

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

**CARACTERIZACIÓN DE LA PELVIS RENAL, URÉTERES Y VEJIGA
HUMANA MEDIANTE LA TÉCNICA DE IMAGEN POR
ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

MEMORIA PRESENTADA POR IBAI CALVO IRAETA

DIRECTORES: JOSÉ ANDRÉS FERNÁNDEZ GONZÁLEZ Y GORKA LARRINAGA ENBEITA

**FACULTADES: FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA Y
ENFERMERÍA**

DEPARTAMENTOS: QUÍMICA FÍSICA Y FISIOLÓGÍA

Este trabajo de fin de máster no hubiera sido posible sin la guía de José Andrés Fernández, que me acogió en el Grupo de Espectroscopía durante la carrera, cuando más lo necesitaba; su apoyo es imprescindible en mi etapa de aprendizaje y crecimiento como investigador. También quiero agradecer la ayuda de Gorka Larrinaga, codirector de este trabajo; sus conocimientos me han ayudado a comprender mejor la anatomía de la pelvis y el sistema urinario.

A Lucía, Cristina y Jon por ser mi familia en la universidad, por enseñarme todo lo que sé sobre lipídica y por el apoyo que me habéis dado y me brindáis en el laboratorio.

Quisiera hacer una mención especial a Jon Danel Solano. Su plena disposición para ayudar y sus explicaciones no solo han servido para enriquecerme, sino que, además, han facilitado de forma abrumadora la interpretación de las imágenes histológicas. Tampoco puede faltar en esta mención el Biobanco Vasco, por la recolección de las muestras. En concreto, quería agradecer a Anna Crespo la precisión e ilusión con la que realiza su trabajo; la calidad de los cortes de congelación ha sido indispensable a la hora de realizar una aproximación correcta a la estructura de los tejidos analizados.

Gracias a mis Aitas y a la Peke, por su apoyo incondicional. Y, por último, y no por ello menos importante, gracias a Itzi, mi compañera de viaje, por todo el cariño que me da a diario, por hacer mejores los días malos y por celebrar mis avances como si se tratasen de los suyos propios.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. HISTOLOGÍA BÁSICA DE LA PELVIS RENAL Y VÍAS URIARIAS	1
1.2. LIPIDÓMICA	2
1.2.1. Ácidos Grasos (FA).....	2
1.2.2. Glicerofosfolípidos (GP).....	3
1.3.3. Esfingolípidos (SP)	4
1.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)	5
1.5. FUENTES DE IONES	5
1.5.1 Desorción/Ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI).....	5
1.5.2 MALDI-IMS	6
1.6. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	7
1.7. ANALIZADOR DE MASAS.....	8
1.8. SEGMENTACIÓN	9
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE UROTELIO Y PÉLVIS HUMANAS	9
3.2. SUBLIMACIÓN DE LA MATRIZ.....	10
3.3. ANÁLISIS ILEM	11
3.4. TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E).....	11
3.5. PROCESADO DE DATOS	12
3.5.1. Obtención del espectro	12
3.5.2. Segmentación.....	12
3.5.3. Asignación lipídica	12
3.5.4. Análisis estadístico	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1. DESCRIPCIÓN DE LA PÉLVIS RENAL	13
4.2. DESCRIPCIÓN DEL URÉTER	19
4.3. DESCRIPCIÓN DE LA VEJIGA	21
5. CONCLUSIONES	24
6. PERSPECTIVAS	24
7. BIBLIOGRAFÍA	25
8. ABREVIATURAS	28

RESUMEN

Los lípidos son fundamentales en la vida de las células, su implicación directa en multitud de procesos celulares está contribuyendo al desarrollo de técnicas que permitan estudiarlos de forma exhaustiva. El empleo de técnicas como la desorción ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI) en estudios de imagen de lípidos por espectrometría de masas (ILEM) está facilitando el estudio y caracterización de distintos organismos, tejidos y patologías. En este trabajo se han analizado tres secciones de pelvis, una sección de uréter y una sección de vejiga empleando la ILEM. Los resultados obtenidos indican que la distribución de los lípidos, a lo largo de los tejidos, definen correctamente las estructuras presentes en las secciones, a excepción del uréter. Es más, se ha obtenido una huella lipídica preliminar de la *muscularis mucosae* y el músculo propio de la vejiga. En el cáncer vesical, conocer si las células tumorales infiltran la mucosa y si alcanzan o no la capa muscular propia, y ser capaz de diferenciar entre ambos tejidos, repercute en la toma de decisiones terapéuticas. La diferencia entre sus huellas lipídicas podría ayudar a discernir entre ambos tipos de músculo, permitiendo un mejor estadiaje del cáncer de vejiga, dando lugar a diagnósticos más fiables y decisiones terapéuticas más seguras.

1. INTRODUCCIÓN

Se define como metabolómica al estudio, identificación y cuantificación de compuestos de bajo peso molecular en células, tejidos o fluidos biológicos, producto de reacciones metabólicas de los seres vivos, organismos o muestras biológicas.¹ Permite identificar cambios sutiles en los perfiles metabolómicos entre sistemas biológicos, ya sea en estado fisiológico o patológico. Metabolitos, hormonas y moléculas señalizadoras son productos finales de la expresión génica, por lo que definen el fenotipo bioquímico de una célula, organismo o tejido. Por tanto, es indispensable tener un conocimiento pleno de la metabolómica para comprender mejor el vínculo entre el genotipo y el fenotipo.²

Los avances que se están dando en la resolución espacial de técnicas como la espectrometría de masas (MS), junto al desarrollo de software quimiométrico, permiten determinar y comparar, simultáneamente, miles de componentes bioquímicos. Además, la revolución de la manera en la que se visualizan y estudian los procesos biológicos está facilitando el estudio de distintos organismos y tejidos. Recientemente, el Grupo de Espectroscopía de la universidad del País Vasco (UPV/EHU) ha caracterizado el riñón mediante el estudio de su perfil lipídico.^{3,4} El presente trabajo busca continuar con dicha caracterización, expandiendo el estudio a la pelvis renal y las vías urinarias (uréter y vejiga).

1.1. HISTOLOGÍA BÁSICA DE LA PELVIS RENAL Y VÍAS URIARIAS

La pelvis renal, los uréteres y la vejiga conducen y almacenan durante un tiempo la orina producida en los riñones. La pared mucosa que recubre estas estructuras está formada por un epitelio de transición o urotelio y por una lámina propia de tejido conjuntivo. El urotelio es una capa de varias células (epitelio estratificado), y el tejido conjuntivo de la lámina propia puede variar de laxo a denso en el espesor de la pared en función de la densidad de fibras de colágeno.⁵

Por otro lado, la capa muscular propia (musculatura lisa) está constituida por una capa externa circular y una interna longitudinal, aunque sin una definición clara. Según se avanza en las vías, en la última porción del uréter aparece también una capa longitudinal externa. En la vejiga

puede encontrarse, además, una capa muscular de la mucosa, que se separa de la mucosa propia por el tejido conjuntivo colagénico de la lámina propia.⁵

1.2. LIPIDÓMICA

Distintos autores han descrito la Lipidómica como el estudio de la estructura y función de todos los lípidos sintetizados por una única célula u organismo determinado, así como sus interacciones con otros lípidos, metabolitos y proteínas.^{6,7}

Los lípidos son anfipáticos en su mayoría, aunque no están exentos de excepciones: algunos glicerol (como los diacilglicerol o triacilglicerol), ceramidas, ceras y ésteres de colesterol son hidrofóbicos. Formados principalmente por cadenas hidrocarbonadas, constituyen la base funcional y estructural de las células vivas.⁶ Estudios sobre genética, biología celular y bioquímica han ayudado a comprender mejor la biología de estas biomoléculas:⁸ actúan como membrana celular delimitando la célula en el medio extracelular, su oxidación produce una gran cantidad de energía y participan en procesos reguladores autocrinos, paracrinos y endocrinos como especies señalizadores. Es decir, están involucrados en todos los procesos fundamentales de la célula: estructurales, de almacenamiento energético, señalización y transporte.⁸

Según su estructura química, los lípidos se dividen en ocho grupos principales: ácidos grasos, glicerolípido, glicerofosfolípido, policétido, prenoles, sacarolípido, esfingolípido y esterol (Tabla 1).⁹ En este estudio se analizarán los glicerofosfolípido y esfingolípido.

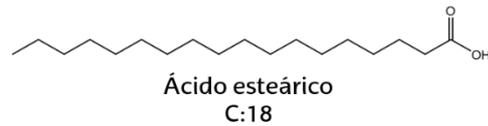
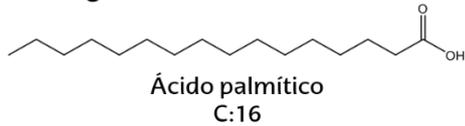
Tabla 1.- Clasificación de las familias lipídicas en función de su estructura química, abreviaturas en inglés y principales funciones biológicas. Adaptado de (9).

Familias lipídicas	Abreviatura	Función principal
Ácidos grasos	FA	Componentes de lípidos complejos
Glicerolípido	GL	Almacenamiento energético
Glicerofosfolípido	GP	Lípidos señalizadores y estructurales
Policétido	PK	Precusores de otras moléculas, antimicrobianos
Prenoles	PR	Precusores de vitaminas, transporte celular, antioxidantes
Sacarolípido	SL	lípidos estructurales
Esfingolípido	SP	Reconocimiento celular y transducción de señales
Esterol	ST	lípidos señalizadores y estructurales

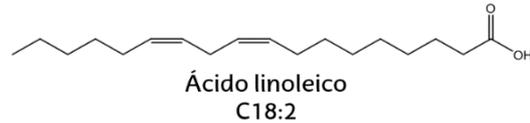
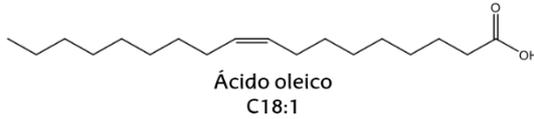
1.2.1. Ácidos Grasos (FA)

Son, comúnmente, los principales componentes de lípidos más complejos.¹⁰ Distribuidos en 14 subclases, los más comunes, en mamíferos, son aquellos que presentan un ácido carboxílico unido a una cadena hidrocarbonada par, alifática e hidrofóbica, con un número de insaturaciones comprendido entre 0 y 6, que no presenta ramificaciones¹¹. La Figura 1 muestra algunos de los FA característicos de los mamíferos.

A. Ácidos grasos saturados



B. Ácidos grasos mono y diinsaturados



C. Ácidos grasos poliinsaturados

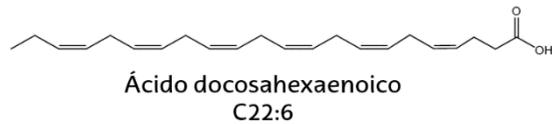
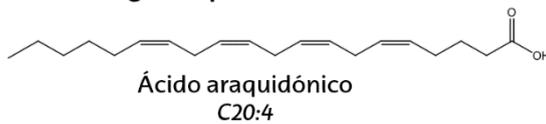


Figura 1.- Ejemplos de ácidos grasos comunes en células de mamífero. **A.-** FA saturados: ácido palmítico (C:16) y esteárico (C:18). **B.-** FA mono y diinsaturados: ácido oleico (C18:1) y linoleico (C18:2). **C.-** FA poliinsaturados: ácido araquidónico (C20:4) y docosahexaenoico (C22:6). Tomando el ácido oleico como ejemplo, la nomenclatura C18:1 indica que su cadena hidrocarbonatada tiene 18 átomos de carbono y que presenta 1 insaturación. Imagen adaptada de (12).

1.2.2. Glicerofosfolípidos (GP)

Son el componente principal de la membrana celular. Están formados por un esqueleto de glicerol que presenta, generalmente, cadenas saturadas en la posición sn-1, cadenas con un número variable de insaturaciones en la posición sn-2 y una cabeza hidrofílica en la posición sn-3. La unión entre la posición sn-1 y la cadena de la posición sn-2 puede darse mediante un enlace éster, éter (o) o vinil-éter (P). El grupo funcional unido en la posición sn-3 indicará la subclase glicerofosfolipídica¹³, tal y como se muestra en la Figura 2.

Los GP más abundantes en mamíferos son las glicerofosfoetanolaminas (PE), glicerofosfoinositoles (PI), glicerofosfogliceroles (PG), glicerofosfoserinas (PS) y glicerofosfocolinas (PC), constituyendo estas últimas el 50% de la masa total de los GP.¹³

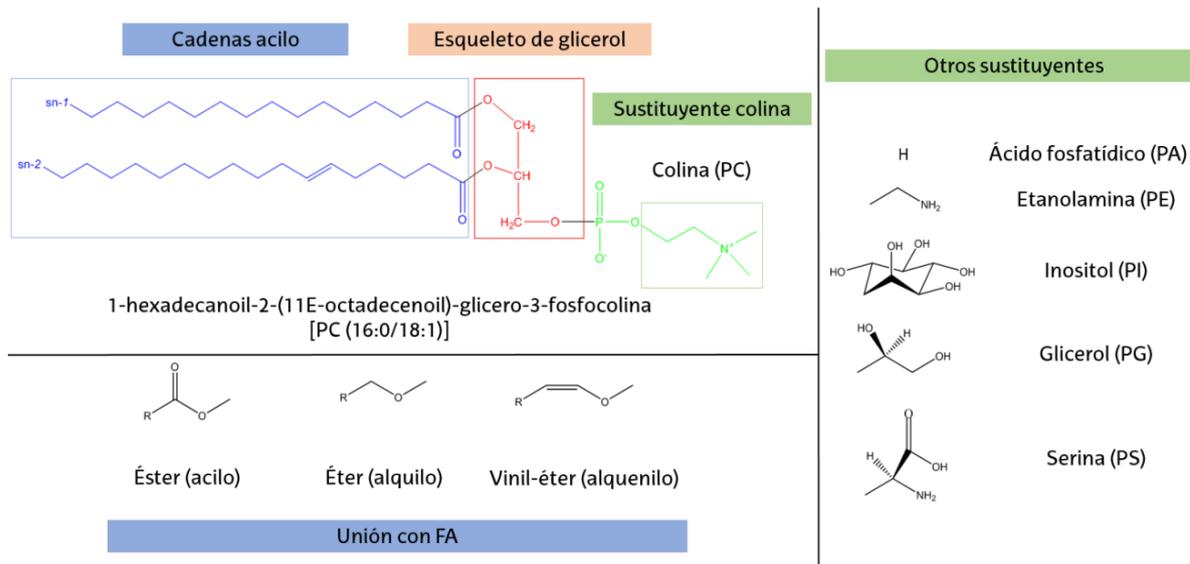


Figura 2.-Estructura de los glicerofosfolípidos. Teniendo como ejemplo una glicerofosfocolina: puede observarse el esqueleto principal de glicerol (rojo), al que se han unido dos ácidos grasos, en la posición sn-1 (16:0) y sn-2 (18:1) (color azul) y un grupo colina en la posición sn-3 (verde). En función del sustituyente se forman distintos GP. La diversidad de las subclases de esta familia de lípidos es relativamente elevada, si se tienen en cuenta las tres posibles uniones entre los ácidos grasos y el esqueleto del glicerol. Imagen adaptada de (12).

1.3.3. Esfingolípidos (SP)

Los esfingolípidos desempeñan funciones tales como la modulación de la fosforilación y acetilación de proteínas transcriptoras, como proteínas represoras o reguladoras (es decir, regulación de proceso de expresión génica)¹⁴. Por ello, son esenciales en el reconocimiento celular y en la transducción de señales. Están compuestos por un una base esfingoide, destacando en mamíferos la esfingosina y la esfinganina (dihidroesfingosina), de cadenas de 18 carbonos.¹⁴

Las ceramidas (Cer), conocidas como las precursoras de las demás especies esfingoides, se forman cuando un ácido graso se une por un enlace amina en la posición sn-2. Su fosforilación y posterior unión con colinas produce los esfingolípidos más abundantes de la membrana celular: las esfingomielinas (SM); mientras que su unión con azúcares forma cerebrosidos (HexCer).¹⁵ En la Figura 3 se muestra un esquema de la estructura de los SP.

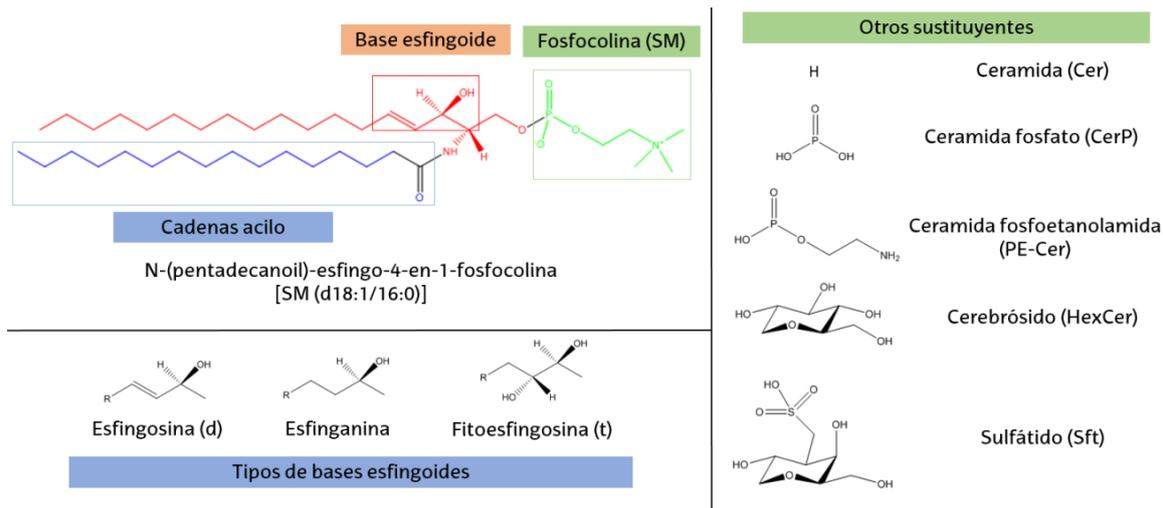


Figura 3.- Estructura de los esfingolípidos. Sirviendo de ejemplo una esfingomielina, se aparecía una base esfingoide (rojo) que puede presentar distintas hidroxilaciones. En función del sustituyente en la cabeza (verde) se forman distintos esfingolípidos. Imagen adaptada de (12).

La importancia de los lípidos en la vida de las células, y su implicación directa en multitud de procesos celulares, está contribuyendo al desarrollo de técnicas que permitan estudiarlos de forma exhaustiva. El empleo de la espectrometría de masas para el estudio de la lipidómica ha ido en aumento a lo largo de la última década, en gran medida gracias a los avances de resolución espacial que se están teniendo lugar alrededor de esta técnica.^{1,16,17}

1.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)

Esta técnica analítica permite la identificación de especies moleculares, a partir de su relación masa/carga (m/z). Para ello, las muestras deben transferirse a fase gas e ionizarse. La detección y cuantificación de estas especies gaseosas permite obtener un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las mismas en función de su m/z .¹⁸ Este análisis se lleva a cabo mediante un espectrómetro de masas, siendo sus componentes principales la fuente de iones y el analizador de masa, pues son aquellos que definirán la resolución espacial y la sensibilidad de los experimentos, respectivamente.

1.5. FUENTES DE IONES

Por lo general, las fuentes de iones se agrupan en fuentes de ionización *duras*, como el impacto electrónico, o fuentes de ionización *blandas*, como la ionización química. La elección del tipo de fuente determinará la resolución espacial y el número de biomoléculas que pudieran ser identificadas.¹⁹ Al emplear fuentes de ionización duras se generan multitud de fragmentos que se traducirán en un espectro de masas complejo de analizar. Por el contrario, los espectros obtenidos empleando una fuente de ionización blanda son más sencillos, facilitando su análisis. El método de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI) es uno de los más populares, gracias su capacidad de transferir a fase gas biomoléculas de bajo y alto peso molecular, la sencillez de la preparativa de la muestra y la robustez frente a sales e impurezas.²⁰

1.5.1 Desorción/Ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI)

La desorción/ionización por láser (LDI) emplea radiación láser ultravioleta (UV) o infrarrojo (IR) para desorber los compuestos de la muestra analizada *in situ*. Consiste en la co-cristalizar la

muestra con una sustancia orgánica con bandas de absorción en la longitud de onda de emisión de un láser. Al incidir éste sobre la muestra, vaporiza la matriz liberando, intactas, las moléculas del analito. Además, si se emplea una matriz ácida (polaridad positiva) o básica (polaridad negativa), se consigue que los analitos queden cargados y listos para su análisis.¹⁹

La co-cristalización de matrices orgánicas junto a las muestras facilita la transferencia de iones a fase gaseosa evitando, durante el proceso, la fragmentación de las biomoléculas, en la medida de lo posible. Es por ello que, actualmente, MALDI es el método LDI con mayor desarrollo y uso. El haz láser incide sobre la matriz, y se produce una transferencia de energía hacia la muestra, cargando las moléculas y generando aductos (especies sodiadas, potasiadas, etc.) tal y como puede verse esquematizado en la Figura 4.²⁰

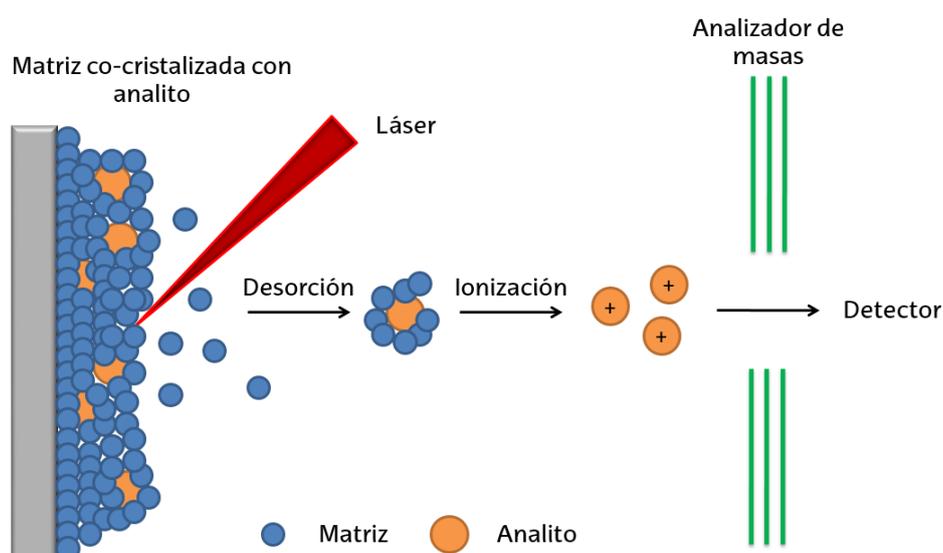


Figura 4.- Esquema del proceso de ionización blanda obtenido mediante MALDI. Adaptado de (12).

Una de las ventajas que presenta MALDI frente a otro tipo de ionizaciones blandas, como puede ser la de electrospray (ESI) es que no es común que los analitos ionizados presenten más de una carga (tanto positiva como negativa), por lo que la simplicidad del espectro es aún mayor. Sin embargo, la técnica no está exenta de inconvenientes. Y es que la matriz orgánica también se fragmenta, por lo que, si no se realiza un buen procesado de datos, los fragmentos generados de la matriz podrían enmascarar los analitos de interés por supresión iónica.²⁰

1.5.2 MALDI-IMS

En este trabajo se ha utilizado uno de los avances más innovadores de la Espectrometría de masas, denominada Imagen por Espectrometría de Masas (IMS), o ILEM en este caso (Imagen de Lípidos por Espectrometría de Masas). Esta técnica permite identificar biomoléculas *in situ* en un tejido aportando, además, información relevante sobre su disposición espacial a lo largo de la muestra, con una resolución espacial comprendida entre tres y 200 μm .²⁰ Aprovechando la capacidad de reconstrucción de las distribuciones de los analitos de interés que ofrece MALDI, es posible añadir una nueva dimensión a la información generada durante un experimento de MS, siendo posible alcanzar resoluciones subcelulares.^{20,21}

Además de no requerir marcado previo de las muestras (a diferencia de otros análisis como los inmunohistoquímicos), la preparación de muestra es mínima si se compara con técnicas más tradicionales empleadas en bioanálisis.¹⁹ Un experimento ILEM genera un mapa de distribuciones de todas las moléculas detectadas en el área explorada. Respetando una separación espacial mínima entre espectros, es posible obtener la distribución espacial, en dos dimensiones, de las especies moleculares a lo largo del tejido. Aplicado al estudio de las vías urinarias, es posible identificar distintas regiones histológicas del riñón en base a la composición lipídica de sus estructuras (Figura 5).

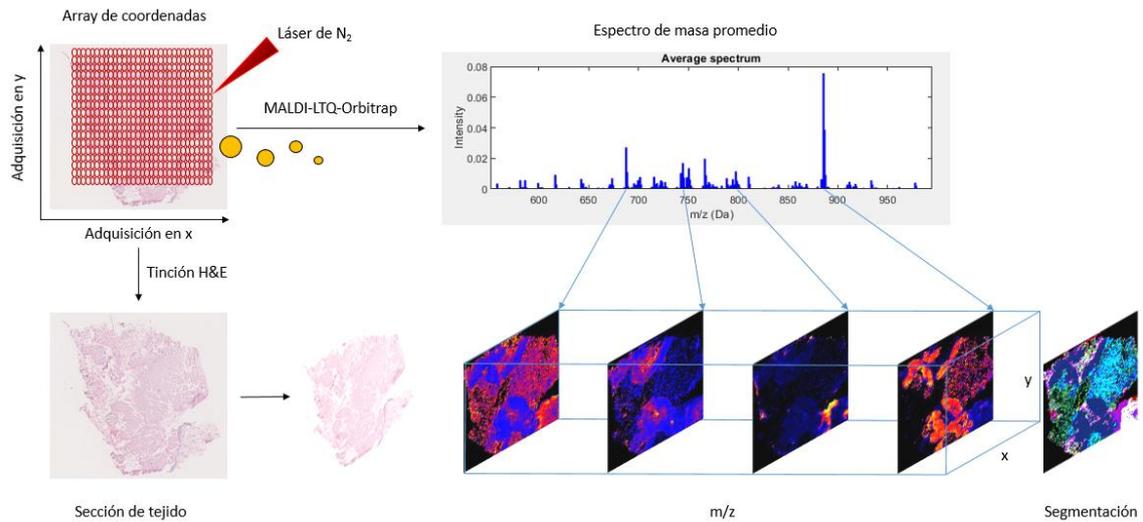


Figura 5.- Esquema del análisis de datos en un experimento ILEM. Se define el área a explorar una vez depositada la matriz sobre la muestra, obteniéndose un espectro en cada punto. Cada m/z en el espectro se convierte, mediante el uso de software adecuado, en la imagen de la distribución de una molécula (lípidos en este caso). Finalmente, se tiñe el tejido y mediante información óptica y análisis estadístico es posible identificar y comparar distintas regiones de interés, pudiendo generar modelos de clasificación e identificar biomarcadores de diversas patologías.

1.6. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La correcta preparación de las muestras es imprescindible si se quiere obtener una imagen con una gran resolución espacial. En este tipo de ensayos la matriz ha de formar cristales de aproximadamente una micra, depositarse de forma uniforme a lo largo de la muestra y permitir obtener la máxima intensidad de señal.²²

En este sentido, el 1,5-diaminonaftaleno (DAN, Sigma-Aldrich Chemie, Dteenheim, Germany, (Figura 6) ha demostrado, en estudios anteriores, ser una matriz óptima para la detección de lípidos en el modo de ionización negativo.²² Permite detectar múltiples familias lipídicas con una alta resolución espacial y bajo ruido de fondo dotando a las muestras, además, de la estabilidad necesaria para soportar tiempos de adquisición de datos elevados.

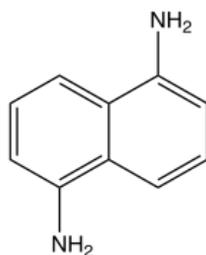


Figura 6.- Estructura de la matriz orgánica empleada durante el estudio, 1,5-diaminonaftaleno; masa exacta: 158.0844 Da.

Una correcta preparación de muestra también requiere de una adecuada deposición de la matriz sobre el tejido a analizar. Estudios realizados previamente por el Grupo de Espectroscopía de la UPV/EHU, han demostrado que el proceso de sublimación es el más adecuado para este fin, pues permite optimizar, de forma más controlada, la cantidad total de matriz que se deposita sobre la muestra.²³ Es más, permite alcanzar resoluciones espaciales mayores en comparación con las obtenidas empleando otras técnicas como el esprayado. Esto se debe a que el proceso de sublimación no requiere del uso de disolventes orgánicos, por lo que se omiten posibles interacciones no deseadas, como la migración de los lípidos.²⁴

1.7. ANALIZADOR DE MASAS

Como se ha indicado con anterioridad, uno de los mayores inconvenientes de la ILEM es la presencia de iones de bajo peso molecular (<500 Da) correspondientes a la matriz, pues interfieren en la detección de los iones de interés. Por ello, es imprescindible que el espectrómetro de masas presente un analizador de masas con alta sensibilidad y resolución en masas. Los primeros analizadores de masas empleados en ILEM fueron los detectores de tiempo de vuelo (TOF),²⁵ y hoy en día se complementan con analizadores de trampa iónica como el Orbitrap, ampliamente utilizado en estudios lipidómicos, gracias a su elevada resolución de masas.²⁶

El analizador Orbitrap está formado por un electrodo inerte rodeado por dos electrodos cóncavos, entre los cuales se genera un campo eléctrico. Cuando los iones pasan a través de la trampa iónica, se mantienen en orbitación, oscilando axialmente alrededor del electrodo inerte. Las frecuencias orbitales de los iones son proporcionales a su $(m/z)^{1/2}$, por lo que variarán en función de la relación m/z de las especies. Una vez detectadas, se genera un espectro de frecuencias del que se pueden extraer las relaciones m/z mediante transformada de Fourier (FT), obteniendo así un espectro de masas (Figura 7).²⁷

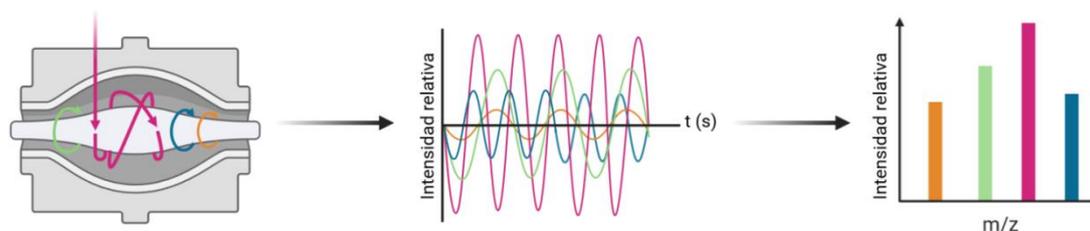


Figura 7.- Analizador de masas FT Orbitrap. Los iones generados durante la desorción/ionización de la matriz entran a la trampa iónica de forma tangencial. En su interior, oscilan proporcionalmente a su relación $(m/z)^{1/2}$. Haciendo la FT del orbitograma, se obtiene un espectro de frecuencias, y de ahí, el espectro de masas.

Una de las ventajas que presentan los detectores Orbitrap es que, gracias a su elevada resolución másica, son capaces de obtener la composición elemental de los iones detectados. Sin embargo, los archivos de datos generados en los experimentos pueden aumentar su tamaño en gran medida; ello dependerá de la resolución y del rango de masas empleando durante el análisis.

1.8. SEGMENTACIÓN

Una de las grandes ventajas que presenta la ILEM, sobre otras técnicas, es la posibilidad de representar las distintas especies detectadas. Es más, el uso de algoritmos de agrupamiento jerárquico, que permiten organizar los píxeles generados en función de la similitud de los correspondientes espectros, posibilita identificar las estructuras con una huella lipídica similar, reproduciendo la arquitectura del tejido.

El método de segmentación *k-means* agrupa el conjunto de datos en un número prefijado de segmentos (clústeres). En este trabajo se ha empleado una variante, desarrollado por el Grupo de Espectroscopía, de este algoritmo de segmentación: el Análisis Divisivo Jerárquico de Rango Completo (HDC-RC).²⁸ Este algoritmo permite agrupar los píxeles en regiones con una huella lipídica similar, que posteriormente se identifican con las distintas áreas histológicas del tejido.

En primera instancia, el experimento se divide en dos segmentos diferentes a partir de aquellos píxeles con menor correlación entre sí. El proceso se repite sucesivamente hasta alcanzar el número de segmentos definido para cada experimento. La correlación de los clústeres se visualiza en base a una escala de color: cuanto más próximos están los colores entre sí en la escala cromática, mayor es la similitud entre las huellas lipídicas de las áreas.

El número máximo de segmentos que se suele emplear es de 300, pero ha de tenerse en cuenta que, lo ideal, es trabajar con el menor número de clústeres posibles a la hora de seleccionar las regiones histológicas, con ayuda de los patólogos. Ello se debe a que, al aumentar el número de segmentos, pueda estar forzándose al algoritmo a realizar segmentaciones que verdaderamente no existen, pudiendo estar distorsionándose la estructura real del tejido.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es el análisis del perfil lipídico de la pelvis renal, uréteres y vejiga humana mediante ILEM. Se busca completar la caracterización lipídica del sistema urinario, nunca antes realizada e iniciada recientemente con la caracterización de la nefrona,^{3,4} como paso previo para un posterior estudio metabólico más amplio que involucre el estudio de los tumores que se originan en estas estructuras. También, y con el objetivo de acercar la técnica a los laboratorios de nuestros hospitales, se pretende estudiar el potencial de la ILEM como herramienta de apoyo en el diagnóstico anatomopatológico de lesiones neoplásicas y no neoplásicas de riñón y vías urinarias.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE UROTELIO Y PÉLVIS HUMANAS

La recogida de las muestras para este estudio tiene el aval del Comité de Ética de Euskadi (CEIm 20-19, código interno: PI+Ces-BIOEF 2020-12)

Las muestras fueron seleccionadas y recogidas en el Hospital Universitario de Galdakao-Usansolo. Los pacientes presentaban tumores renales y de vías urinarias, cuyos tejidos no

tumorales también se guardaron (en fresco) para estudios descriptivos como el que se presenta en este TFM.

Se realizaron cortes histológicos, de 10 μm de espesor, de tres pelvis, un uréter y una vejiga para su posterior análisis por ILEM, así como para su tinción por hematoxilina-eosina y posterior estudio histológico.

3.2. SUBLIMACIÓN DE LA MATRIZ

El sublimador empleado a lo largo del estudio ha sido creado y diseñado por el propio Grupo de Espectroscopía de la UPV/EHU.²⁹ Contiene en su interior una placa calefactora, unida a un termopar, sobre el que se deposita la matriz. El portaobjetos se coloca sobre una placa en contacto con una célula *Peltier*, que será la encargada de mantener la temperatura de la muestra a 5°C. Una vez cerrado el sublimador, la muestra queda dispuesta a 1 cm de distancia sobre la matriz. Entonces, el sistema se conecta a una bomba de vacío (Pfeiffer Vacuum, model DUO 2.5, Germany) y se fija una presión de 0.1 mbar. Finalmente, el sistema se conecta, durante ocho minutos, a una fuente de calor a 123°C. En la Figura 8 se muestran los componentes del sublimador.

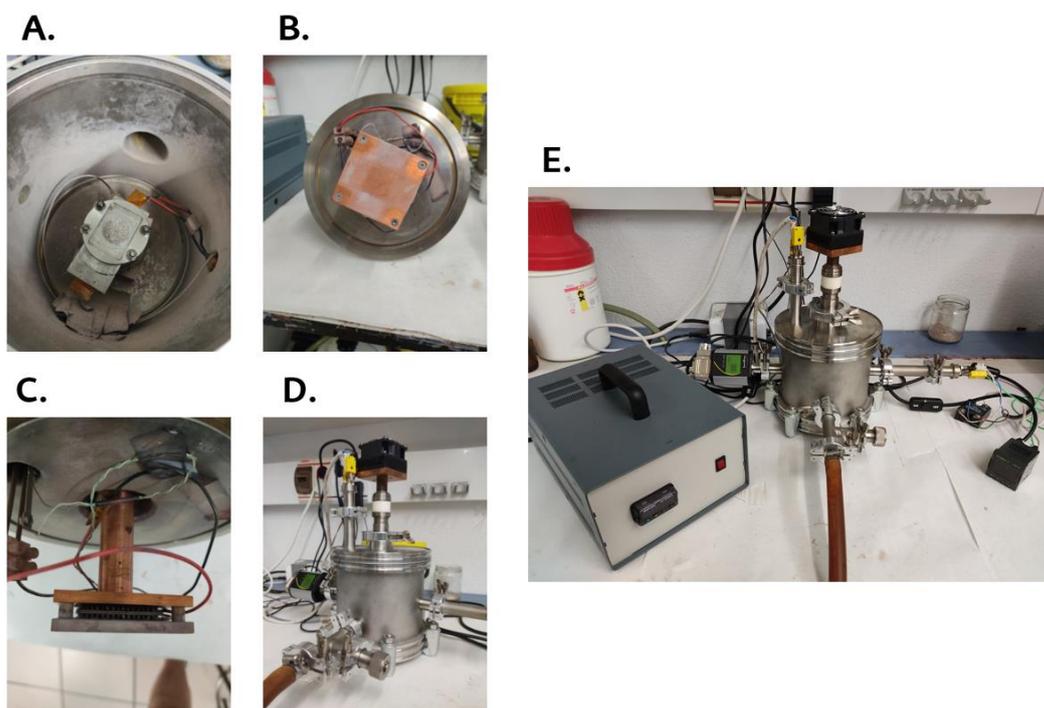


Figura 8.- Componentes del sublimador desarrollado por el Grupo de Espectroscopía: **A.-** Placa calefactora sobre la que se deposita la matriz; por debajo de ella se encuentra el termopar que controlará su temperatura. **B.-** Placa sobre la que se sujeta la muestra con el tejido que desea sublimarse. **C.-** Vista lateral de la placa observada en B; está unida a dos células *Peltier* que enfriarán la muestra; están conectadas a un segundo termopar que indicará su temperatura. **D.-** Imagen del sublimador cerrado. **E.-** Sistema completo, el sublimador está unido al sistema *Peltier*, a una bomba de vacío y al sistema de calefacción, respectivamente. Imagen adaptada de (12).

Las condiciones de distancia entre la muestra y la matriz, la presión y la temperatura empleadas han sido optimizadas para depositar, aproximadamente, 0.15 mg/cm^2 de DAN sobre las muestras. Estudios previos han demostrado que ésta es la cantidad de matriz óptima para alcanzar la mejor resolución espacial posible.²³

3.3. ANÁLISIS ILEM

Los experimentos de ILEM se realizaron empleando un MALDI-LTQ-Orbitrap XL (ThermoFischer, Figura 9), equipado con un láser de N_2 .³⁰ Se trabajó con el espectrómetro en modo Orbitrap, en polaridad negativa. La adquisición de datos se llevó a cabo a una resolución en masas de 60000 a una $m/z = 400 \text{ Da}$, en un intervalo comprendido entre los 550-1000 Da, empleando una resolución espacial de $50 \mu\text{m}$. El registro de medidas se hizo con dos microescáneres de 10 disparos láser (20 disparos en total) para cada pixel, con una energía de $15 \mu\text{J}$ y un tamaño de pixel de $50 \mu\text{m}$.



Figura 9.- MALDI-LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) empleado para la adquisición de datos.

3.4. TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E)

La obtención de imágenes de tinción es imprescindible para identificar y comparar distintas áreas del tejido en un estudio histológico. Por ello, tras el experimento de ILEM las muestras se limpiaron para una posterior tinción de hematoxilina y eosina (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Resumiendo, las muestras se sumergieron en etanol al 70% durante aproximadamente 1 minuto, eliminando de este modo la matriz de la superficie del tejido. Tras un proceso de hidratación mediante baños consecutivos empleando un gradiente etanol/agua, los tejidos se sumergieron en baños de hematoxilina y eosina durante cinco y dos minutos, respectivamente. A continuación, se llevó a cabo la deshidratación mediante baños sucesivos empleando un gradiente que comienza con agua y finaliza con etanol 100%. Finalmente, se montaron los portas empleando ftalato de dibutilo en xileno (DPX) y se limpiaron con un poco de etanol puro.

La hematoxilina tiñe de color azul oscuro/violeta los ácidos nucleicos (el núcleo), mientras que la eosina tiñe de color rosado/rojizo especies básicas inespecíficamente (citoplasma y matriz

extracelular). Las muestras se escanearon en el PIE (Plentzia Marine Station, UPV/EHU, Plentzia, Bizkaia) mediante un escáner NanoZoomer S210 Digital.

3.5. PROCESADO DE DATOS

A pesar de que el tratamiento de muestra es relativamente sencillo en comparación con otras técnicas, los estudios realizados por ILEM generan una cantidad inmensa de datos que deben ser tratados, comenzando con disminución de su tamaño, extrayendo la información más relevante. Para ello, se realiza una rutina que extrae la posición de los picos de los espectros a cada pixel.³¹

El procesado de datos consiste en una obtención inicial del espectro promedio, seguido de la segmentación de la imagen en áreas con huella lipídica similar (*clustering*); la asignación lipídica y el estudio de su distribución a lo largo del tejido y, finalmente, el tratamiento estadístico de los datos extraídos. Desafortunadamente, el número de muestras obtenido no permite un tratamiento estadístico riguroso de los resultados.

3.5.1. Obtención del espectro

Inicialmente, se extrae la información de cada uno de los píxeles generados durante el experimento de ILEM, éstos serán los que conformen el espectro final. La selección de picos se lleva a cabo empleando el método *Simple Peak Finding* (SPF).³² Los espectros generados han sido procesados empleando un software propio, desarrollado sobre *Matlab* (MathWorks, Natick, USA).

Durante la selección de picos se aplica una ventana de 0.02 Da para la separación entre picos cuando se están extrayendo los datos. A continuación, y con el objetivo de disminuir el tamaño de los archivos generados, se eliminan aquellos picos que presentan una intensidad relativa inferior al 0.5% respecto al más intenso. Este proceso se realiza para cada uno de los espectros obtenidos. Los espectros reducidos se alinean, tolerando una desalineación máxima entre picos de 0.02 Da. Finalmente, los espectros son normalizados (por cada experimento) empleando un algoritmo de corriente total de iones (TIC).³³

3.5.2. Segmentación

La segmentación de los píxeles se llevó a cabo utilizando el algoritmo HDC-RC previamente descrito. La identificación de los segmentos con los diversos tipos de tejido de las muestras se llevó a cabo con la ayuda de las observaciones anotadas por el doctor Jon Danel, patólogo del Hospital Universitario de Donosti.

3.5.3. Asignación lipídica

La asignación de lípidos se llevó a cabo comparando los valores de m/z experimentales con las masas teóricas de las especies recogidas en el software desarrollado por el Grupo de Espectroscopía, que cuenta con una base de datos generado *in silico* con más de 33000 especies lipídicas y correspondientes aductos. También se hizo una comparación con la base de datos de LIPIDS MAPS (www.lipidmaps.org).

Hay que tener en cuenta que los lípidos son biomoléculas que tienden a formar aductos. Además, son moléculas lábiles, propensas a fragmentarse con facilidad generando aductos menos evidentes que pueden interferir con las señales de los lípidos de interés. Por ello, es

necesario realizar espectrometrías de masas en tándem (MS/MS o MS/MS²), fragmentando iones específicos en una sección del tejido para obtener información adicional sobre la estructura molecular.

Aun así, no es posible diferenciar entre los enlaces éter y vinil-éter (O/P) que presentan los glicerofosfolípidos; ni distinguir las glicerofosfolípidos (PCs) de las gliceroetanolaminas (PEs), especies isobaras (sería necesario realizar un MS/MS³). Estudios previos realizados por el Grupo de Espectroscopía³⁴ han concluido que, empleando el modo de ionización negativo, las PE se detectan con mayor intensidad. Así mismo, parece ser que las especies PE-P y PC-O tienen una mayor abundancia relativa en mamíferos, respecto a sus especies isobaras.^{35,36} Independientemente de ello, no puede descartarse con total seguridad la presencia de las otras especies.

3.5.4. Análisis estadístico

A pesar de no haberse obtenido un número de muestras suficiente para realizar un análisis estadístico de los resultados, sigue siendo necesario realizar un filtrado de las especies que han sido asignadas.

Para evitar en la medida de lo posible la variabilidad intermuestral, se trabaja únicamente con aquellas especies de lípidos reproducibles en los experimentos. Estas especies han sido seleccionadas atendiendo a la regla del 80%: sólo se tienen en cuenta aquellas especies que estén presentes en al menos un 80% de las muestras analizadas. Realizado el primer cribado, se eliminan del estudio los aductos de la matriz (DAN) y aquellas especies cuya asignación es dudosa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA PÉLVIS RENAL

Se analizaron secciones de pelvis renal de tres pacientes, apreciándose un cambio considerable en la morfología de las muestras, poniendo de manifiesto la necesidad de contar con una cohorte amplia de muestras. En la imagen histológica de la primera de las secciones (Figura 10), destaca un ribete de superficie correspondiente al urotelio, un epitelio transicional especial que recubre la pelvis renal, los uréteres, la vejiga y la uretra. Bajo esta capa se encuentra el estroma subepitelial o lámina propia (epitelial), que muestra una elevada laxitud edematosa. El espesor del tejido colagénico varía en función de la región de la muestra. La compactación de los haces de colágeno aumenta a medida que se adentra en el tejido. Es decir, dentro de esta sección pueden diferenciarse dos regiones, una más compactada y otra más laxa.

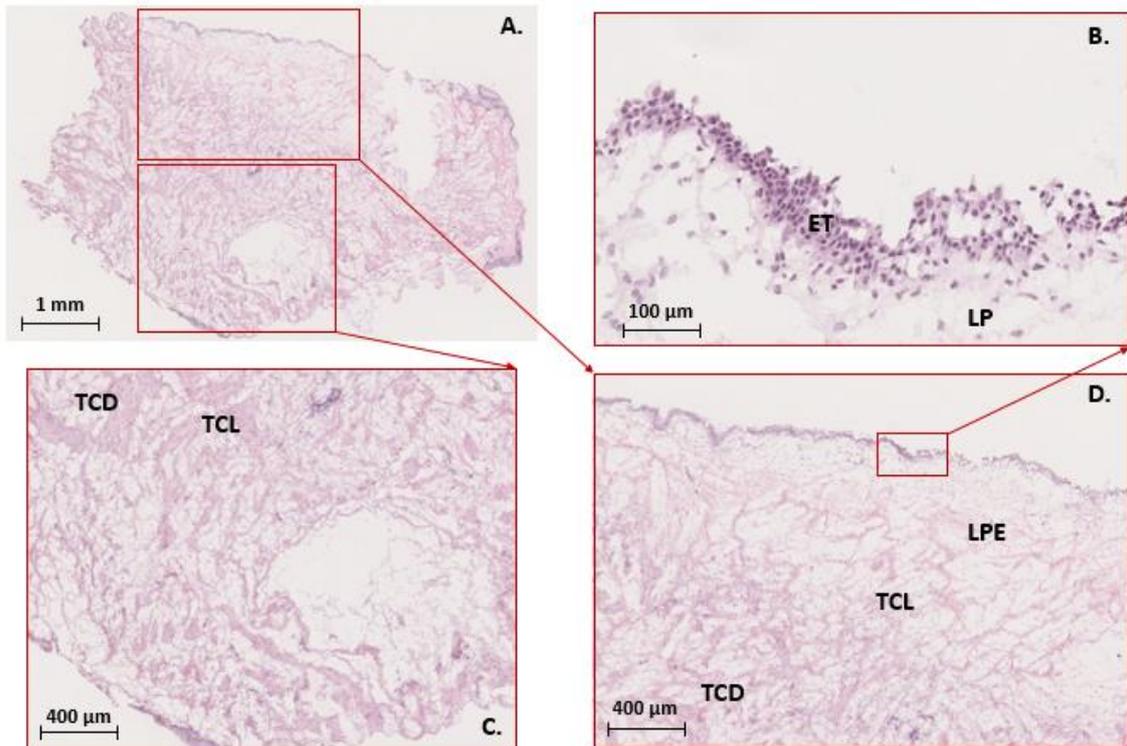


Figura 10.- Detalle de la tinción de H&E. A.- Imagen histológica de la primera sección de pelvis renal; B.- Epitelio estratificado del urotelio (ET) y lámina propia (LP) a 10x; C.- Tejido colagénico (conjuntivo) laxo (TCL) y denso (TCD) a 2.5x, correspondiente a una zona de la lámina propia más compacta; D.- Epitelio transicional (urotelio) y lámina propia edematosa (LPE) (el tejido colagénico laxo evoluciona hacia el denso a medida que se avanza en profundidad) a 2.5x.

Una vez interpretada la imagen histológica, se compararon con la segmentación generada en los experimentos de ILEM. Si bien es cierto que no se ha obtenido una región que correlacione con el urotelio, debido a la resolución espacial empleada, en la Figura 11 se aprecia cómo la segmentación concuerda con las anotaciones indicadas por el patólogo. No solo se han identificado huellas lipídicas diferentes entre la zona de la lámina propia más laxa y la zona de la lámina propia más compacta, sino que, además, existe una subdivisión dentro de ambas zonas que podría coincidir con las zonas más laxas (edematosas) y zonas de mayor compactación del colágeno (denso) dentro de dicho tejido conjuntivo.

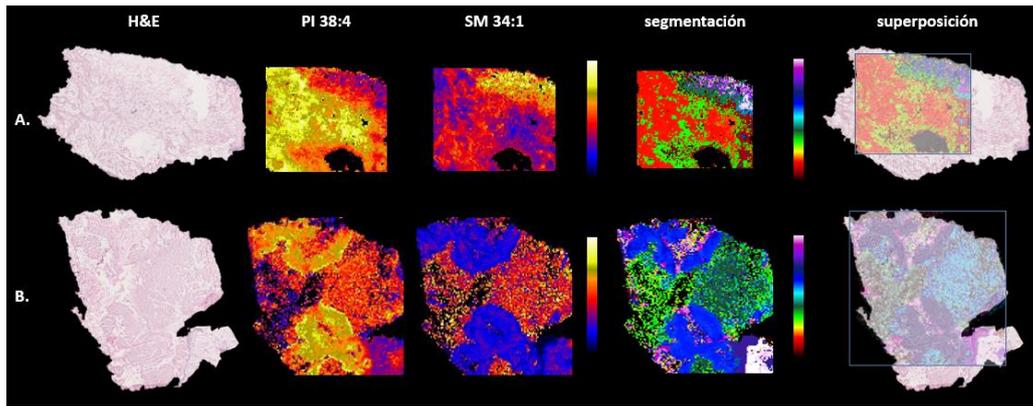


Figura 12.-Tinción H&E, distribución de algunos lípidos a lo largo del tejido, segmentación obtenida mediante ILEM y su superposición con las tinciones en pelvis (A) y vejiga (B). Las distintas distribuciones de los lípidos a lo largo del tejido generan una huella lipídica específica, y el conjunto de estas huellas permite la segmentación del tejido. La primera escala cromática indica la intensidad relativa de las especies, donde el color azul evoluciona hacia el amarillo con el aumento de intensidad. Así, la presencia de PI 38:4 es mayor en el tejido colagénico más compactado en pelvis (A), y mayor en la muscularis mucosae en vejiga (B); por su parte, la SM 34:1 es más abundante en el tejido colagénico más laxo (A) y en el músculo propio (B). La segunda escala cromática indica la correlación entre segmentos, cuanto más alejados los colores entre sí, menor correlación existe entre las huellas lipídicas de los mismos. En la imagen superpuesta se aprecia como la segmentación reproduce a la perfección la estructura del tejido.

En la segunda sección analizada (Figura 13) vuelve a observarse el epitelio transicional y lámina propia con zonas más laxas (13B y 13C) y más densas (13D). Las zonas más compactadas corresponden a tejido colagénico conectivo, aunque cupiera la posibilidad de que se tratase de músculo propio. También se observa una vénula (estructura vascular), aunque lo más destacable son los dos pequeños folículos (agrupaciones) linfoides (13E).

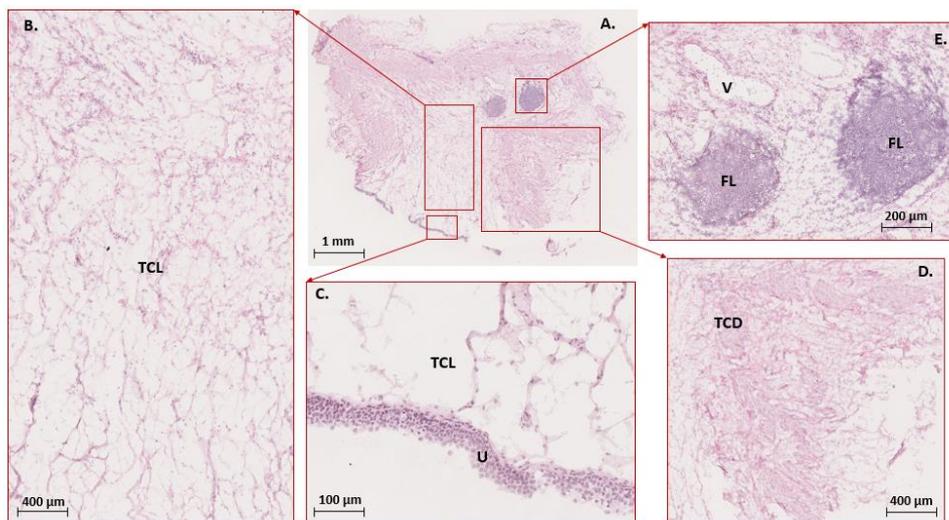


Figura 13.- Imagen histológica de la segunda sección de pelvis. **A.-** Tinción H&E de la segunda sección de pelvis renal **B.-** Tejido conectivo laxo (TCL) de la lámina propia a 2.5x. **C.-** Urotelio (U) y tejido colagénico laxo (TCL) a 10x. **D.-** Tejido colagénico denso (TCD) de la lámina propia. **E.-** folículos linfoides (FL) y vénula (V) a 5x; parecen tratarse de folículos secundarios, donde se aprecia una zona de crecimiento en el centro y un ribete que rodea la estructura.

El tejido linfoide es una organización especial del tejido conjuntivo, integrado por fibras reticulares, fibroblastos y linfocitos en su gran mayoría. Ante una agresión de cualquier tipo, los linfocitos se activan y se agrupan en una disposición esférica u ovoide denominada folículo linfoide. En individuos que no han recibido una estimulación antigénica elevada o no han desarrollado una respuesta inmunológica, los folículos se agrupan en forma de esferas uniformes denominados folículos linfoides primarios. Cuando la estimulación es elevada o se ha producido una respuesta inmunológica se forman folículos linfoides secundarios, una respuesta inmune adaptativa.³⁹

Al igual que en el caso anterior, la segmentación obtenida mediante ILEM describe correctamente la morfología tejido (Figura 14).

Una forma de determinar si las regiones más compactas corresponden a tejido colagénico de la lámina propia o a músculo liso sería aumentar el número de muestras analizadas. Adicionalmente, se podría comparar la huella lipídica extraída del segmento que correlaciona con ese tejido con la huella lipídica de segmentos, de otras muestras, correctamente identificados como tejido colagénico o músculo liso. De este modo podría discernirse, por similitud de huellas lipídicas, entre ambos tipos de tejido.

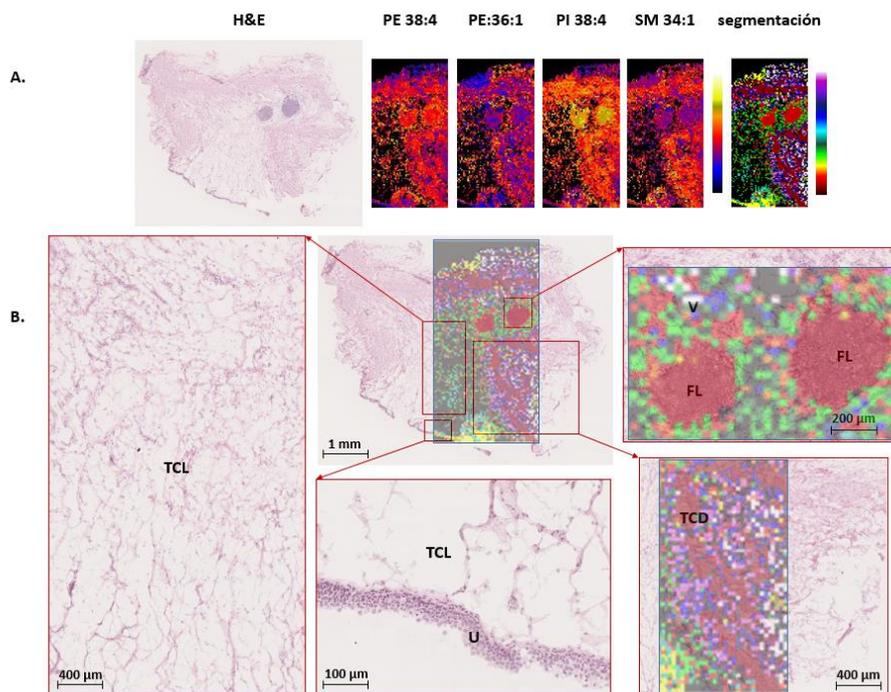


Figura 14.- A.- Tinción H&E de la segunda sección de pelvis, distribución de algunos de los lípidos con mayor intensidad relativa a lo largo del tejido y segmentación obtenida a partir de ellas. B.- Superposición de la segmentación y la imagen histológica. No ha podido identificarse el urotelio (U); y el segmento correspondiente al tejido colagénico laxo (TCL) de la lámina propia no correlaciona adecuadamente, pues la resolución espacial del experimento de ILEM no es suficiente. No obstante, los folículos linfoides (FL) y el tejido conectivo denso (TCD) están bien identificados. Aumentar la resolución del experimento de ILEM permitiría encontrar diferencias entre la zona central y exterior de los folículos.

En la tercera sección de pelvis (Figura 15) se aprecian las mismas estructuras que en el caso anterior: urotelio, lámina propia con tejido edematoso laxo y compacto, y algunas estructuras vasculares.

Lo más relevante del tejido se observa tras la segmentación de ILEM, pues se han detectado unas estructuras circulares que no son visibles en la imagen de tinción H&E (Figura 16).

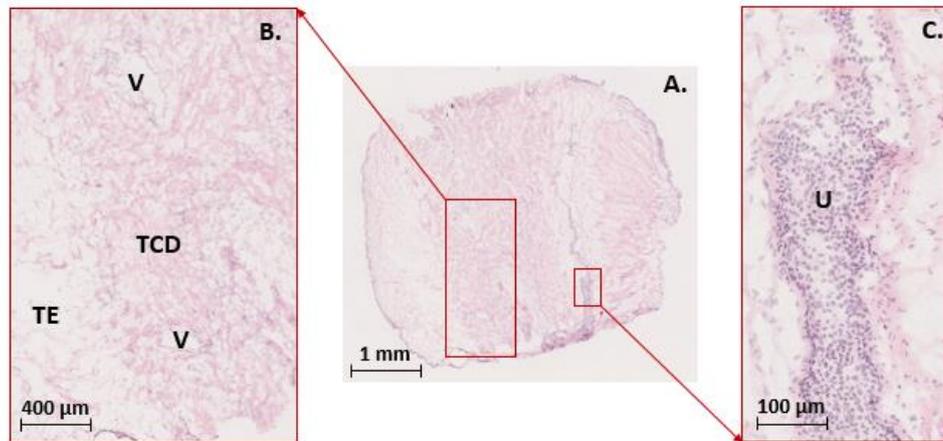


Figura 15.- Imagen histológica de la tercera sección de pelvis. **A.-** Tinción de H&E. **B.-** Tejido colagénico (TC) y tejido edematoso (TE) a 2,5x, se observan dos vénulas (V). **C.-** Urotelio a 10x.

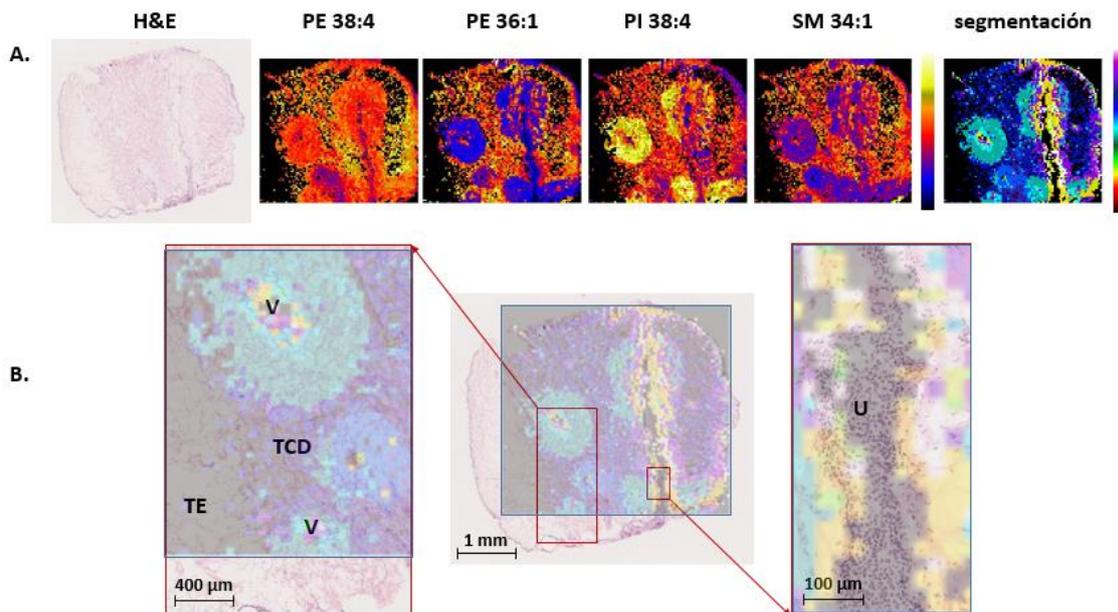


Figura 16.- **A.-** Tinción H&E de la tercera sección de pelvis, distribución de algunos de los lípidos con mayor intensidad relativa a lo largo del tejido y segmentación obtenida a partir de ellas. **B.-** Superposición de la segmentación y la imagen histológica. En esta ocasión sí ha sido posible obtener un segmento, de color marrón oscuro, que correlacione con el urotelio (U). La región del tejido edematoso tiene tan poco tejido que no ha sido posible distinguirlo, a esta resolución, de la matriz. Un segmento de color azul oscuro coincide con las áreas de tejido colagénico denso (TCD). En tonos turquesa y azul claro parecen existir unas estructuras que rodean las vénulas.

En el uréter y, mayoritariamente, en la vejiga, la capa muscular propia que se encuentra entre la mucosa y la adventicia (o serosa) está organizada en tres estratos: las fibras musculares de

dos de los estratos longitudinales interno y externo se disponen de forma longitudinal, siguiendo el tracto del tubo excretor (uréter). Entre ellas, se encuentra el estrato circular medio, una capa de músculo liso dispuesta de forma circunferencial. En conjunto, estas capas forman el músculo detrusor, encargado de expulsar la orina cuando se contrae.^{5, 40}

Cuando el tejido se corta, esa disposición adopta la forma de esfera de haces musculares. En este sentido, es poco probable que en un corte de pelvis se esté observando músculo propio. No obstante, atendiendo a la superposición de las imágenes de la Figura 16, se aprecia una estructura vascular en el centro de estas esferas. Es posible que los segmentos de color azul estén correlacionando con el músculo de la pared venosa, aunque histológicamente esta suposición no es acertada, pues habría demasiado músculo para una vena de pequeño calibre. Sería más correcto pensar que se tratase de la adventicia de la vénula, con mayor compactación colagénica.

Al igual que en los casos anteriores, analizar un número de muestras mayor puede ayudar a discernir entre el tipo de estructuras que se están detectando.

4.2. DESCRIPCIÓN DEL URÉTER

El uréter y la vejiga presentan pequeños cambios anatómicos respecto a la pelvis, siendo el cambio principal la disposición más estructurada del músculo propio⁵. En la imagen histológica se visualiza el ribete urotelial, una zona colagénica laxa que parece estar delimitada por una región que posiblemente sea músculo y un plexo vascular del que puede intuirse una leve pared celular (Figura 17).

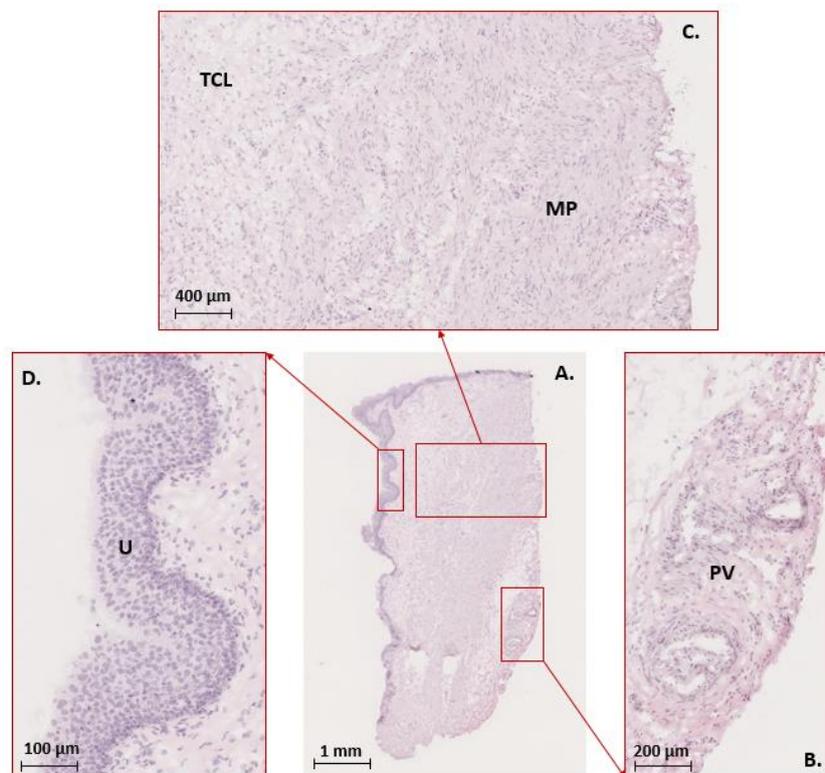


Figura 17.- Imagen histológica de sección de uréter. **A.**- Tinción de H&E. **B.**- plexo vascular a 5x. **C.** Músculo propio (MP) y tejido conjuntivo colagénico laxo (TCL) a 2,5x. **D.**- Urotelio (U) a 10x.

Desafortunadamente, el experimento de ILEM no se ha captado correctamente, por lo que el software no ha sido capaz de segmentar la muestra adecuadamente. Además, no ha sido posible identificar la región correspondiente al urotelio, pues los lípidos se han dispersado y su señal estaba enmascarada por la señal de la matriz.

A pesar de ser necesario repetir el experimento, en la Figura 18 se aprecia una diferenciación de áreas por color. El color naranja parece correlacionar con la zona colagénica, mientras que el área coloreada por violeta, morado y marrón parece coincidir con lo que posiblemente sea musculo del uréter. No solo eso, a pesar de no diferenciarse ningún tipo de estructura, el área más amarillenta pudiera estar indicando la existencia del plexo vascular observado en la tinción de H&E.

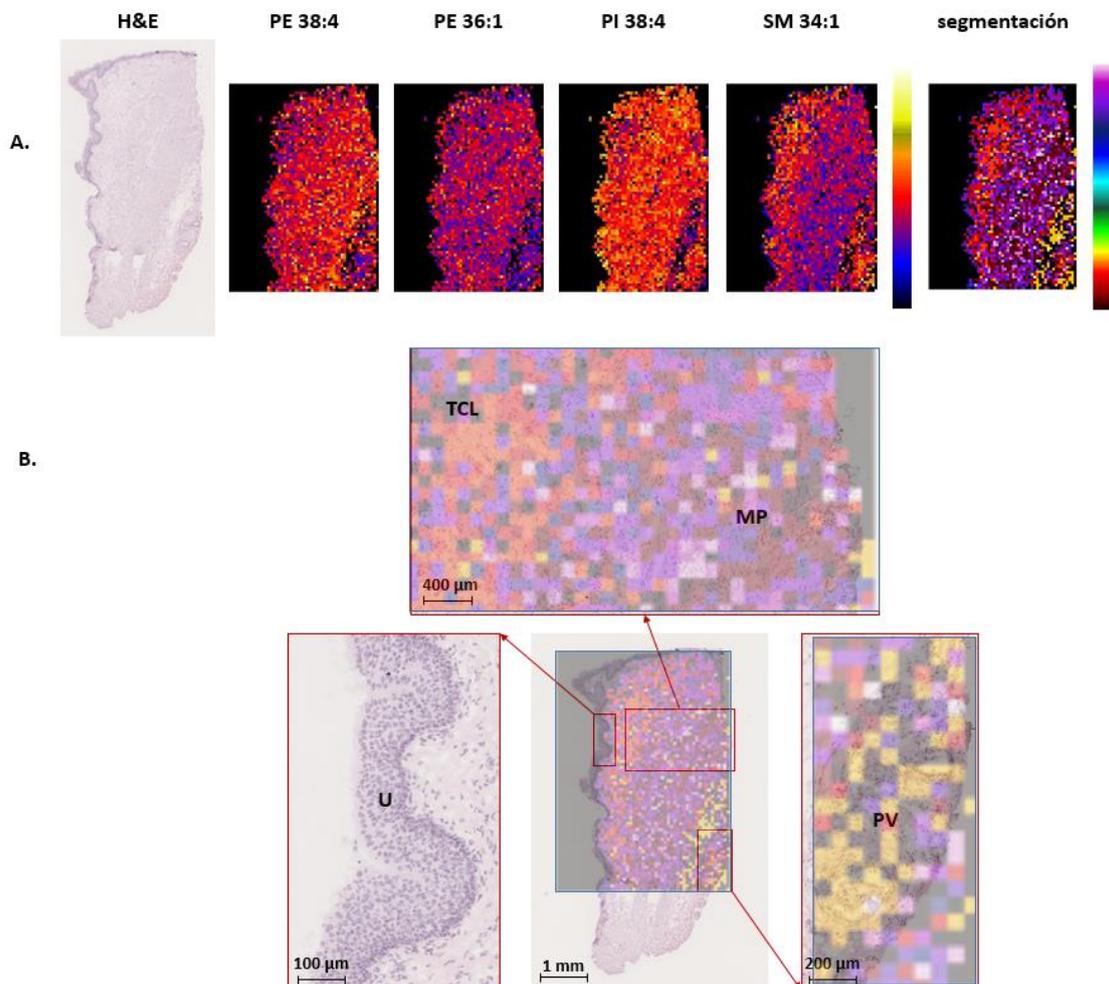


Figura 18.- A.- Tinción H&E de la sección de uréter, distribución de algunos de los lípidos con mayor intensidad relativa a lo largo del tejido y segmentación obtenida a partir de ellas. B.- Superposición de la segmentación y la imagen histológica. A pesar de que la segmentación no se haya realizado correctamente, parece diferenciar entre el músculo propio (MP) de color morado, y el tejido colagénico laxo (TCL), de color naranja. El área más amarillenta también parece estar relacionada con el plexo vascular (PV) observado en H&E.

4.3. DESCRIPCIÓN DE LA VEJIGA

La pared de la vejiga tiene una capa mucosa, con urotelio y lámina propia, una capa muscular propia (músculo detrusor) y una capa serosa que recubre el órgano. La lámina propia puede poseer, en su parte más superficial, fascículos de músculo liso que conforman una capa *muscularis mucosae* en algunas zonas. Esta capa de músculo liso de la mucosa no debe confundirse con la capa muscular propia.⁵

La importancia de las imágenes descritas en este apartado reside en la posible diferenciación entre los haces de músculo liso de la capa muscular de la mucosa (*muscularis mucosae*) y los del estrato del músculo liso propio de la vejiga (músculo detrusor). El estadiaje del cáncer de vejiga se basa en observar cómo las células tumorales infiltran la mucosa y si alcanzan o no la capa muscular propia,^{41,42,43} tal y como puede verse en la Figura 19. Ello afecta a las decisiones terapéuticas que deben tomarse. La diferenciación entre las fibras de la capa muscular de la mucosa y de la muscular propia sigue estando necesitada de biomarcadores y mejoras en las técnicas de imagen.⁴⁴ Por ello, es necesario que métodos como la ILEM ayuden a diferenciar mejor estas estructuras de la pared de la vejiga.

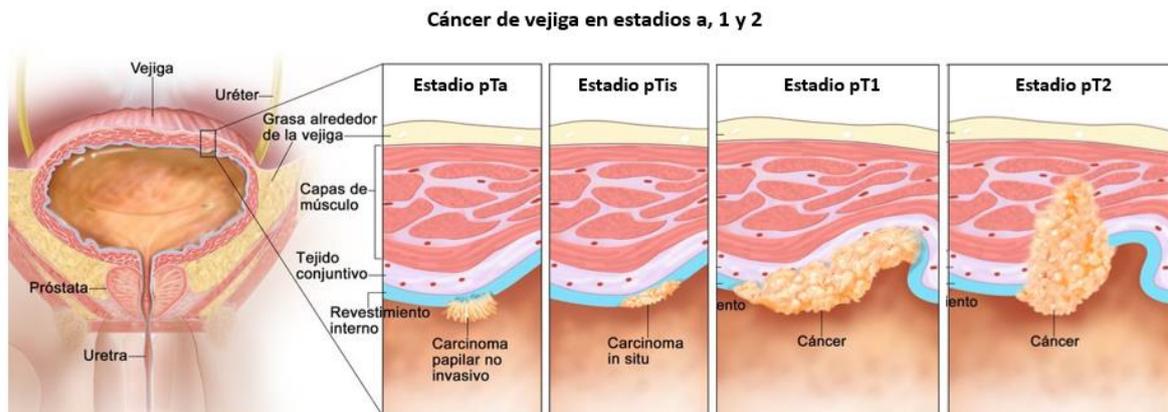


Figura 19.- Descripción de la invasión local para los estadios a, 1 y 2 en el cáncer vesical. En la capa de tejido conjuntivo que se encuentra bajo la capa muscular propia de la vejiga, pueden encontrarse haces de fibras musculares de la mucosa formando pequeños estratos, denominados *muscularis mucosae*. Imagen adaptada de (43).

Si bien es cierto que existen técnicas como la cistoscopia (estándar de oro en la detección de cáncer de vejiga) que permiten diagnosticar macroscópicamente un cáncer de vejiga con una sensibilidad superior al 90%⁴⁵, hoy en día no existe un marcador específico que permita diferenciar con franqueza, y sin lugar a dudas, microscópicamente la invasión de *muscularis mucosae* y el músculo propio en las secciones del tejido biopsiado. Los patólogos se basan fundamentalmente en la morfología de las muestras: capas musculares dislaceradas suelen corresponderse con la estructura del músculo de la mucosa, y capas más compactadas, con las del músculo propio (Figura 20).

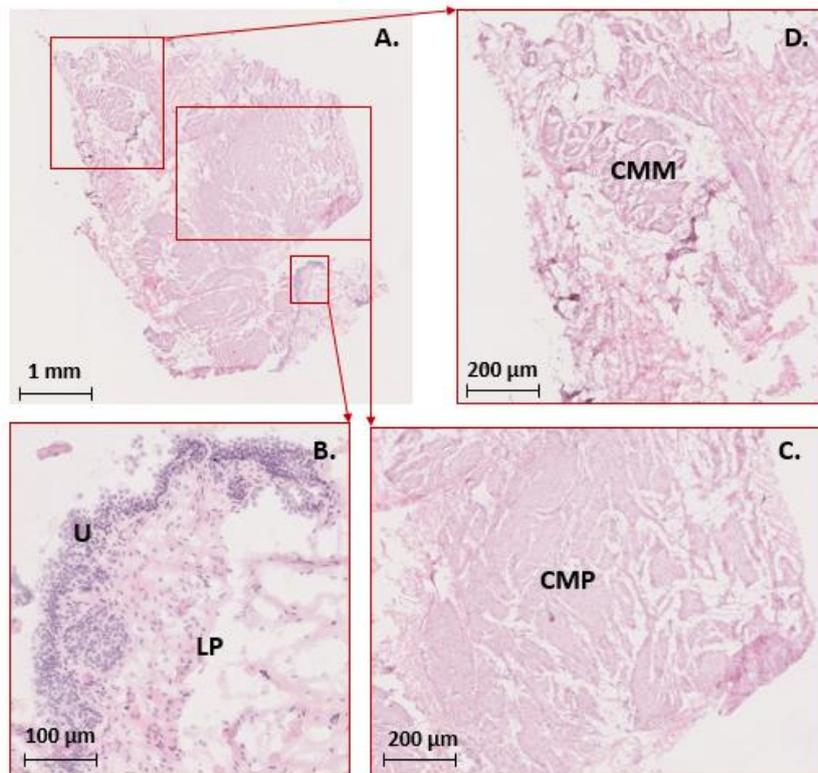


Figura 20.- Imagen histológica de la sección de vejiga. **A.**- Tinción H&E. **B.**- Urotelio (U) y lámina propia (LP) a 10x. **C.**- capa muscular propia (CMP) a 2,5x. **D.**- Capa muscularis mucosae (CMM) a 2,5x.

En 2021, la Asociación Europea de Urología (EAU) mencionó un nuevo método para la detección y sistematización de lectura de cáncer de vejiga, la resonancia magnética multiparamétrica, introduciendo la clasificación VI-RADS (Vesical Imaging Reporting and Data System)⁴⁴. Sin embargo, este método aún carece de estandarización y validación y sigue sin permitir diferenciar entre ambos músculos.

Es aquí donde ILEM toma fuerza. La inspección preliminar de la imagen histológica parece indicar que, según la morfología de los músculos, la *muscularis mucosae* y el músculo propio se encuentran dispuestos tal y como se muestra en la Figura 21. Sin embargo, al superponer la tinción de H&E con la imagen obtenida por ILEM, las huellas lipídicas parecen indicar que la zona superior e inferior de la muestra podrían ser *muscularis mucosae*, mientras que la zona segmentada en amarillo podría corresponder a músculo propio. La aparición de estas dos zonas claramente diferenciadas apunta a que la técnica de ILEM puede ser capaz de diferenciar entre los dos tipos de músculo, con lo que podría convertirse en una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico del cáncer vesical.

La correcta clasificación de un cáncer de vejiga puede marcar la diferencia entre la extirpación de la vejiga o la aplicación de otro tipo de terapias, como por ejemplo la resección a nivel local. El ejemplo de la Figura 21 indica que ILEM puede ayudar a tomar la decisión correcta.

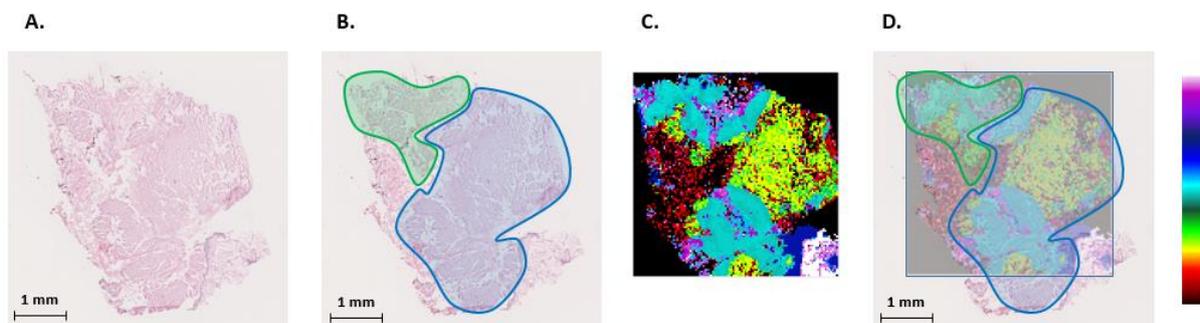


Figura 21.- **A.-** Imagen de H&E de una sección de vejiga. **B.-** Anotación histológica preliminar; el área verde corresponde a muscularis mucosae y la azul a músculo propio. **C.-** Segmentación correspondiente de ILEM. **D.-** Superposición de la anotación histológica y la segmentación de ILEM. El área azul delimitada por el patólogo presenta dos huellas lipídicas bien definidas, una de las cuales correlaciona con la encontrada en el área verde.

La Figura 22 muestra la abundancia relativa de las principales especies lipídicas detectadas en el experimento de ILEM para *muscularis mucosae* y músculo propio. A pesar de haberse medido una única muestra y, por tanto, no ser posible obtener una estimación del grado de confianza de los datos, se observan importantes diferencias en la abundancia relativa de ciertas familias lipídicas entre los dos tipos de músculo.

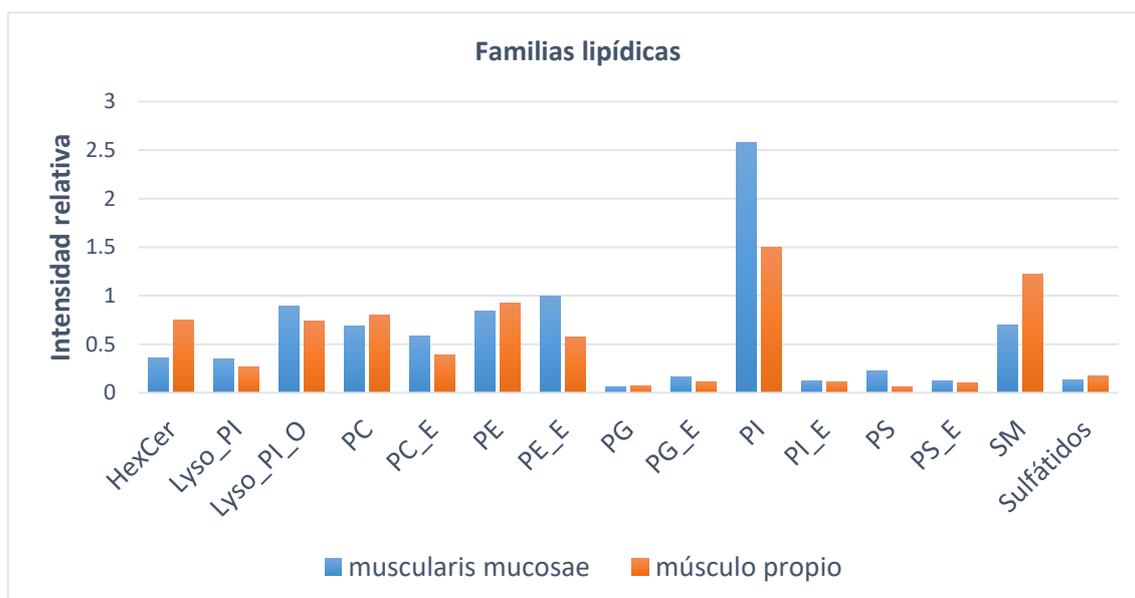


Figura 22.- Huella lipidómica de las principales especies lipídicas detectadas en los experimentos de ILEM para *muscularis mucosae* (azul) y músculo propio (naranja), obtenidas de la sección de vejiga. Al no haberse realizado un MS/MS de las muestras no ha sido posible concluir, en aquellos casos donde para una misma masa existen varias asignaciones posibles, de qué lípido se trata. Por ello, se han tenido en cuenta todas las asignaciones plausibles a la hora de calcular la intensidad promedio de las familias lipídicas.

Llama especialmente la atención la gran variación existente en la familia de los fosfatidilinosoles (PI) y las glicerofosfoseras (PS). Estas familias contienen especies con funciones biológicas altamente especializadas.^{13,14}

Por ejemplo, la PI 38:4 es un gran reservorio de ácido araquidónico. Se trata de un ácido graso poliinsaturado ubicuo de células de mamífero, y desempeña funciones bioquímicas de gran importancia, entre las que destaca ser el precursor principal de mediadores lipídicos bioactivos como la prostaglandina y los leucotrienos.⁴⁶ Estas hormonas, productos de reacciones de peroxidación del ácido araquidónico denominadas eicosanoides, son responsables de la respuesta inflamatoria en multitud de organismos.^{47,48} Debido a que distintos tipos de cáncer emplean los eicosanoides para asegurar su supervivencia, crecimiento y propagación, se están estudiando estrategias que minimicen el contenido de ácido araquidónico de membrana para combatirlos.⁴⁸ La diferencia en la abundancia relativa de las PI entre los músculos es algo a tener en cuenta a la hora de analizar tumores vesicales que infiltran una u otra capa.

Por su parte, las glicerofososerinas están íntimamente relacionadas con las funciones mitocondriales. Son sintetizadas en los retículos endoplasmáticos y en las membranas asociadas a mitocondria, y una de sus principales funciones es la señalización en la muerte celular programada.^{49,50,51} Las diferencias en la abundancia relativa de las PS entre los dos tipos de músculo podrían estar indicando una diferencia significativa entre sus mitocondrias.

5. CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo el estudio, mediante ILEM, de muestras de pelvis, uréter y vejiga humanas. Pese a no ser tejidos muy heterogéneos, se han obtenido distintas huellas lipídicas, asociadas a distintas regiones del tejido, que han podido reproducir la estructuración biológica de la pelvis y la vejiga, obteniendo por ejemplo una huella lipídica preliminar de la *muscularis mucosae* y el músculo propio de la vejiga.

A pesar de no tener un número suficiente de muestras para aportar datos estadísticamente significativos, estudios previos realizados en distintos órganos y tejidos han demostrado que la ILEM presenta una gran sensibilidad y especificidad.^{3, 4, 12, 37, 38} Por lo tanto, es más que probable que las diferencias observadas en el perfil lipídico de la pelvis renal, uréter y vejiga se repitan una vez analizado un mayor número de muestras.

Actualmente, se van a realizar nuevos experimentos a mayor resolución con el fin de caracterizar con una mayor definición (hasta el nivel celular) las diferentes capas de estas estructuras urinarias.

6. PERSPECTIVAS

La búsqueda de una medicina más personalizada, más específica, con herramientas de imagen digital que permitan una mejor clasificación histopatológica de los tejidos está impulsando el desarrollo de nuevas tecnologías, capaces de aportar información relevante acerca del metabolismo celular. Los avances que se están produciendo alrededor de la Espectrometría de Masas ha propiciado el interés por describir el lipidoma completo de distintas enfermedades.

La información espacial que aporta la Imagen por Espectrometría de Masas, la distribución de los metabolitos a lo largo de los tejidos, permite comprender mejor la complejidad de los sistemas biológicos. La ciencia puede estar ante una nueva histología molecular, digital y sistematizable que en un futuro podría complementar la histología tradicional.

No obstante, y a pesar de que ILEM se presente como una técnica atractiva, con gran potencial y rendimiento para el ámbito bioquímico, la implantación de esta técnica en la investigación

clínica no está exenta de problemas. La sencilla preparación de muestra, que no requiere de marcaje previo, queda a la sombra de un pretratamiento de datos arduo y complejo. Por ello, es imprescindible el desarrollo de nuevos softwares que permitan automatizar el análisis y tratamiento de datos para allanar el camino de la ILEM hacia la rutina diaria de diagnóstico clínico.

Afortunadamente, la continuación de este trabajo podría suponer un gran paso hacia este objetivo. Y es que los patólogos se han mostrado optimistas ante la posibilidad de poder discernir entre *muscularis mucosae* y el músculo propio de la vejiga, pues implicaría un método que permita hacer mejor el estadiaje del cáncer de vejiga, dando lugar a diagnósticos más fiables que permitan, a su vez, tomar decisiones terapéuticas más seguras. Es por ello que se emplearán estos datos como la base de una futura tesis doctoral, en la que se estudiará el potencial de la ILEM como herramienta de apoyo en el diagnóstico anatomopatológico del cáncer de vejiga en estudios multimodales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Idle, J. R.; Gonzalez, F. J. Mebatbolomics. *Cell Metab.* 2007, **6**, 348-351
- ² Fiehn, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 2002, **48**, 155-171
- ³ Martín-Saiz, L.; Mosteiro, L.; Solano-Iturri, J. D.; et al. High-Resolution Human Kidney Molecular Histology by Imaging Mass Spectrometry of Lipids. *Anal. Chem.* 2021, **93**, 9364-9372
- ⁴ Martín-Saiz, L.; Guerrero-Mauvecin, J.; Martín-Sanchez, D.; et al. Ferrostatin-1 modulates dysregulated kidney lipids in acute kidney injury. *J. Pathol.* 2022, **257**, 285-299
- ⁵ Junqueira, L. C.; Carneiro J. Histología básica. *Elsevier/Masson*, 2008, **sexta edición**, 387-389
- ⁶ Griffiths, W. J.; Wang, Y. in Lipidomics: current and emerging techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020, **412**, 7371-7372
- ⁷ Spener, F.; Lagarde, M.; Gélôên, A.; et al. Whats is lipidomics? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2003, **105**, 481-482
- ⁸ Bou Khalil, M.; Hou, W.; Zhou, H.; Elisma, F.; Swayne, L. A.; Blanchard, A. P.; Yao, Z.; Bennett, S. A.; Figeys, D. Lipidomics era: Accomplishments and challenges. *Mass Spectrom. Rev.* 2010, **29**, 877-929
- ⁹ Fahy, E. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 2005, **46**, 839-861
- ¹⁰ Glatz, J. F. Challenges in fatty acid and lipid physiology. *Front. Physiol.* 2011, **2**, 1-3
- ¹¹ Bond, L. M.; Miyazaki, M.; O'Neil, L. M.; et al. Chapter 6 - Fatty acid desaturation and elongation in mammals. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 2016, **sexta edición**, 185-208
- ¹² Calvo-Iraeta, I. Identificación de posibles biomarcadores lipídicos de neuroinflamación en infartos isquémicos mediante imagen por Espectrometría de Masas. Universidad del País Vasco, Leioa, España. *ehuBiblioteca*. 2021

- ¹³ Yamashita, A.; Hayashi, Y.; Nemoto-Sasaki, Y.; et al. Acyltransferase and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog. Lipid Res.* 2014, **53**, 18-81.
- ¹⁴ Futerman A. H. Chapter 10 - Sphingolipids. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 2016, **sexta edición**, 297-326
- ¹⁵ Ingólfsson, H. I.; Melo, M. N.; Van Eerden, F. J.; et al. Lipid organization of the plasma membrane. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, **136**, 14554-14559
- ¹⁶ Blanksby, S. J.; Mitchell, T. W. Advances in mass spectrometry for lipidomics. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2010, **3**, 433-465
- ¹⁷ Paglia, G.; Smith, A. J.; Astarita, G. Ion mobility mass Spectrometry in the omics era: Challenges and opportunities for metabolomics and lipidomics. *Mass Spectrom. Rev.* 2021
- ¹⁸ McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2007, **26**, 606-643
- ¹⁹ Spraker, J. E.; Luu, G. T.; Sanchez, L. M. Imaging mass spectrometry for natural products discovery: a review of ionization methods. *Nat. Prod. Rep.* 2020, **37**, 150-162
- ²⁰ Norris, J. L.; Caprioli, R. M. Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research. *Chem. Rev.* 2013, **113**, 2309-2342
- ²¹ Chunghtai, K.; Heeren, R. M. Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis. *Chem. Rev.* 2010, **110**, 3237-3277
- ²² Thomas, A.; Charbonneau, J. L.; Fournaise, E.; et al. 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, **84**, 2048-2054
- ²³ Garate, J.; Fernández, R.; Lage, S.; et al. Imaging mass spectrometry increased resolution using 2-mercaptobenzothiazole and 2,5-diaminonaphthalene matrices: application to lipid distribution in human colon. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, **407**, 4697-4708
- ²⁴ Murphy, R. C.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; et al. MALDI imaging of lipids after matrix sublimation/deposition. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011, **181**, 70-75
- ²⁵ Wolff, M. M.; Stephens, W. E. A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Rev. Sci. Instrum.* 1953, **24**, 616-617
- ²⁶ Djambazova, K. V.; Klein, D. R.; Migas, L. G.; et al. Resolving the Complexity of Spatial Lipidomics Using MALDI TIMS Imaging Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2020, **92**, 13290-13297
- ²⁷ Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; et al. The Orbitrap: A new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 2005, **40**, 430-443
- ²⁸ Fernández, R.; Garate, J.; Tolentino-Cortez, T.; et al. Mycroarray and Mass Spectrometry-Based Methodology for Lipid Profiling of tissues and Cell Cultures. *Anal. Chem.* 2019, **91**, 15967-15973
- ²⁹ Fernández, R.; Garate, J.; Martín-Saiz, L.; et al. Matrix Sublimation Device for MALDI Mass Spectrometry Imaging. *Anal. Chem.* 2019, **91**, 803-807

- ³⁰ Strupat, K.; Kovtoun, V.; Bui, H.; et al. MALDI produced ions inspected with a linear ion trap-orbitrap hybrid mass analyzer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009, **20**, 1451- 1463
- ³¹ McDonnell, L. A; Van Remoortere, A.; de Velde, N.; et al. Imaging mass Spectrometry data reduction: Automated feature identification and extraction. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, **21**, 1969-1978
- ³² Coombes, K. R.; Fritsche, H. A.; Clarke, C.; et al. Quality control and peak finding for proteomics data collected from nipple aspirate fluid by surface-enhanced laser desorption and ionization. *Clin. Chem.* 2013, **49**, 1615-23
- ³³ Xiong, X.; De La Torre, F. Supervised descent method and its application to face alignment. *IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition.* 2013.
- ³⁴ Garate, J.; Lage, S.; Martín-Sainz, L.; et al. Influence of Lipid Fragmentation in the Data Analysis of Imaging Mass Spectrometry Experiments. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2020, **31**, 517-526
- ³⁵ Braverman, N. E.; Moser, A. B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys Acta.* 2012, **1822**, 1442-1452
- ³⁶ Magnusson C. D.; Haraldsson G. G. Ether lipids. *Chem. Phys. Lipids.* 2011, **164**, 315-340
- ³⁷ Huergo-Baños, C. MALDI-IMS en la identificación de biomarcadores lipídicos de progresión tumoral en melanoma. Universidad del País Vasco, Leioa, España. 2020
- ³⁸ Bestard-Escalas, J.; Garate, J.; Maimó-Barceló, A.; Lipid fingerprint image accurately conveys human colon cell pathophysiological state: a solid candidate as biomarker. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016, **1861**, 1942-1950
- ³⁹ Jones, G. W.; Jones, S. A. Ectopic lymphoid follicles: inducible centres for generating antigen-specific immune response within tissues. *Immunology*, 2016, **147**, 141-151
- ⁴⁰ Asociación Española Contra el Cáncer. Cáncer de vejiga: ¿qué es? <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-vejiga>. (accedido el 01/06/2022)
- ⁴¹ Trias, I.; Orsola, A.; Vidal, N.; et al. Carcinoma urotelial de vejiga estadio T1: subestadiaje, patrones morfológicos de invasión y su significado pronóstico. *Actas Urol. Esp.* 2007, **31**
- ⁴² Bochner, B. H.; Hansel, D. E.; Efstathiou, J. A.; et al. Bladder Cancer Treatment (publicado el 4 de febrero de 2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65962/>. PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. *National Library of Medicine* (accedido el 31/05/2022)
- ⁴³ Algaba, F.; Moreno, A.; Trias, I. En Uropatología no tumoral. *Correlación morfológica, molecular y clínica. Capítulo II*, 1997, 92
- ⁴⁴ Babjuk, M.; Burger, M.; Capoun, O.; et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1 and Carcinoma in Situ). *Eur. Urol.* 2019, **81**, 75-94
- ⁴⁵ Aguilera Tubet, C.; Gutiérrez Baños, J. L.; Antolín Juárez, F.; et al. Estudio comparativo entre cistoscopia, citología urinaria, NMP-22 y un nuevo método, bladder chek, en el seguimiento del cáncer vesical superficial. *Actas Urol. Esp.* 2005, **29**, 252-256
- ⁴⁶ Martin, S.; Brash, A.; Murphy, R. The Discovery and early structural studies of arachidonic acid. *J. Lipid. Res.* 2016, **57**, 1126-1132

⁴⁷ Malmsten, C. Arachidonic acid metabolism and inflammation. A brief introduction. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* 1984, **53**, 31-45

⁴⁸ McCarty, M.; DiNicolantonio, J. Minimizing Membrane Arachidonic Acid Content as a Strategy for Controlling Cancer: A Review. *Nutr. Cancer*, 2018, **70**, 840-850

⁴⁹ Sánchez, R.; Aboleda, G. Mitochondria y muerte celular. *NOVA*, 2008, 6

⁵⁰ Shiao, Y. J.; Balcerzak, B. A mitochondrial membrane protein is required for translocation of phosphatidylserine from mitochondria-associated membranes to mitochondria. *Biochem. J.*, 1998, **331**, 217-223

⁵¹ Stone, S.; Vance, J. Phosphatidylserine Synthase-1 and -2 Are Located to Mitochondria-associated Membranes. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 34534-34540

8. ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Cer	Ceramida
CerP	Ceramida fosfato
CMM	Capa <i>muscularis mucosae</i>
CMP	Capa muscular propia
DAN	1, 5-diaminonaftaleno
ESI	Ionización por electroespray
ET	Epitelio estratificado
FA	Ácidos grasos
FL	Folículo linfoide
GL	Glicerolípidos
GP	Glicerofosfolípidos
H&E	Hematoxilina y eosina
HDC-RC	Análisis divisivo jerárquico de rango completo
HexCer	Cerebrósido
ILEM	Imagen de lípidos por espectrometría de masas
IMS	Imagen por espectrometría de masas
LDI	Desorción/ionización por láser
LP	Lámina propia
LPE	Lámina propia edematosa
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz
MP	Músculo propio
MS	Espectrometría de masas
O/P	éter/vinil éter
PA	Ácido fosfatídico
PC	Glicerofosfocolina
PE	Glicerofosfoetanolamina
PE-Cer	Ceramida fosfoetanolamina
PI	Glicerofosfoinositol
PK	Policétidos
PR	Prenoles
PS	Glicerofosfoserina
PV	Plexo vascular

Sft	Sulfátidos
SL	Sacarolípidos
SM	Fosfocolina
SP	Esfingolípidos
ST	Esteroles
TCD	Tejido colagénico denso
TCL	Tejido colagénico laxo
TE	Tejido edematoso
TIC	corriente total de iones
TOF	Tiempo de vuelo
U	Urotelio
V	Vénula