	DAN	50	-	20	60000	550-1200
131031_MS_1001n	DAN	100	-	20	60000	550-1200
131031_MS_1002n	DAN	100	-	20	60000	550-1200
131031_MS_1003n	DAN	100	-	20	60000	550-1200
131031_MS_1004n	DAN	100	-	20	60000	550-1200
131031_MS_1005n	DAN	100	-	20	60000	550-1200
131031_MS_1006n	DAN	100	-	20	60000	550-1200
131128_MS_6	MBT	25	+	25	60000	480-1000
131128_MS_4	MBT	50	+	25	60000	480-1000
131128_MS_2	MBT	50	+	25	60000	480-1000
131128_MS_8	MBT	50	+	25	60000	480-1000
131128_MS_10	MBT	50	+	25	60000	480-1000
131128_MS_5	MBT	100	+	25	60000	480-1000
131128_MS_3	MBT	100	+	25	60000	480-1000
131128_MS_12	MBT	100	+	25	60000	480-1000
131128_MS_7	MBT	100	+	25	60000	480-1000
131128_MS_9	MBT	100	+	25	60000	480-1000
131128_MS_11	MBT	100	+	25	60000	480-1000
131202_MS_6	MBT	25	+	35	60000	480-1000
131202_MS_4	MBT	50	+	35	60000	480-1000
131202_MS_2	MBT	50	+	35	60000	480-1000
131202_MS_8	MBT	50	+	35	60000	480-1000
131202_MS_10	MBT	50	+	35	60000	480-1000
140408_MS_long_75	MBT	75	+	35	60000	480-1100
140408_MS_long_25	MBT	25	+	35	60000	480-1100
140409_MS_long_75	DAN	75	-	60	60000	550-1200

## APÉNDICES

140409_MS_long_25	DAN	25	-	60	60000	550-1200
130617_MC_R7_N15_A1	MBT	150	+	15	100000	150-480
130617_MC_R7_N15_A2	MBT	150	+	15	100000	860-1200
130617_MC_R7_N15_B1	MBT	150	+	15	100000	480-900
130617_MC_R7_N15_B2	MBT	150	-	15	100000	150-550
130618_MC_R7_N15_B2	MBT	25	-	15	100000	550-1000
130618_MC_R7_N15_B3	MBT	25	+	15	100000	480-950
130617_MC_R7_N15_C2	MBT	150	-	15	100000	550-950
130617_MC_R7_N15_C3	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130617_MC_R7_N15_C4	MBT	50	+	15	100000	480-950
130617_MC_R7_N15_D2	MBT	150	-	15	100000	900-1250
130718_MC_R8_1	MBT	100	+	15	100000	480-950
130718_MC_R8_2	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130718_MC_R8_3	MBT	100	+	15	100000	480-950
130718_MC_R8_4	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130718_MC_R8_5	MBT	100	+	15	100000	480-950
130718_MC_R8_6	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130718_MC_R8_7	MBT	50	+	15	100000	480-950
130718_MC_R8_7	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130718_MC_R8_8	MBT	50	+	15	100000	480-950
130718_MC_R8_8	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130718_MC_R8_9	MBT	50	+	15	100000	480-950
130718_MC_R8_9	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130718_MC_R8_10	MBT	50	+	15	100000	480-950
130718_MC_R8_10	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130718_MC_R8_11	MBT	100	+	15	100000	480-950
130718_MC_R8_12	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130718_MC_R8_13	MBT	100	+	15	100000	480-950
130718_MC_R8_14	MBT	100	-	15	100000	550-1000
140414_MC_long_C7_dpi_50	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140414_MC_long_C7_dpi_751	MBT	75	+	35	60000	480-1100
140414_MC_long_C7_dpi_752	MBT	75	+	35	60000	480-1100
140415_MC_C7dpi_long_50	DAN	50	-	80	60000	550-1200
140415_MC_C7dpi_long_751	DAN	75	-	80	60000	550-1200
140415_MC_C7dpi_long_752	DAN	75	-	80	60000	550-1200
130724_DMG_R7_A1	MBT	100	+	15	100000	480-950
130724_DMG_R7_A2	MBT	100	-	15	100000	550-1000

## APÉNDICES

---

130724_DMG_R7_A3	MBT	100	+	15	100000	480-950
130724_DMG_R7_A4	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130724_DMG_R7_A5	MBT	100	+	15	100000	480-950
130724_DMG_R7_A6	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130724_DMG_R7_B1	MBT	50	+	15	100000	480-950
130724_DMG_R7_B2	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130724_DMG_R7_B3	MBT	50	+	15	100000	480-950
130724_DMG_R7_B4	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130724_DMG_R7_B5	MBT	50	+	15	100000	480-950
130724_DMG_R7_B6	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130724_DMG_R7_B7	MBT	50	+	15	100000	480-950
130724_DMG_R7_B8	MBT	100	+	15	100000	480-950
130724_DMG_R7_B9	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130724_DMG_R7_B10	MBT	100	+	15	100000	480-950
130724_DMG_R7_B11	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130724_DMG_R7_B12	MBT	100	+	15	100000	480-950
130724_DMG_R7_B13	MBT	100	-	15	100000	550-1000
140120_DMG_R9_B1	DAN	100	-	95	60000	550-1200
140120_DMG_R9_B2	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140120_DMG_R9_B6	DAN	100	-	95	60000	550-1200
140120_DMG_R9_C1	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140120_DMG_R9_C2	DAN	100	-	95	60000	550-1200
140120_DMG_R9_C3	DAN	25	-	95	60000	550-1200
140120_DMG_R9_C4	DAN	100	-	95	60000	550-1200
140120_DMG_R9_C5	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140120_DMG_R9_C6	DAN	100	-	95	60000	550-1200
140120_DMG_R9_C7	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140120_DMG_R9_C10	DAN	100	-	95	60000	550-1200
140411_DMG_21d_lon g_101	MBT	10	+	35	60000	480-1100
140411_DMG_21d_lon g_102	DAN	10	-	60	60000	550-1200
140411_DMG_21d_lon g_501	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140411_DMG_21d_lon g_502	DAN	50	-	60	60000	550-1200
140415_DMG_LPC7dpi _long_50	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140415_DMG_LPC7dpi _long_751	MBT	75	+	35	60000	480-1100
140415_DMG_LPC7dpi _long_752	MBT	75	+	35	60000	480-1100
130724_DMP_R1_A1	MBT	100	+	15	100000	480-950
130724_DMP_R1_A2	MBT	100	-	15	100000	550-1000

## APÉNDICES

130724_DMP_R1_A3	MBT	100	+	15	100000	480-950
130724_DMP_R1_A4	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130724_DMP_R1_A5	MBT	50	+	15	100000	480-950
130724_DMP_R1_A6	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130724_DMP_R1_A7	MBT	50	+	15	100000	480-950
130724_DMP_R1_A8	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130724_DMP_R1_B8	MBT	50	+	15	100000	480-950
130724_DMP_R1_B9	MBT	50	-	15	100000	550-1000
130724_DMP_R1_B10	MBT	50	+	15	100000	480-950
130724_DMP_R1_B11	MBT	100	+	15	100000	480-950
130724_DMP_R1_B12	MBT	100	-	15	100000	550-1000
130724_DMP_R1_D3	MBT	100	+	15	100000	480-950
130724_DMP_R1_D4	MBT	100	-	15	100000	550-1000
140131_DMP_R1_A3	DAN	100	-	80	60000	550-1200
140131_DMP_R1_A5	DAN	50	-	80	60000	550-1200
140131_DMP_R1_A6	DAN	100	-	80	60000	550-1200
140131_DMP_R1_A7	DAN	50	-	80	60000	550-1200
140131_DMP_R1_A8	DAN	100	-	80	60000	550-1200
140131_DMP_R1_B8	DAN	25	-	80	60000	550-1200
140131_DMP_R1_B9	DAN	100	-	80	60000	550-1200
140131_DMP_R1_B10	DAN	50	-	80	60000	550-1200
140131_DMP_R1_B11	DAN	100	-	80	60000	550-1200
140131_DMP_R1_B12	DAN	50	-	80	60000	550-1200
140131_DMP_R1_D3	DAN	100	-	80	60000	550-1200
140203_LTH_R25_C1	MBT	100	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C2	MBT	100	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C3	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C4	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C5	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C6	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C7	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C8	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C9	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C10	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C11	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C12	MBT	50	+	35	60000	480-1100
140203_LTH_R25_C13	MBT	100	+	35	60000	480-1100

## APÉNDICES

---

140204_LTH_R25_C1	DAN	100	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C2	DAN	100	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C3	DAN	50	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C4	DAN	50	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C5	DAN	50	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C6	DAN	50	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C7	DAN	50	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C8	DAN	50	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C9	DAN	50	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C10	DAN	50	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C11	DAN	50	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C12	DAN	50	-	100	60000	550-1200
140204_LTH_R25_C13	DAN	100	-	100	60000	550-1200
140210_LTHM_R48_C1	MBT	100	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C2	MBT	100	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C3	MBT	100	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C4	MBT	50	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C5	MBT	50	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C6	MBT	50	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C7	MBT	50	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C8	MBT	50	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C9	MBT	50	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C10	MBT	50	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C11	MBT	50	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C12	MBT	50	+	25	60000	480-1100
140210_LTHM_R48_C13	MBT	100	+	25	60000	480-1100
140211_LTHM_R48_C1	DAN	100	-	55	60000	550-1200
140211_LTHM_R48_C2	DAN	100	-	55	60000	550-1200
140211_LTHM_R48_C3	DAN	100	-	55	60000	550-1200
140211_LTHM_R48_C4	DAN	50	-	55	60000	550-1200
140211_LTHM_R48_C5	DAN	50	-	55	60000	550-1200
140211_LTHM_R48_C6	DAN	50	-	55	60000	550-1200
140211_LTHM_R48_C7	DAN	50	-	55	60000	550-1200
140211_LTHM_R48_C8	DAN	50	-	55	60000	550-1200
140211_LTHM_R48_C9	DAN	50	-	55	60000	550-1200
140211_LTHM_R48_C10	DAN	50	-	55	60000	550-1200
140211_LTHM_R48_C11	DAN	50	-	55	60000	550-1200

## APÉNDICES

140211_LTHM_R48_C1 2	DAN	50	-	55	60000	550-1200
140211_LTHM_R48_C1 3	DAN	100	-	55	60000	550-1200
130814_LTR_1	MBT	100	+	15	60000	480-950
130814_LTR_2	MBT	100	+	15	60000	480-950
130814_LTR_3	MBT	100	+	15	60000	480-950
130814_LTR_4	MBT	100	+	15	60000	480-950
130814_LTR_5	MBT	100	+	15	60000	480-950
130814_LTR_6	MBT	100	+	15	60000	480-950
130814_LTR_7	MBT	50	+	15	60000	480-950
130814_LTR_8	MBT	50	+	15	60000	480-950
130814_LTR_9	MBT	50	+	15	60000	480-950
130814_LTR_10	MBT	50	+	15	60000	480-950
130814_LTR_11	MBT	100	+	15	60000	480-950
130814_LTR_12	MBT	100	+	15	60000	480-950
130814_LTR_13	MBT	100	+	15	60000	480-950
130814_LTR_14	MBT	100	+	15	60000	480-950
130830_LTR_1	DAN	100	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_2	DAN	100	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_3	DAN	100	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_4	DAN	100	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_5	DAN	100	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_6	DAN	50	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_7	DAN	50	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_8	DAN	50	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_9	DAN	50	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_10	DAN	100	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_11	DAN	100	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_12	DAN	100	-	40	60000	550-1100
130830_LTR_13	DAN	100	-	40	60000	550-1100
140217_R34_LTRM_1	MBT	100	+	30	60000	480-1100
140217_R34_LTRM_2	MBT	100	+	30	60000	480-1100
140217_R34_LTRM_3	MBT	50	+	30	60000	480-1100
140217_R34_LTRM_4	MBT	50	+	30	60000	480-1100
140217_R34_LTRM_5	MBT	50	+	30	60000	480-1100
140217_R34_LTRM_6	MBT	50	+	30	60000	480-1100
140217_R34_LTRM_7	MBT	50	+	30	60000	480-1100
140217_R34_LTRM_8	MBT	50	+	30	60000	480-1100

## APÉNDICES

---

140217_R34_LTRM_9	MBT	50	+	30	60000	480-1100
140217_R34_LTRM_10	MBT	50	+	30	60000	480-1100
140217_R34_LTRM_11	MBT	50	+	30	60000	480-1100
140217_R34_LTRM_12	MBT	100	+	30	60000	480-1100
140217_R34_LTRM_13	MBT	100	+	30	60000	480-1100
140218_R40_LTRM_1	DAN	100	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_2	DAN	100	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_3	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_4	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_5	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_6	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_7	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_8	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_9	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_10	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_11	DAN	50	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_12	DAN	100	-	95	60000	550-1200
140218_R40_LTRM_13	DAN	100	-	95	60000	550-1200





