

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



TÍTULO: Desarrollo de un protocolo para el análisis metabólico de tejidos tumorales vesicales mediante espectrometría de masas

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: Rafael Sánchez Sánchez

TUTOR/A: María Desamparados Pascual-Ahuir Giner

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, FECHA: 04/07/2016

RESUMEN PARA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER DE BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

EL(LA) ALUMNO (A):

D./D.ª: Rafael Sánchez Sánchez

Del Trabajo Fin de Máster titulado:

Desarrollo de un protocolo para el análisis metabólico de tejidos tumorales vesicales mediante espectrometría de masas.

Aporta el siguiente RESUMEN:

Actualmente el cáncer vesical ocupa la sexta y decimosexta posición en hombres y mujeres en el ranking mundial de cáncer. Este cáncer posee además una incidencia especialmente alta en España frente al resto de países Europeos por lo que genera un gran gasto al sistema sanitario debido a su constante tendencia a recidivar.

Este estudio plantea la evaluación de diferentes condiciones de extracción de metabolitos para su posterior análisis por espectrometría de masas debido a las escasas referencias que se aportan sobre esto en la bibliografía. Para ello se evaluará frente a una única muestra tumoral 3 disolventes diferentes y 4 condiciones de homogenización del tejido. A su vez también se llevó a cabo un análisis multivariante por medio de análisis de componentes principales en el que se compararon los metabolitos asociados al fenotipo tumoral y al fenotipo sano encontrados por HPLC-MS.

(lugar, fecha y firma) : Valencia 4/07/2016

EL(LA) ALUMNO(A) : Rafael Sánchez Sánchez



Fdo.: D./D.ª

Agradecimientos:

En primer lugar me gustaría agradecer a los compañeros de trabajo, a Alba Loras mi tutora de prácticas, que me ha enseñado tanto sobre el funcionamiento del hospital. Su pasión por su trabajo y su dedicación son un ejemplo a seguir para mí. A José Luis Ruiz, Guillermo Quintas y en general a todo el equipo sanitario que han podido crear un hueco en sus agendas para hacerme formar parte del equipo.

A todos los profesores del Máster que han sabido transmitirnos con pasión una pizca de su vasto conocimiento, aumentando así nuestras ansias de aprender y formarnos, y en especial a mi tutora María Desamparados Pascual Ahuir Giner que nos ha ayudado tantísimo en todos los asuntos del Máster y que ha conseguido hacer de sus clases un acontecimiento que esperas con ganas. Para mí ha sido una de las mejores profesoras que he tenido.

A mis amigos de Baza, que representan el respiro de aire fresco después de duras semanas de trabajo, siempre dispuestos a escuchar tus problemas y ayudarte en lo que esté en su mano desde que éramos unos chavales que acudían nerviosos a su primer día de instituto.

A mis queridos compañeros de máster, compañeros de fatigas, expertos burócratas y geniales personas. Juntos hemos vivido una gran cantidad de experiencias que son inolvidables. Muchas gracias a todos por hacer de Valencia mi segunda casa.

Por su puesto a mi querida pareja Noelia, que me ha tenido que soportar en mis peores momentos de flaqueo, que me ha ayudado en todo lo que has podido, y que ha sabido ver en mí algo que todavía no puedo entender.

A mí querida hermana Ana, que siempre será mi mejor amiga y compañera inseparable de juergas, que nos basta una mirada de complicidad para saber que está pensando el otro y reír a carcajadas. Siempre ha estado ahí para ofrecerme sus consejos de hermana mayor y también para darme un tirón de orejas si es necesario, y espero que siempre lo este.

Y por último a mis padres, que han siempre me han apoyado en mis decisiones ya fueran acertadas o no, que han tenido fe en mi durante tantos años y siempre estaban ahí para apoyarme tanto en mis victorias como en mis derrotas. Ellos son mi fuente de inspiración, mi fuerza y mi ejemplo a seguir. Soy lo que soy gracias ellos y no hay palabras para expresar mi gratitud hacia los dos. Para mi sois los mejores padres que una persona pueda tener.

A todos vosotros, muchas gracias.

INDICE

Indice de figuras

Indice de abreviaturas

Indice de tablas

1.	Introducción.....	1-21
1.1.	Epidemiología del cáncer vesical.....	1-3
1.2.	Características clínico-patológicas y biológicas del cáncer de vejiga.....	3-7
1.2.1.	Estadio tumoral (sistema TNM) y grado tumoral (OMS 1973)	3-7
1.3.	Tablas de riesgo: criterios EORTC.....	7-8
1.4.	Sintomatología asociada al cáncer vesical.....	8-9
1.5.	Diagnóstico.....	9-1
1.6.	Tratamiento.....	11-12
1.7.	Factores de riesgo.....	12-16
1.7.1.	Género y raza.....	12-13
1.7.2.	Susceptibilidad genética.....	13-14
1.7.3.	Tabaco.....	14-15
1.7.4.	Riesgo ocupacional.....	15
1.7.5.	Factores dietéticos.....	15-16
1.8.	Metabolómica	16-21
1.8.1.	Espectrometría de masas aplicada al análisis metabólico.....	18-19
1.8.2.	Biomarcadores en el cáncer de vejiga.....	19-21
2.	Hipótesis y Objetivos.....	22-23
2.1.	Hipótesis.....	22
2.2.	Objetivos.....	22-23
2.3.	Planificación.....	23
3.	Materiales y métodos.....	24-36
3.1.	Criterios de inclusión y exclusión.....	24
3.2.	Protocolo de recogida de muestras.....	24-25
3.3.	Protocolo de optimización de los tejidos.....	25-30
3.3.1.	Elección del disolvente.....	27-29
3.3.2.	Elección de condiciones del Precellys.....	29-30
3.4.	Análisis metabolómico de tejidos tumorales vs no tumorales.....	30-32
3.5.	Condiciones del espectrómetro de masas.....	33-34
3.5.1.	Reactivos y materiales.....	33
3.5.2.	Análisis UPLC-QTOF.....	33-34

3.6. Selección de picos UPLC-TOF/MS.....	34
3.7. Pretratamiento de los datos	34-35
3.8. Búsqueda de metabolitos.....	35-36
4. Resultados y discusión.....	37-47
4.1. Resultados de optimización del protocolo de tejidos.....	37-38
4.2. Resultados de análisis de tejidos tumorales vs no tumorales.....	38-42
4.2.1. Resultados pretratamiento de los datos.....	38-40
4.2.2. Análisis de componentes principales PCA.....	40-41
4.2.3. Detalles del modelo construido.....	41-42
4.2.4. Elección del número de componentes.....	42
4.3. Búsqueda de metabolitos.....	43-45
4.3.1. Identificación de metabolitos encontrados.....	43-45
4.4. Discusión.....	45-47
5. Conclusiones.....	48
6. Bibliografía.....	49-55
7. Anexo.....	56-62

INDICE FIGURAS

1. **Figura 1:** Incidencia y mortalidad del cáncer de vejiga en Europa por cada 100.000 habitantes en 2008
2. **Figura 2:** Distribución de las muertes producidas por cáncer de vejiga entre 1989 y 1998 en España.
3. **Figura 3:** Estadíos del cáncer de vejiga
4. **Figura 4:** Imágenes histológicas de los diferentes estadíos del cáncer de vejiga
5. **Figura 5:** Imagen del software de EORTC 1.0 de 2006
6. **Figura 6:** Imagen ecográfica de la vejiga
7. **Figura 7:** Sistema PDD
8. **Figura 8 :** Procedimiento de RTU
9. **Figura 9.** Esquema de genes que poseen un patrón de metilación alterado en el cáncer de vejiga
10. **Figura 10:** Esquema de metabolismo tumoral
11. **Figura 11:** Asociación de metabolitos a fenotipos tumorales, adyacentes al tumor y sano
12. **Figura 12:** Procedimiento de toma de muestra de tejido vesical
13. **Figura 13:** Dispositivo Precellys 24.
14. **Figura 14:** Ejemplo de cortado y pesado de las muestras tumorales
15. **Figura 15:** Ejemplo de búsqueda de metabolitos en la base de datos METLIN.
16. **Figura 16:** Metabolitos encontrados vs % RSD en función del disolvente utilizado y el tiempo de agitación en el homogenizador.
17. **Figura 17:** Diagrama de Venn sobre los metabolitos encontrados por cada disolvente.
18. **Figura 18:** Proceso de escalado de los datos
19. **Figura 19:** Gráficas de las muestras en función de su primera y segunda componente principal.
20. **Figura 20:** Representación del error RMSECV frente al número de componentes del modelo
21. **Figura 21:** Representación de metabolitos en función a las dos primeras componentes principales.
22. **Figura 22:** Imagen de la carnitina ejerciendo su función como transportador de ácidos grasos a la mitocondria.
23. **Figura 23:** Metabolismo del oxoglutarato en condiciones normales, de mutación de la IDH1 y 2 o en condiciones de hipoxia.

INDICE TABLAS

- **Tabla 1:** Clasificación TNM de los tumores de vejiga en función de su grado de invasividad, presencia en los ganglios linfáticos y metástasis a distancia.
- **Tabla 2:** Cantidades correspondientes al volumen de disolvente a añadir en función de la masa de la pieza tumoral
- **Tabla 3:** Masas y volúmenes usados para evaluar las diferentes condiciones de homogenización
- **Tabla 4:** Características anatómo-patológicas de los tejidos tumorales
- **Tabla 5:** Factores ambientales correspondientes a los donantes de las muestras
- **Tabla 6:** Volumen de disolvente a añadir a cada muestra en función de su masa durante el cortado de la pieza tumoral.
- **Tabla 7:** Volumen de disolvente a añadir a cada muestra en función de su masa durante el cortado de la pieza sana.
- **Tabla 8:** Valores numéricos del modelo construido
- **Tabla 9:** Metabolitos encontrados en función de su relación m/z usando el software online Metlin.

INDICE DE ABREVIATURAS

- **TVNMI:** Tumor vesical de músculo no invasivo
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **pTis:** Carcinoma in situ
- **MM:** Muscularis mucosae
- **MP:** Musculares propia
- **EORTC:** European organisation for research and treatment of cáncer
- **RTU:** Resección transurethral
- **BCG:** Bacilo de Calmette Guerin
- **PDD:** Phtodynamic diagnostic cystoscopy
- **5-ALA:** 5 amino-mevulinato
- **NAT2:** N-acetil transferasa 2
- **GSTM1:** Glutation S-Transferasa
- **GWAS:** Genome wide association study
- **FGFR3:** Fibroblast growth factor receptor 3
- **ATP:** Adenoxin trifosfato
- **ROS:** Rective oxygen species
- **MCTS:** Monocarboxylate transporter
- **NADPH:** Nicotinamida-adenina-dinucleotido fosfato
- **RMN:** Resonancia magnética nuclear
- **MS:** Espectrometría de masas
- **LC:** Cromatografía líquida
- **CG:** Cromatografía de gases
- **MALDI:** Matrix assisted laser desorption/ionization
- **TOF:** Time of flight
- **SAM:** S-adenosyl meteonina
- **FISH:** Fluorescencia de hibridación in situ
- **NMP22:** Nuclear matrix protein 22
- **BTA:** Antígeno tumoral vesical
- **DNA:** Acido desoxiribunocleico
- **RNA:** Acido ribunocleico
- **UPLC:** Ultraperformance liquid chromatography
- **ApyT:** Acogida prequirúrgica
- **PBS:** Phosphate buffered saline
- **MeOH:** Metanol
- **QTOF:** quadropole-time of flight
- **PC:** Componente principal
- **RMSECV:** Root mean square error of cross validation
- **IDH:** Isocitrato deshidrogenasa
- **TET2:** Ten-eleven translocation mtylcitosina dioxygenase 2
- **PDH:** Piruvato deshidrogenasa
- **MDH:** Malato deshidrogenasa

1. Introducción

1. 1 Epidemiología de cáncer de vejiga

En el mundo occidental el cáncer de vejiga es el sexto tipo de cáncer más común en hombres o el cuarto si tenemos en cuenta los que se encuentran en un estadio Ta, seguido del cáncer de próstata, pulmón y colon, mientras que en mujeres se encuentra en el noveno lugar. A nivel mundial el cáncer de vejiga ocupa la séptima y decimoséptima posición en hombres y mujeres respectivamente. En estudios llevados a cabo a nivel de Europa y Estados Unidos se estima que el riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga a una edad menor de 75 años se encuentra entre el 2 y el 4% en hombres mientras que en mujeres es un 0,5-1%. La edad media de diagnóstico está entre los 65 y 70 años(1).

De los 70.000 casos nuevos calculados al año en Europa, alrededor de 53.000 corresponden a hombres y alrededor de 18.000 a mujeres, sin embargo de las 15.000 defunciones calculadas al año por cáncer de vejiga más de 10.000 corresponden hombres y menos de 5.000 a mujeres. Esto da lugar a unos ratios de mortalidad por año que varían entre 2 y 10 por cada 100.000 habitantes en el caso de los varones y entre 0,5 y 4 para las mujeres. En estados Unidos se dan un total de 74.000 casos nuevos al año y unas 16.000 defunciones(2). Respecto a Europa, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer proporciona los datos de la **Figura 1**.

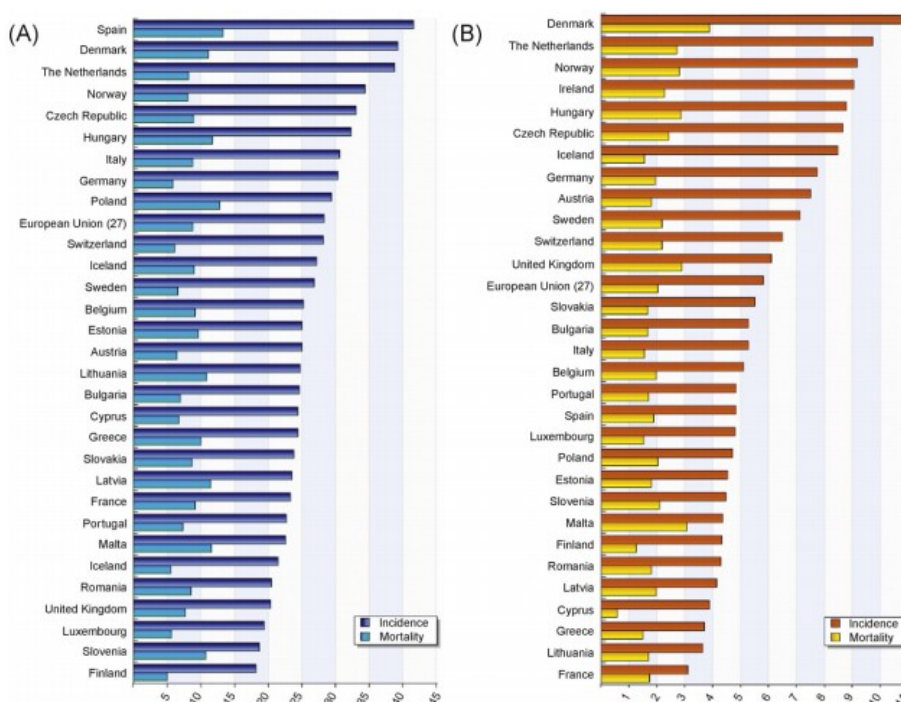


Figura 1: Incidencia y mortalidad del cáncer de vejiga en Europa por cada 100.000 habitantes en 2008 A/ en hombres y B/ en mujeres. Datos procedentes de la agencia internacional de Investigación contra el cáncer. Disponible en <http://globocan.iarc.fr>

En España, el cáncer de vejiga presenta una alta incidencia en comparación con otros países europeos. Ocupa el primer lugar si se tiene en cuenta sólo a la población masculina, con un alta incidencia, de 11585 casos y una mortalidad de 4102 pacientes en 2012(3). En ciertos estudios que evalúan esta situación se postula que este hecho puede deberse a un mayor consumo por parte de los españoles de tabaco negro, también puede existir la posibilidad de que se deba a la explotación minera e industrial presente en algunas regiones de España. Como puede verse en la **figura 2** las regiones de Huelva, Sevilla y Almería son las más afectadas coincidiendo con la localización de las muertes por cáncer de pulmón, por lo que se podría explicar con el consumo de tabaco. En la región de Cardona, Suria, Sallent o Balsareny o Llobregat, conocidas por su actividad minera y textil, vemos que se encuentra aumentada la incidencia del cáncer de vejiga. También existen ciertas regiones como la de Vallés/Maresme en las que se observa cierto patrón únicamente en mujeres, debido posiblemente a que el sector textil industrial (generalmente algodón) tenía una presencia abundante de mujeres (4).

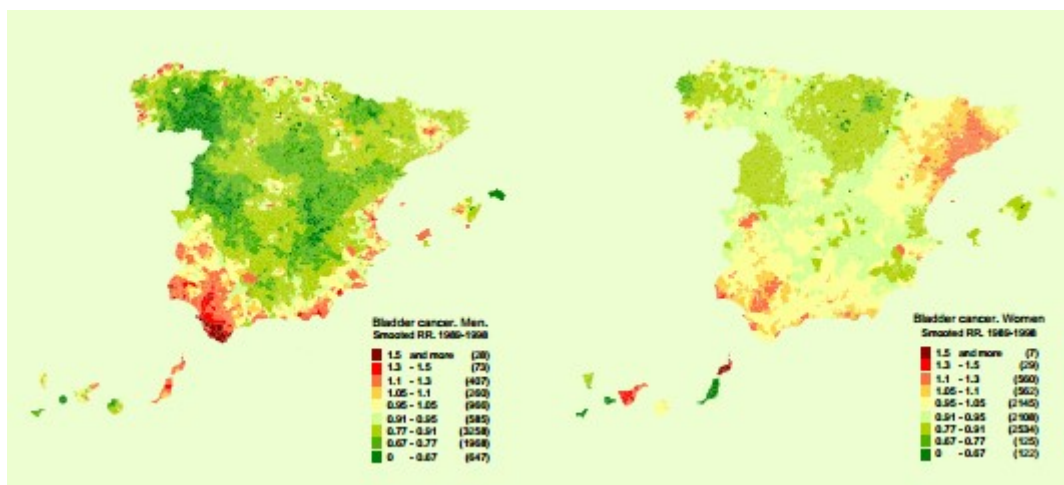


Figura 2: Distribución de las muertes producidas por cáncer de vejiga entre 1989 y 1998 en España. Como puede verse existe un aumento de la mortalidad en mujeres en zonas asociadas con la industrialización textil de Cataluña y de hombres en las zonas mineras de Huelva, Almería y Cádiz. Imagen tomada de Lopez-Abente G, Aragonés N, Ramis R, Hernández-Barrera V, Pérez-Gómez B, Escolar-Pujolar A, et al. Municipal distribution of bladder cancer mortality in Spain: possible role of mining and industry. BMC Public Health. 2006;6:17.

Las proyecciones en España hasta el año 2022 revelan resultados diferentes según el sexo, ya que en las mujeres se prevé un aumento de la incidencia, con un porcentaje anual de cambio del 19,24% (periodo 2008-2022), mientras que en los varones no se producirá un descenso significativo del número de casos (3).

Aproximadamente el 75% de los pacientes diagnosticados tienen un cáncer no invasivo (pTa-pT1) con un alto ratio de recurrencia y progresión a pesar de haber recibido terapia local, entre ellos, aproximadamente el 70% presentan una lesión Ta, un

20% son T1 y el 10% presentan carcinoma in situ . El 25 % restante son cánceres que presentan invasión en la capa muscular (pT2-pT4) y por lo tanto es necesaria cirugía (cistectomía) o tratamientos basados en radioterapia(5).

Como consecuencia, el tumor vesical no músculo invasivo (TVNMI) es una enfermedad crónica que puede presentar eventos oncológicos a lo largo del tiempo que requieran la administración de repetidos tratamientos, tanto quirúrgicos como médicos, por lo que es el tumor que presenta el coste más elevado de tratamiento de por vida por paciente, superando a tumores como el colon, mama, próstata y pulmón, ocupando los primeros lugares en cuanto a los gastos totales en atención médica (6)(7)(8).

El coste del cáncer de vejiga en Europa se estimó en unos 4,9 billones de euros en 2012, de los cuales 2,9 billones (59%) corresponden a un gasto del sistema sanitario. Este gasto representa el 5% del presupuesto total destinado al cáncer en Europa, aunque es una cifra muy variable dependiendo del sistema sanitario del país (9).

1.2. Características clínico-patológicas y biológicas del cáncer de vejiga

1.2.1 Estadío tumoral (sistema TNM) y grado tumoral (OMS1973)

Actualmente el estudio morfológico del tejido, así como sus estructuras adyacentes es la técnica principal en la clasificación de los cánceres uroteliales. Según estos criterios podremos clasificar el cáncer en diferentes grupos (**Figura 3**) con diferentes pautas clínicas, comportamiento biológico y respuesta a la terapia.

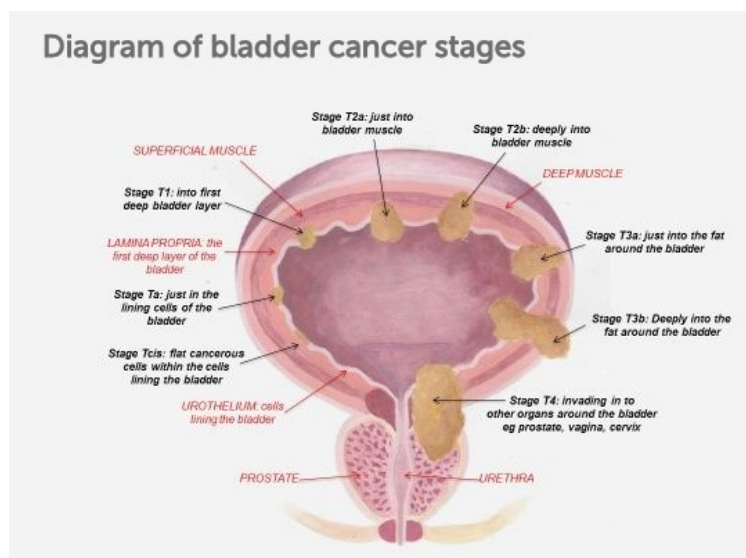


Figura 3: Estadíos del cáncer de vejiga. En esta figura se detallan los diferentes estadíos en función a su grado de invasión en las capas de la vejiga, imagen tomada de la fuente: <http://actionbladdercanceruk.org/grading-and-staging/>

En el caso del cáncer de vejiga la clasificación más empleada es el sistema TNM **Tabla 1**, que valora la extensión del propio tumor (T, tumor primario), los ganglios linfáticos (N, del inglés nodes o ganglios) y la presencia de metástasis (M).

Tumor primario (La T de cada tumor sólo se puede determinar tras una cistoscopia y/o RTU)

TX	El tumor primario no puede ser valorado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: es un tipo de tumor no invasivo
Ta	Carcinoma papilar: otro tipo de tumor no invasivo
T1	El tumor invade el tejido conectivo subepitelial: uno de los tejidos más superficiales de la vejiga
T2	El tumor invade el músculo de la vejiga.
T3	El tumor invade el tejido que rodea a la vejiga
T4	El tumor invade próstata, uretra, vagina, pared pélvica o pared abdominal.
T4a	El tumor invade próstata, útero o vagina
T4b	El tumor invade pared pélvica o pared abdominal

Ganglios linfáticos

NX	Los ganglios linfáticos no se pueden valorar
N0	No hay afectación de ganglios linfáticos.
N1	Metástasis en un solo ganglio linfático, de tamaño menor de 2 cm.
N2	Metástasis en un solo ganglio linfático que mida entre 2 cm. y 5 cm.; o en varios ganglios linfáticos, ninguno de ellos mayor de 5 cm.
N3	Metástasis en ganglios linfáticos mayores de 5 cm.

Metástasis a distancia

MX	La presencia de metástasis a distancia no puede valorarse
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Hay metástasis a distancia

Tabla 1: Clasificación TNM de los tumores de vejiga en función de su grado de invasividad, presencia en los ganglios linfáticos y metástasis a distancia.

- **Carcinoma in situ (pTis):** El carcinoma in situ es un tumor que se presenta en el 25% o más de los pacientes con tumores superficiales de alto grado. Se caracteriza por su desorden estructural. Presenta una anaplasia nuclear idéntica al tumor de alto grado. Las mitosis atípicas son muy frecuentes. Estos cambios epiteliales pueden darse en todo el espesor urotelial o en la membrana basal. La lámina propia suele presentar un infiltrado inflamatorio, edema y congestión vascular. Las células son aneuploides (10)(3)(11) (**Figura 4A**)

- **pTa:** Más del 60% de las neoplasias de vejiga se presenta como tumores papilares no invasivos (pTa), mientras que entre el 10-20% de los carcinomas muestran una mínima invasión del estroma subepitelial (pT1).

Estas dos etapas generalmente se clasifican juntas como tumores superficiales de vejiga no invasivos, sin embargo existen diferencias entre ambos. Está demostrado que, a pesar de las similitudes clínicas, los pTa y los pT1 presentan diferencias biológicas que permiten a los pT1 crecer invasivamente como puede ser la activación de oncogenes como p53, c-myc, o FGFR3 (12).

- **pT1:** Se considera este grado cuando existe una invasión de la lámina propia. Los cambios morfológicos que pueden observarse son artefactos de retracción, presencia de células tumorales individuales, desmoplasia o eosinofilia citoplasmática. Ciertos estudios reflejan que hasta un 35% de los carcinomas en estadio pT1 se clasifican de manera errónea hacia pTa debido a su similitud (13).

La subestratificación de la profundidad de la invasión de la lámina propia en invasión sin sobrepasar la *muscularis mucosae*(MM) (pT1a) o más allá de la MM y del plexo vascular (pT1b), tampoco ha ofrecido beneficios.(**Figura 4B**)

- **pT2:** Este estadio se da cuando existe una invasión de la *muscularis propria* (MP). En estos casos hacer una distinción correcta entre la invasión de la MM y la MP es de vital importancia para posteriores decisiones terapéuticas. La invasión de la MP se divide a su vez en dos categorías, superficial (pT2a) y profunda (pT2b). El reconocimiento de invasión que atraviese la MP no es posible de reconocer mediante las biopsias obtenidas por resección transuretral (RTU) ya que en estas solo se puede extraer una porción de la MP. Sin embargo el hecho de ser un pT2a o pT2b no tiene influencia en la supervivencia del paciente (14).(**Figura 4C**)

- **pT3:** Se considera este estadio cuando el tumor invade la grasa que existe de manera periférica a la vejiga. Existe a su vez una subdivisión del estadio en pT3a cuando la invasión de la grasa periférica puede observarse mediante un microscopio o pT3b cuando esta grasa es macroscópica y puede verse mediante técnicas de imagen o ser palpada por un cirujano

Se ha estudiado que la subdivisión de pT3 tampoco ofrece información sobre la prognosis, siendo la presencia de invasión en un nódulo linfático o la presencia de márgenes quirúrgicos, los únicos criterios para evaluar esto. (15)(**Figura 4 D**)

- **pT4:**En este estadio se invaden los órganos periféricos superando la capa de tejido adiposo. Puede afectar a varios tipos como son el estroma de la próstata, las vesículas seminales, el útero, la vagina, la pared pélvica o la pared abdominal. A su vez, el estadio pT4 se puede subdividir en pT4a en el cual la expansión del tumor se produce a órganos cercanos (la próstata, el útero o la vagina) o pT4b donde el tumor se ha propagado a la pared pélvica o abdominal.(13) (**Figura 4E y Figura 4F**)

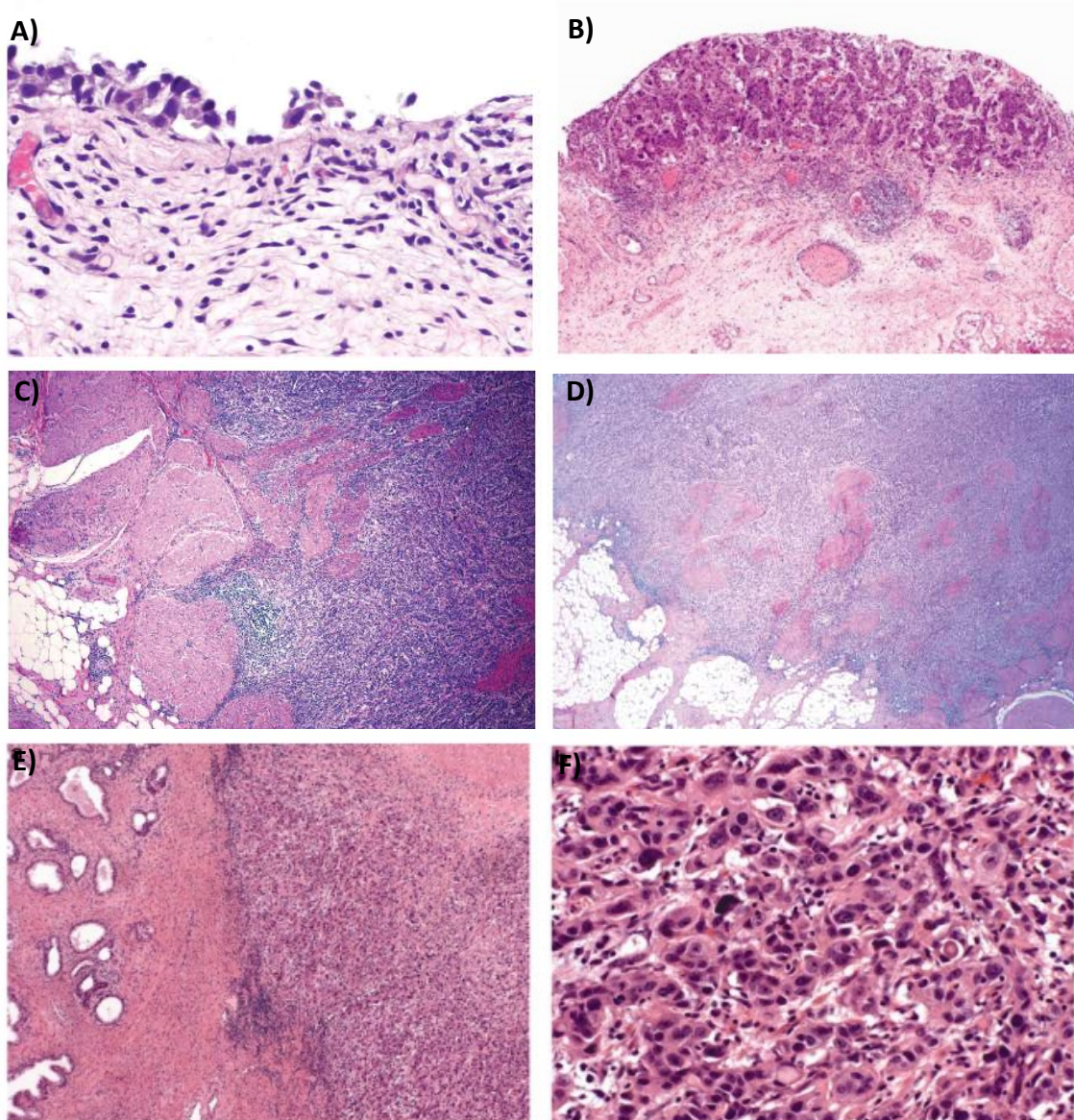


Figura 4: Imágenes histológicas de los diferentes estadios del cáncer de vejiga **A)** Carcinoma in situ de vejiga con denudación en su superficie **B)** Carcinoma en estadio pT1 invadiendo la lámina propia **C)** Carcinoma en estadio pT2 con invasión en la muscularis propia **D)** Carcinoma de vejiga en estadio pT3 con invasión microscópica de la grasa periférica **E)** Carcinoma de vejiga en estadio pT4 con un fuerte infiltrado inflamatorio **F)** Invasión del tumor hacia tejido periprostático . Imágenes tomadas de Cheng L, Montironi R, Davidson DD, Lopez-Beltran A. Staging and reporting of urothelial carcinoma of the urinary bladder. Mod Pathol. Nature Publishing Group; 2009;22

Con respecto a la **gradación**, ésta se define como un sistema de clasificación basado en la diferenciación celular, la arquitectura tisular y el grado de mitosis (16). En 1973 la OMS propuso una clasificación basada en el grado de anaplasia celular, siendo en la actualidad la clasificación más utilizada. Divide a los tumores en , moderadamente y pobremente diferenciados, correspondiendo a los grados uno, dos y tres, respectivamente.

- **El grado G1 o tumor bien diferenciado (OMS 1973):** se define como un urotelio engrosado que tiene más de 7 capas de células y éstas sólo muestran anaplasia y pleomorfismo leves. La alteración de la maduración celular desde la base hasta la superficie es leve y existen muy pocas figuras mitóticas de localización basal. Cuando están limitadas sólo a la mucosa también se les llama tumores uroteliales papilares de bajo potencial maligno (OMS 2004) (16)(17).
- **Los tumores moderadamente diferenciados grado 2 (OMS 1973):** tienen un centro fibrovascular más ancho, una alteración mayor de la maduración celular desde la base hasta la superficie y pérdida de la polaridad celular. El cociente núcleo/citoplasmático es mayor que el anterior grado y presenta mayor pleomorfismo nuclear y nucléolos prominentes(16)(17).
- **Los tumores pobremente diferenciados grado 3 (OMS 1973):** se caracteriza por presentar células que no se diferencian a medida que progresan desde la membrana basal hasta la superficie. Se observa un pleomorfismo nuclear pronunciado, con un cociente nucleocitoplasmático alto (16)(17).

1.3 Tablas de riesgo: criterios EORTC

Debido a la alta tasa de recurrencia que existe en el cáncer de vejiga, se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios con el fin de establecer un método que nos permita predecir el riesgo de un paciente a sufrir recidiva o progresión. La *European organisation for research and treatment of cancer (EORTC)* en 2006 publicó unas tablas predictivas de puntuación para valorar la probabilidad de recidiva y/o progresión a los 5 años de pacientes con tumores vesicales Ta/T1 a los cuales no se les realizó una segunda RTU y se les aplicó terapia de mantenimiento con el bacilo de Clamette Guerin (BCG). Con este tipo de herramienta, se permite a los urólogos calcular fácilmente la probabilidad de recurrencia y progresión entre después de una RTU basándose en los siguientes factores clínicos y patológicos rutinarios. (18)

- Número de tumores iniciales
- Tamaño del tumor
- Categoría T
- Presencia de carcinoma in situ
- Recurrencias anteriores

Este modelo devuelve al usuario un resultado o score en forma de porcentaje que indica el riesgo de recidiva y progresión. Este método supone una ayuda en la determinación de un tratamiento post-RTU más efectivo así como la frecuencia y el seguimiento del paciente de manera individual. (Figura 5)

EORTC Risk Tables for Stage Ta T1 Bladder Cancer

Prior Recurrence Rate

 Primary
 Recurrent <= 1 per year
 Recurrent > 1 per year

Number of Tumors

 1
 2 to 7
 8 or more

Tumor Diameter

 < 3 cm
 >= 3 cm

T Category

 Ta
 T1

Grade (WHO 1973)

 G1
 G2
 G3

Concomitant CIS

 No
 Yes

	1 Year	2 Years	3 Years	4 Years	5 Years
Probability of Recurrence	0.24	0.34	0.40	0.43	0.46
Probability of Progression	0.05	0.08	0.11	0.15	0.17

Reference: Sylvester RJ, van der Meijden APM, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, Newling DWW, Kurth KH. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: A combined analysis of 2596 patients from 7 EORTC trials. *European Urology* 49: 466-477, 2006.

Programmed by Richard Sylvester, EORTC Data Center, 83 avenue Mounier, 1200 Brussels, Belgium.

Version 1.0. Januarv 2006

Figura 5: Imagen del software de EORTC 1.0 de 2006 en la que se muestran 6 opciones diferentes a completar por el usuario entre las que se encuentran: Anteriores recurrencias, numero de tumores, diámetro del tumor, categoría, grado y existencia de CIS. El programa devuelve probabilidad de recurrencia y progresión en 5 años. Imagen obtenida de <https://www.eortc.be/tools/bladdercalculator/>

1.4 Sintomatología asociada al cáncer vesical

El síntoma más común presente en el cáncer de vejiga es una hematuria que cursa sin dolor en un 85% de los pacientes, aunque para ser más exactos se podría decir que todos los pacientes de cáncer de vejiga presentan microhematuria. (1)

La hematuria macroscópica es la razón de la detección de gran parte de los cánceres de vejiga, de hecho en ciertos estudios se ha cuantificado que un 15-28% de los pacientes que presentan hematuria macroscópica han desarrollado finalmente un cáncer de vejiga. Aún con la presencia de esta hematuria es necesario el examen mediante una cistoscopia para confirmar el diagnóstico.

En otros casos puede producirse una hematuria microscópica, aunque esta se da en un 13% de la población de manera asintomática. Mohr et al (19) mostró que de 246 pacientes con hematuria microscópica 16 de ellos desarrollaron un cáncer de vejiga, también asociando la cantidad de células de la serie roja encontrada por campo con la probabilidad de desarrollar la enfermedad.

Otros síntomas que pueden presentarse en el cáncer de vejiga son la irritabilidad en la micción, frecuencia urinaria, urgencia y disuria. Estos signos son los segundos más comunes en el cáncer de vejiga y suelen encontrarse asociados a la presencia de un carcinoma in situ (20).

Otros signos menos comunes pueden ser dolor lateral debido a una obstrucción uretral, edema en las extremidades inferiores o masa pélvica palpable. En el caso de que la enfermedad se encuentre en estado avanzado pueden presentarse con pérdida de peso abdominal o dolor óseo debido a la metástasis a distancia. Sin embargo estos síntomas se encuentran siempre asociados a una hematuria ya sea microscópica o macroscópica.

1.5 Diagnóstico

En gran parte de los casos una hematuria macroscópica, junto con los anteriores síntomas nombrados es lo que orienta al médico hacia un diagnóstico de cáncer de vejiga, sin embargo es necesario el uso de otras técnicas complementarias.

Aunque el diagnóstico por biomarcadores empieza a emerger, todavía es necesario el uso de técnicas de imagen que nos permitan visualizar el tumor para confirmar el diagnóstico, Las técnicas de diagnóstico por imagen utilizadas principalmente son la ecografía y la cistoscopia, acompañadas de la citología urinaria:

- **Ecografía:** este método permite la evaluación de las vías urinarias sin la necesidad del uso de contrastes. Además las continuas mejoras de estos equipos permiten una mejor visualización de las vías urinarias superiores y la vejiga. Con este método podemos visualizar masas renales, hidronefrosis o defectos de llenado intraluminales de la vejiga. (**Figura 6**)(21)

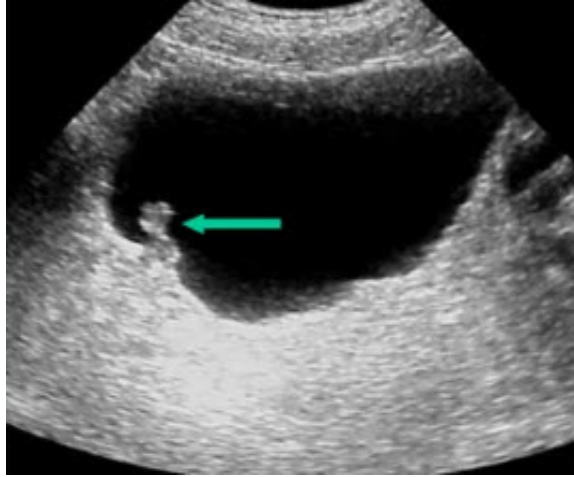


Figura 6: Imagen ecográfica de la vejiga, en ella se puede distinguir claramente la presencia de un tumor que crece de manera concéntrica. Imagen obtenida de: <http://urologovalladolid.com/exploraciones-diagnosticas/>

- **Citología:** La citología ofrece la posibilidad de un diagnóstico menos invasivo para los pacientes. Se basa en la visualización microscópica de las células cancerígenas en muestras de orina. Los tumores T0 y T1 ceden menor número de células a la orina respecto a los cánceres invasivos por lo que la sensibilidad del método para detectar los tumores de bajo grado es menor (20-40%). Además esta técnica de diagnóstico es bastante lenta y es susceptible a una variación inter observador. Este tipo de ensayo puede mejorar su sensibilidad si se combina con inmunofluorescencia mediante anticuerpos monoclonales, sin embargo aumenta enormemente su coste y el riesgo de falsos positivos.(22)
- **Cistoscopia:** La cistoscopia es un procedimiento que se basa en la introducción de un cistoscopio por la uretra hasta llegar a la vejiga donde se puede visualizar si existe algún tumor o incluso tomar una biopsia para un posterior estudio de anatomía patológica. La cistoscopia es un proceso que requiere anestesia al paciente, sin embargo, es muy invasivo y en algunas ocasiones es incapaz de detectar tumores superficiales pequeños y tumores pTis. Este método puede mejorar su sensibilidad si lo usamos en combinación con el sistema photodynamic diagnostic cystoscopy (PDD) que se basa en la administración de 5-aminomevulinato (5-ALA), lo que causa un rápido incremento de protoporfirina IX que se ilumina cuando luz azul incide sobre ella.(15) (**Figura 7**)

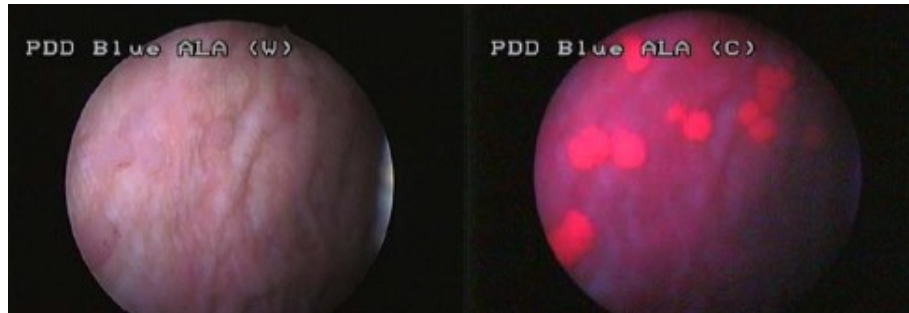


Figura 7: Sistema PDD, en esta imagen podemos ver como las lesiones cancerosas se muestran en rojo cuando se administra 5-ALA al paciente que rápidamente pasa a PPIX y es iluminado con luz azul. Imagen tomada de: Mark Soloway SK. Bladder cancer. 2º ed. ICUD; 2012.

1.6 Tratamiento

El manejo de inicio de un cáncer vesical consiste en la RTU de todas las lesiones visibles en la mucosa vesical. La muestra reseca debe incluir la parte exofítica del tumor, la lámina y la MP, lo que permite también realizar posteriormente el diagnóstico.

En esta operación se realiza un extirpado del tumor junto con una parte del tejido circundante gracias a un resectoscopio que consta con un asa incandescente, una palanca para mover el asa y un controlador del flujo que permite la entrada y salida de líquido, lo que reduce la presión intravesical y proporciona mejor visión al cirujano (23) **Figura 12**. Para llevar a cabo esta operación el cirujano se guía gracias a una imagen por cámara que es introducida por la uretra junto con el asa de resección.

Diversos estudios comprobaron que después de un resecao inicial el riesgo de recidiva en un seguimiento a lo largo de 20 años fue del 80% (24). Como consecuencia esta técnica se suele combinar con una instilación inmediata de quimioterapia intravesical.

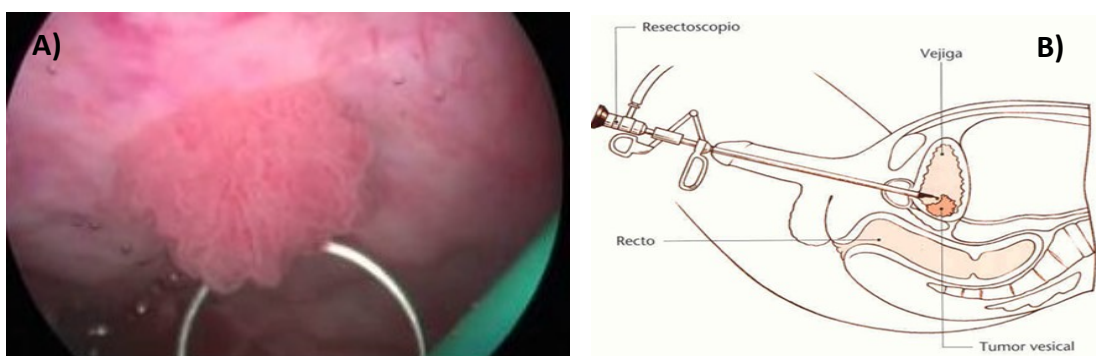


Figura 8 : Procedimiento de RTU, e A) se puede observar un tumor papilar de cáncer de vejiga a punto de ser extirpado por medio de una RTU. B) Esquema del procedimiento en general. Imagen tomada de <http://www.ivuweb.com/instituto-valenciano-de-urologia/> y <http://www.urologosmalaga.com/> respectivamente.

Diversos estudios notifican una reducción del 32% del riesgo de recidiva cuando se trataba a los pacientes con administraciones periódicas del BCG durante un periodo de 1 año como mínimo. Está demostrado su efecto positivo en la demora de la recidiva y el avance tumoral (25).

Respecto al mecanismo de acción del BCG, sus moléculas se unen a la fibronectina creando complejos fibronectina BCG. Las células presentadoras de antígenos en el urotelio pueden fagocitar estos complejos y presentar el antígeno a los linfocitos T CD4+ BCG-específicos, además se reclutan citoquinas proinflamatorias lo que resulta en una inmunidad Th1 predominante con un reconocimiento aumentado de las células tumorales por parte de los linfocitos T CD8+, macrófagos o natural killers (26).

En el caso de pacientes con tumores múltiples o recidivantes se puede optar por quimioterapia intravesical con tiotepa, mitomicina C o doxorubicina, al ser los de mayor poder citotóxico. Generalmente se realiza una instilación cada semana durante un mes y seguidamente mensual durante un año. (27).

En cuanto a la cistectomía radical o segmentaria este tratamiento se indica con poca frecuencia para estadios bajos. Solo se aplica una cistectomía radical en aquellos pacientes que poseen un tumor superficial extendido o resistente al tratamiento (2). La cistectomía radical va acompañada de los ganglios linfáticos pélvicos, la vejiga, los tejidos perivesicales, la próstata y las vesículas seminales en los hombres, mientras que en las mujeres se lleva a cabo una extirpación del útero, las trompas de Falopio, los ovarios y la pared vaginal anterior (28).

En el caso de la radioterapia es una opción que produce una supervivencia a 5 años de aproximadamente 30-40%. Estos resultados mejoran con la combinación de quimioterapia en cuanto a riesgo de recaídas locales, sin embargo no existe un aumento de la supervivencia ni de la calidad de vida con este tratamiento.

1.7 Factores de riesgo

Los factores de riesgo en el cáncer de vejiga se clasifican como predisposiciones genéticas o exposiciones externas. Actualmente una gran cantidad de estudios han conseguido asociar en cierta medida el cáncer de vejiga a múltiples factores de riesgo, donde cada factor de riesgo tiene un impacto diferente en la incidencia y fisiopatología del cáncer de vejiga.

1.7.1 Género y raza

Se ha comprobado que existe una menor incidencia en el cáncer de vejiga en el género femenino, sin embargo, existe un mayor ratio de mortalidad que en hombres.

Anteriormente se pensaba que la mayor incidencia en varones se debía a su mayor exposición a diferentes compuestos carcinogénicos como el tabaco o productos de la industria, sin embargo todavía es desconocido por que los índices de mortalidad son mayores en mujeres. También se ha demostrado que las mujeres que han tenido hijos tienen un riesgo menor de padecer cáncer de vejiga frente a las mujeres sin hijos, por lo que se piensa que este hecho puede tener un origen hormonal(29).

En una serie de experimentos con ratas, un grupo fueron tratadas con hormonas androgénicas y otro con hormonas estrogénicas. Las ratas tratadas con hormonas androgénicas desarrollaban más tumores de vejiga, por lo que se plantea que las hormonas androgénicas estimulan (o por lo menos no inhiben) la oncogénesis, mientras que las hormonas estrogénicas hacen lo contrario(30).

En cuanto a la raza, los afroamericanos muestran una menor incidencia (13 por cada 10.000 habitantes) en comparación con los individuos caucásicos (22 por cada 100.000 habitantes). Sin embargo el diagnóstico se suele realizar en estadios avanzados de la enfermedad, por lo que la esperanza de vida es menor (31). La incidencia superior entre Europeos y Americanos comparados con Africanos está limitado a tumores superficiales, teniendo un riesgo similar de cáncer invasivo.(1)

1.7.2 Susceptibilidad genética.

Existen algunos factores genéticos como variantes del N-acetil transferasa (NAT2) y genotipos con defectos de glutathion S-transferasa (GSTM1) que han sido reconocidos como factores de riesgo de cáncer de vejiga. Estas variaciones genéticas confieren una susceptibilidad individual a ciertos factores extrínsecos, principalmente el tabaco, ya que estas enzimas se encargan de la detoxificación de ciertos carcinógenos. La acetilación es importante en procesos de detoxificación de aminas, por ello mutaciones en la NAT2 conducen a un fenotipo de acetilación lenta que provoca una peor eliminación de los carcinógenos del tabaco (32)(33).

Se han llevado a cabo grandes estudios de GWAS (Genome wide association study) en los que se ha demostrado que ciertas variantes como puede ser 4p16.3 se asocian al cáncer de vejiga.

A su vez, su loci está cercano al oncogén FGFR3 que se conoce como uno de los genes que puede encontrarse mutado en el cáncer de vejiga. La mutación en este gen provoca que el receptor FGFR3 se encuentre activado de manera constitutiva (34). Existen además gran cantidad de genes como: APOA1, APC, SFRP1 que pueden tener alterado su patrón de metilación. Esto puede conducir al desarrollo de la patología y también se puede asociar a la recurrencia, progresión y supervivencia en función de si

tienen el gen *FGFR3* mutado o no (35). (Figura 9)

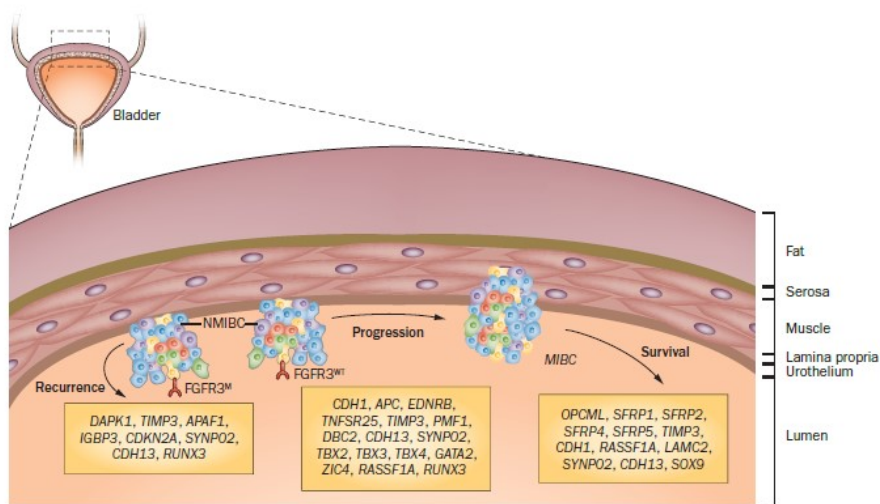


Figura 3. Esquema de genes que poseen un patrón de metilación alterado en el cáncer de vejiga. Estos genes pueden encontrarse asociados a la recurrencia, progresión o supervivencia. NMIBC (cáncer de vejiga no músculo-invasivo) MIBC: (cáncer de vejiga músculo invasivo). *FGFR3^{wt}* : Gen no mutado, *FGFR3^m*: Gen mutado. Imagen tomada de Kandimalla R, van Tilborg A a, Zwarthoff EC. DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer. *Nat Rev Urol* . Nature Publishing Group; 2013;10(6):327–35.

Por todo esto podemos concluir que la susceptibilidad genética en el cáncer de vejiga existe de manera directa y de manera indirecta aumentando el riesgo de padecer la patología por otras causas, principalmente la exposición a sustancias carcinogénicas.

1.7.3 Tabaco

El tabaco se ha reconocido como el factor de riesgo más importante en el cáncer de vejiga. Se estima que la mitad de todos los cánceres de vejiga se presentan por el hábito de fumar cigarrillos aumentando el riesgo de la patología entre 2 y 4 veces por encima del valor de riesgo inicial de una persona. El tabaco contiene entre otras sustancias aminas aromáticas, como beta-naftilamina o hidrocarburos aromáticos policíclicos que contribuyen a la aparición de esta patología. Este tipo de sustancias se excretan por la vía renal produciendo de esta manera su efecto carcinogénico a través del sistema urinario. La diferencia de la incidencia del cáncer de vejiga en hombres y mujeres se ha asociado a los diferentes patrones tabáquicos a lo largo de la historia. No obstante, aún se desconoce cómo afecta el tabaco al desarrollo de la patología considerando las diferencias hormonales entre sexos (36).

El riesgo de cáncer de vejiga se ha visto que se encuentra asociado a su vez en mayor o menor medida al tipo de tabaco que se consuma. Se ha comprobado que el riesgo de fumadores de tabaco negro es mayor que el de fumadores de tabaco rubio, ya que el primero contiene una mayor concentración de N-nitrosamina y 2 naftil-

amina. (37)

En estudios en los que se investigaba la exposición ambiental al humo del tabaco se vio una incidencia significativamente superior en mujeres expuestas al humo del tabaco durante la adolescencia y el principio de la adultez. Este efecto es generalmente más fuerte en mujeres, y sobre todo en aquellas que nunca han fumado (38).

Por todo esto, el cese del hábito tabáquico supone un beneficio para la aparición, recurrencia y progresión del cáncer vesical tanto en su variedad no invasiva como invasiva.

1.7.4 Riesgo ocupacional

Trabajos que se ven asociados a la exposición continua de diversos elementos carcinógenos también pueden ser un factor de riesgo para el cáncer de vejiga. Se estima que alrededor de un 20% de los tumores de vejiga se deban a la exposición, generalmente en áreas industriales, de compuestos presentes en el procesamiento de la pintura, metal, y productos derivados del petróleo. En los últimos años el aumento de las medidas de seguridad en los trabajadores ha reducido la exposición a los carcinogénicos haciendo que este factor sea menos importante (39).

1.7.5 Factores dietéticos

Como en muchos otros tipos de cáncer, los aspectos nutricionales han sido evaluado para el cáncer de vejiga. Diversos estudios revelan que no existe una relación entre la toma de fluidos y el riesgo de padecer cáncer de vejiga gracias a un estudio de seguimiento de 250.000 individuos a lo largo de nueve años(40).

En cuanto a la ingesta de café, recientemente se ha evaluado el consumo de café frente a un grupo control encontrándose solo un pequeño incremento del riesgo en los consumidores habituales de café(41). En el caso del alcohol no se ha visto riesgo de cáncer de vejiga asociado con la ingesta de éste.

En el caso de alimentos puede observarse que en otros tipos de cáncer el consumo de carne se ha asociado con una elevación del riesgo, mientras que un consumo habitual de fruta y verdura se asocia a un efecto beneficioso, sin embargo en el cáncer de vejiga estas afirmaciones no se encuentran confirmadas(42).

También se han visto pequeñas diferencias de riesgo entre consumidores de grasas siendo los de menor riesgo los consumidores de grasas vegetales y aquellas que contienen ácido alfa-linolénico(43).

1.8 Metabolómica

La metabolómica es una de las ciencias ómicas más recientes en el mundo de la ciencia y se basa en el estudio sistemático de los metabolitos o productos que generan las células de un organismo. Los metabolitos son productos de interacciones que dependen de las proteínas y el genoma de un individuo, por ello la evaluación del conjunto de todos los metabolitos de un organismo (metaboloma) puede darnos información muy valiosa sobre un fenotipo.

Actualmente el cáncer debe ser considerado también como una enfermedad de carácter metabólico ya que los tumores en proceso de crecimiento poseen un programa metabólico alterado para conseguir suplir la demanda bioenergética y biosintética durante la proliferación celular (44).

Ya en 1920, el grupo del doctor Warburg descubrió que existen diferentes modos de producción energética en las células tumorales frente a las células sanas. En estas células tumorales se veía una gran conversión del piruvato a ácido láctico, dando así una producción de energía de manera anaeróbica, esto fue llamado en su momento Efecto Warburg(45). Las células tumorales podrían utilizar de manera primordial este tipo de vías debido a una serie de razones:

- **Generación rápida de ATP:** Se sugiere que el metabolismo anaeróbico de las células tumorales permite generar más rápidamente el ATP necesario para el gran gasto metabólico presente en este tipo de células. Sin embargo no está claro que los niveles de ATP puedan ser un limitante para el ciclo celular, incluso ciertas células activan vías catabólicas cuando su ratio ATP/ADP es bajo (46).
- **Optimización de recursos:** Cuando existen bajas concentraciones de sustrato, la célula necesita de una vía catabólica altamente eficiente para sobrevivir. Sin embargo cuando la célula se encuentra en un microambiente rico en nutrientes, el hecho de desarrollar la una vía compleja catabólica le resulta más “caro” energéticamente hablando, que una vía más simple en su desarrollo.
- **Minimización del especies reactivas de oxígeno (ROS):** El uso de la glucólisis como vía productora de energía permite una protección de las células tumorales de las especies reactivas de oxígeno ROS, que se pudieran generar mediante un metabolismo de fosforilación oxidativa. Además el consumo de glutamina y glucosa permite la creación de NADPH, del cual es dependiente la regeneración del glutatión como agente antioxidante.

- **Uso funcional del lactato.** Ciertas fuentes postulan la teoría de que las células tumorales utilizan el lactato producto de su metabolismo para ser excretados por los cotransportadores MCTs (monocarboxylate transporter) que pasan al exterior de la célula una molécula de lactato junto con un ion de hidrógeno. El resultado global es una acidificación del medio que puede matar a las células normales y dar espacio al tumor para reproducirse e invadir nuevos tejidos. (44)

Aunque esta regla generalmente se cumple para muchos tipos de cáncer se ha descubierto que el ATP producido por efecto Warburg no supera el 10% en algunos tipos de cáncer frente al 50-70% esperado, siendo la respiración mitocondrial la principal fuente de energía en las células tumorales(44).

En algunos estudios llevados a cabo en orinas analizando su perfil metabólico se ha descubierto ciertos metabolitos diferenciales en el tejido tumoral de la vejiga (**Figura 10**)(47). En ella podemos ver como ciertas especies sobre todo aquellas relacionadas con el metabolismo energético se encuentran alteradas.

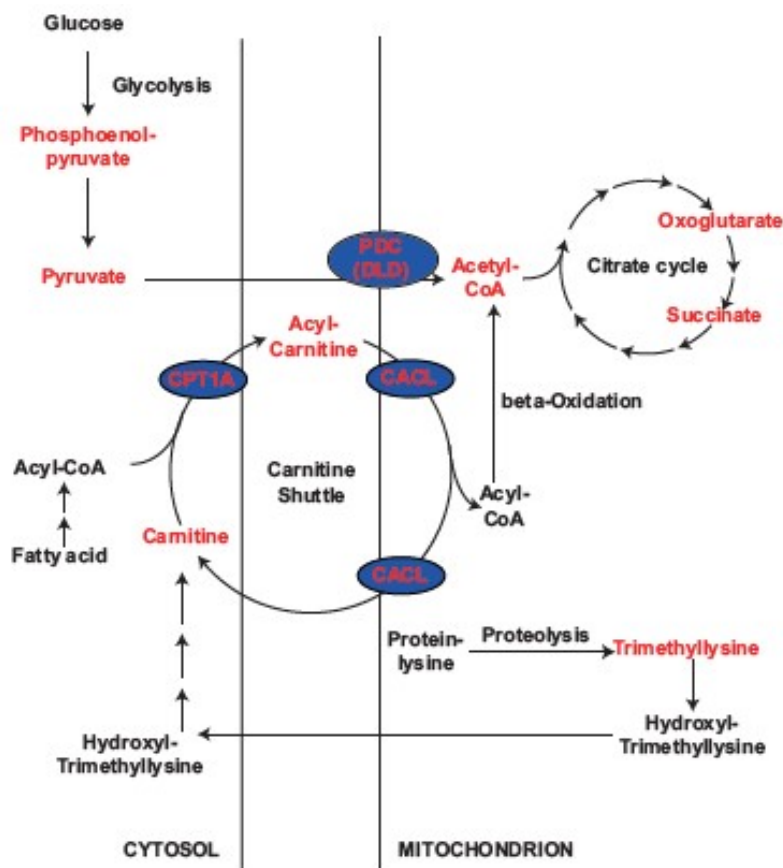


Figura 10: Esquema de metabolismo tumoral. En ella se muestra las vías metabólicas que pueden estar alteradas (rojo) en tejidos cancerosos frente a controles. Además los genes cuyos niveles se encuentran alterados en ensayos de microarrays se marcan con un círculo. Imagen tomada de: Jin X, Yun SJ, Jeong P, Kim IY, Kim W-J, Park S. Diagnosis of bladder cancer and prediction of survival by urinary metabolomics. *Oncotarget*. 2014;5(6):1635-45

El piruvato y el fosfoenolpiruvato se encuentran desregulados en el ciclo lo cual tiene sentido si tenemos en cuenta que las células tumorales toman como vía de obtención de energía rápida la glucólisis. A su vez, vemos como la carnitina o acetyl carnitina también se encuentran aumentadas como consecuencia de un mayor transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria para llevar a cabo la beta-oxidación. La oxidación de ácidos grasos genera gran cantidad de energía que sería necesaria durante el proceso de carcinogénesis. La beta oxidación de estos ácidos grasos genera por lo tanto un aumento de acetyl-CoA. Por otra parte se ha demostrado que las células humanas pueden usar el metabolismo reductivo del alfa-cetoglutarato para sintetizar acetyl-CoA y llevar a cabo la síntesis lipídica. La isocitrato deshidrogenasa 1 se encuentra activada en la mayoría de células humanas pero en condiciones de hipoxia se inhibe, recayendo la generación de alfa-cetoglutarato para la síntesis de novo de lípidos en la descarboxilación de la glutamina (48).

1.8.1 Espectrometría de masas aplicada al análisis metabolómico

La metabolómica se plantea como una herramienta de enorme potencial para la identificación y el estudio de metabolitos. Ésta intenta dar una explicación comprensiva y cuantitativa de los metabolitos que aparecen en las muestras biológicas. Sus aplicaciones son diversas: identificación de biomarcadores, monitorización de tratamiento, respuesta a fármacos, estudio de interacciones entre organismo y ambiente... y para ello la metabolómica hace uso de diversas plataformas como la resonancia magnética nuclear (RMN) o la espectrometría de masas (MS) combinada con métodos cromatográficos.

Debido al alto número de analitos y a sus diversas propiedades físico-químicas, suponen un reto para la química analítica y debemos usar la plataforma más conveniente para cada caso. En los últimos años se ha desarrollado enormemente las tecnologías presentes en el campo de la metabolómica, aumentando progresivamente el número de analitos que pueden ser cuantificados en un solo análisis. Esto hace posible la creación de perfiles metabolómico holísticos, lo cual proporciona una visión más realista de lo que ocurre en la muestra que lo que un solo marcador pueda proporcionar. Los resultados pueden ser a su vez usados para crear bases de datos que pueden ser integrados con otras tecnologías ómicas para el desarrollo de mapas que nos permitan mejorar el conocimiento biológico (49).

Aunque los estudios llevados a cabo en metabolómica se usan usualmente para comparar el metaboloma entre casos y controles también existen una múltiple variedad de estudios que pueden llevarse a cabo con esta plataforma como pueden ser: estudios llevados a cabo sobre el propio tejido tumoral, con el fin de investigar el metaboloma en las células tumorales directamente (50); estudios en los que se

monitoriza la terapia en los pacientes mediante el análisis del metaboloma (51)(52); o estudios asociados a la prognosis de los pacientes como puede ser la recurrencia de un cáncer, la metástasis o la supervivencia (53) (54) (55).

Existen gran cantidad de estudios que buscan relaciones entre el perfil metabólico y el cáncer. Estos estudios se llevan a cabo con diversos tipos de muestra y plataformas. En lo que se refiere al tipo de técnica utilizada para llevar a cabo el estudio, las más utilizadas fueron la cromatografía líquida (CL) y cromatografía de gases (CG) combinadas con MS para una separación previa de los componentes. Aunque la combinación GC-MS proporciona unos datos más robustos y una menor inferencia con la matriz, la combinación de LC- MS ofrece la ventaja de no tener que derivatizar los componentes de la muestra en el caso de que estos no sean volátiles. También existen otros estudios realizados por inyección directa, electroforesis capilar asociada a masas o mediante un sistema MALDI-MS (matrix assisted laser desorption/ionization). En cuanto al detector utilizado en metabolómica el más usado es el tiempo de vuelo TOF aunque también existen múltiples estudios llevados a cabo con otros instrumentos como el cuadrupolo o la trampa de iones (56). En nuestro caso usaremos la espectrometría de masas combinada con HPLC debido a su alta sensibilidad en la búsqueda de metabolitos.

En cuanto al tipo de muestras utilizadas, la orina, el suero y el plasma son las más frecuentes. Sin embargo existen otros biofluidos que se pueden estudiar como pueden ser el fluido cerebrospinal en glioblastoma (54), el aire exhalado en cáncer de pulmón (57), la saliva en cáncer oral (58), y los extractos fecales(59).

1.8.2 Biomarcadores en el cáncer de vejiga

La detección temprana de los cánceres urológicos es de gran importancia para el éxito del tratamiento del paciente. El desarrollo de marcadores moleculares que puedan diagnosticar la enfermedad de manera precisa o que puedan mejorar los métodos actuales, podrían ser un avance importante. Por este motivo, la creación de nuevos test que permitan la detección en orina de unos marcadores de mayor sensibilidad y/o especificidad para detectar los cánceres urológicos permitiría no solo un diagnóstico más preciso, sino también de una forma no invasiva y en pacientes que pudieran ser asintomáticos o presentar tumores no visibles mediante cistoscopia, como por ejemplo el carcinoma in situ (60).

Hoy en día el diagnóstico clínico del cáncer de vejiga requiere de un examen cistoscópico de la vejiga y una toma de biopsia para su posterior análisis, lo cual

supone un procedimiento altamente invasivo y costoso para los hospitales. Aunque existen algunas moléculas candidatas a marcadores de cáncer de vejiga como puede ser el ácido hialurónico o el antígeno de tumor de vejiga, estas moléculas resultan más adecuadas para una monitorización que para una posible diagnosis.

Otros metabolitos diferenciales encontrados en sistemas in vitro son la glicina (que interviene en la síntesis de nucleótidos), el lactato, la arginina y la nicotinamida. Todos ellos importantes en la actividad biosintética de las células cancerosas (62).

En diversos estudios llevados a cabo usando cromatografía de líquidos en combinación con espectrometría de masas se comparó el perfil metabólico del tejido tumoral vesical frente a tejido sano del mismo paciente y se encontró una expresión mayor de los siguientes metabolitos: Phe, His, SAM (S-Adenosyl meteonina) y anilina. Sin embargo otros metabolitos se encontraban con una expresión reducida frente a los controles como pueden ser taurina, ácido palmítico, laurico y oleico (63).

En un estudio llevado a cabo con 58 tejidos extraídos de vejigas de pacientes operados se ha llevado a cabo un análisis del perfil metabólico. Concretamente alrededor de unos 50 compuestos identificados en las bases de datos fueron encontrados con un expresión alterada al compararlos con el tejido sano adyacente. En ellos se vio unos niveles elevados de algunos aminoácidos (Aa) alifáticos como asparagina, valina y ciertos aromáticos como el triptófano, fenilalanina e histidina. También se encontraron metabolitos hidroxilados como la 3-hidroxicineurenina, ácido 4-hidroxifenil láctico y ácido 5-hidroxicindolacético asociados al fenotipo tumoral.(64) A continuación se detalla la lista con los 30 metabolitos diferenciales encontrados en cáncer de vejiga.

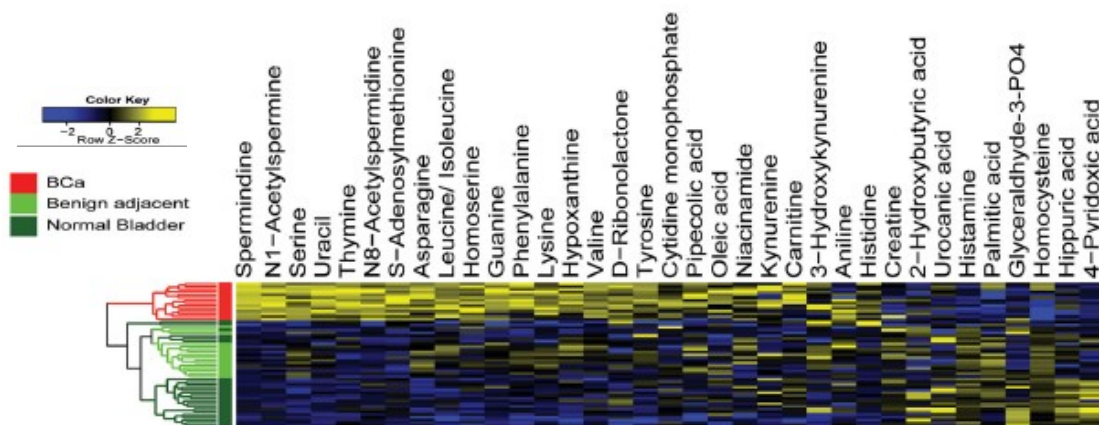


Figura 11: Asociación de metabolitos a fenotipos tumorales, adyacentes al tumor y sano. Imagen tomada de: Putluri N, Shojaie A, Vasu VT, Vareed SK, Nalluri S, Putluri V, et al. Metabolomic Profiling Reveals Potential Markers and Bioprocesses Altered in Bladder Cancer Progression. *Cancer Res.* 2011;71(24):7376–86.

Otros estudios llevados a cabo con otras plataformas metabólicas como puede ser H-RMN encontraron resultados similares cuando se estudiaron las diferencias entre tejidos tumorales obtenidos después de una RTU de vejiga asociado ciertos metabolitos como triglicéridos, leucina, isoleucina, valina, lactato, alanina, glutamato, glutatión, glutamina, taurina, myo-inositol asociados al perfil tumoral. (65)

La búsqueda de biomarcadores en tejidos ofrece la ventaja de que podemos comparar el metaboloma del tejido tumoral frente al tejido adyacente que se presupone sano. Esto es de gran ayuda a la hora de decidir que metabolitos pertenece al fenotipo tumoral. Por otra parte trabajar con tejidos requiere de la toma de una muestra por una biopsia cistoscopia o después de realizar una RTU de vejiga, lo cual resulta altamente invasivo, existen riesgos de contaminación y es necesario un método de obtención que no dañe ni altere la composición metabólica de la muestra.

En cuanto a análisis en orina y suero existen una gran cantidad de marcadores de naturaleza diversa:

Existen varios test comerciales como por ejemplo la fluorescencia de hibridación in situ (FISH), la proteína de la matriz nuclear 22 (NMP22), antígeno vesical tumoral (BTA) y una serie de anticuerpos monoclonales para detectar células uroteliales cancerosas (Inmunocyt TM) que han sido propuestos para mejorar la precisión del diagnóstico. También se ha propuesto la combinación de las puntuaciones obtenidas de diferentes marcadores en una sola puntuación para el diagnóstico. Sin embargo la especificidad y sensibilidad de estos test varía entre un rango de 50-80%.

Otras biomoléculas como el DNA y RNA han sido propuestas como biomarcadores asociados a genes humanos del cáncer de vejiga. Algunos de esos genes pueden ser (AURKA, FGFR3, TWIST1/NID2), mientras que también se proponen RNAs como (ETS2/PALAU, HA2/HYAL1) y proteínas (TERT, CECAM, APOA1, SERPINA1). El rango de sensibilidad y especificidad para estos marcadores individualmente esta entre del 74-95% y el 80-100% respectivamente(66).

2. Hipótesis Objetivos y planificación

2.1 Hipótesis

Debido a los hechos anteriormente expuestos, las hipótesis del trabajo son las siguientes:

- 1) El tejido adyacente al tumor elegido durante la RTU se presupone sano, según el diagnóstico por imagen.
- 2) Como consecuencia de las alteraciones genéticas (mutaciones y otros reordenamientos genéticos) que se producen en las células tumorales, las rutas metabólicas van a estar diferencialmente reguladas respecto a las células sanas y por lo tanto, los metabolitos derivados de éstas van a ser diferentes entre los dos grupos de estudio (tejido tumoral vs tejido sano).
- 3) Si tenemos en consideración que la espectrometría de masas es una de las herramientas más potentes de la que se disponen para realizar estudios de metabolómica, podremos identificar una gran cantidad de metabolitos diferenciales en una cantidad de muestra tisular muy reducida.
- 4) La optimización de un protocolo de extracción de metabolitos en muestras tumorales vesicales nos permitirá determinar que disolvente y que condiciones de homogenización son las mejores para extraer el mayor número de metabolitos. Esto nos servirá para aplicarlo a futuros análisis metabolómicos de muestras tisulares mediante UPLC-MS.
- 5) El uso de la plataforma UPLC-MS unido a un análisis estadístico multivariante, nos permitirá determinar si existen diferencias significativas entre los dos grupos de estudio que nos permitan separarlos.
- 6) Los metabolitos encontrados podrían servirnos como una huella fenotípica del cáncer vesical y se podrían trasladar al entorno clínico como futuros marcadores.

2.2 Objetivos

Objetivos principales

- 1) El objetivo principal de este estudio es la identificación de un patrón metabolómico diferencial entre muestras de tejido vesical tumoral y no tumoral.

Objetivos secundarios

- 1) Protocolizar el análisis metabolómico tisular incluyendo las siguientes etapas: i) toma, conservación y tratamiento de las muestras; ii) análisis mediante UPLC-MS; iii) análisis bioestadístico.

- 2) Optimización de las condiciones óptimas (disolvente y condiciones Precellys) para la extracción de un máximo número de metabolitos con una menor desviación estándar relativa (RSDV) entre las réplicas. Aplicación de estas condiciones al posterior análisis de tejidos.
- 3) Identificación de los metabolitos encontrados y su regulación en el metabolismo celular.

2.3 Planificación

Actividades	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun
Selección de pacientes								
Recolección de muestras								
Optimización de protocolo								
Análisis muestras tumorales vs no tumorales								
Análisis multivariante								
Identificación metabolitos diferenciales								

3. Materiales y Métodos

3.1 Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión

- 1) Pacientes entre 18 y 80 años diagnosticados mediante cistoscopia o ecografía de un tumor vesical no invasivo (pTa-pT1).
- 2) Pacientes derivados a cirugía para la extirpación de tumor mediante una resección transuretral (RTU vesical).
- 3) Pacientes con tumores suficientemente grandes como para poder recoger muestra tisular.
- 4) Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado.

Exclusión

- 1) Pacientes con elevada comorbilidad.
- 2) Pacientes diagnosticados de cáncer vesical invasivo (pT2-pT4).
- 3) Pacientes con abundante hematuria o con desordenes en la coagulación de la sangre.

3.2 Protocolo de recogida de muestras

Para la toma de las muestras de los tejidos se lleva a cabo un el siguiente protocolo(**Figura 12**):

1. Los pacientes fueron avisados previamente mediante una llamada telefónica donde se les explicó brevemente el estudio de investigación. Se explica el objetivo del estudio así como el papel que tendrá su muestra.
2. Si el paciente accede, el día de la RTU se atiende al paciente en la sala de acogida prequirúrgica (APYT) donde se le vuelve a explicar, ahora más detalladamente, el estudio de investigación en el que podría colaborar en el caso de que cediera la muestra. Se les hace saber que es un estudio voluntario, que no recibirá ninguna recompensa por participar, que no presenta riesgos adicionales a la intervención que se va a realizar y que el trato clínico seguirá siendo el mismo independientemente de la decisión que tome. A su vez, se resuelven las posibles dudas que puedan tener los pacientes sobre el estudio o la gestión de sus muestras. Si desea participar en el estudio el paciente firma un consentimiento informado (Anexo I) donde se detallan cada uno de estos puntos. El paciente recibe una copia del consentimiento que ha firmado así como una hoja de cese de muestras

con la cual puede revocar el uso de cualquier muestra suya en cualquier momento, otra de las copias es derivada al biobanco de la Fe y otra se queda en el archivo del grupo.

3. Los pacientes, una vez cambiados y preparados son llevados al quirófano para realizarles la RTU vesical.
4. Antes de iniciar la cirugía, mediante una pinza de biopsia fría se recoge la muestra de tumor y también de tejido sano adyacente.
5. Inmediatamente después de ser tomadas las muestras de tejido se introducen en criotubos de rosca y son introducidos en un recipiente con nitrógeno líquido. Los criotubos usados para el almacenamiento de estas muestras a su vez se encuentran rotulados con un código anónimo asignado a cada paciente previamente.
6. A continuación las muestras son llevadas al Biobanco de La Fe donde son extraídas del nitrógeno archivadas y conservadas en congeladores a una temperatura de -80°C .

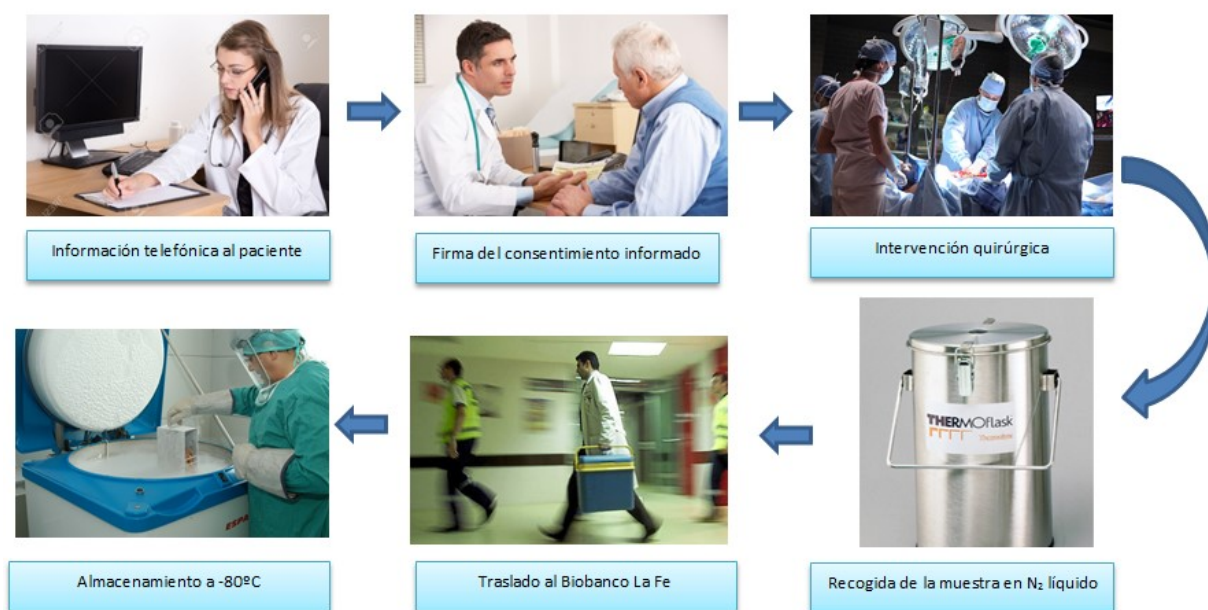


Figura 12: Procedimiento de toma de muestra de tejido vesical

3.3 Protocolo de optimización de los tejidos

En este apartado intentamos determinar qué condiciones y disolventes eran las más óptimas para llevar a cabo la extracción de los metabolitos a partir de las muestras tisulares vesicales. Para ello, tomamos diferentes condiciones en función de los tiempos de homogenización en el Precellys y diferentes disolventes. Los disolventes utilizados fueron phosphated buffered saline (PBS) 100%, metanol (MeOH) 100% y

MeOH:PBS (1:1). Para estar seguros que las variaciones que se pudiesen encontrar entre las diferentes réplicas de tejido sometidas a cada condición fueran debidas solamente a las diferentes condiciones que se estaban testando, durante todo el experimento solamente se utilizó tejido derivado de un mismo tumor de un único paciente. A continuación se detallan los materiales, disolventes y patrones a utilizar.

Materiales

Pinzas
Hielo seco
Vidrio reloj
Bisturí
Tubos *Precellys*
Eppendorfs
Nitrógeno líquido
Plantilla orden muestras
Precellys

Disolventes:

PBS 100%
PBS:MeOH 1:1
MeOH 100%
MeOH:H₂O (0,1% Ac.fórmico)

Patrones internos (4mM)

- Reserpina
- Fenilalanina –d₅
- Leucina – Enk
- Cafeína – d₉

Como sistema homogenizador se utilizó un Precellys 24 (**Figura 13**) un sistema que nos permite la trituración del tejido de manera eficiente mediante agitación de la muestra en un tubo que contiene unas bolitas que actúan como molino. El sistema está preparado para trabajar en unas condiciones de temperaturas óptimas. En nuestro caso se decidió variar la duración de los ciclos de agitación manteniendo la temperatura estable a 4°C, para ello es necesario el suministro continuo nitrógeno líquido a la cámara de agitación del Precellys.



Figura 13: Dispositivo Precellys 24. Equipado con un termómetro dentro de la cámara de homogenizado para controlar la temperatura y un dispensador de nitrógeno líquido (derecha).

3.3.1 Elección de disolvente

El objetivo de este apartado es la elección del disolvente que consiga una mayor extracción de metabolitos en las muestras de tejidos. Las diferentes muestras tisulares derivan todas de un mismo tumor extraído de un solo paciente, este tejido ha sido cortado en 9 fragmentos diferentes sobre los cuales se realizará el experimento. Los disolventes utilizados para cada fragmento de tejido son los siguientes. A su vez, introduciremos varios blancos y controles de calidad (QC) los cuales se someterán al mismo tratamiento que las muestras de tejidos

- 1) PBS 100% (tejidos 1-3)
- 2) PBS:MeOH 1:1 (tejidos 4-6)
- 3) MeOH 100% (tejidos 7-9)
- 4) Blanco 1: 350 μ L PBS 100%
- 5) Blanco 2: 350 μ L PBS:MeOH 1:1
- 6) Blanco 3: 350 μ L MeOH 100%

Procedimiento

- 1) Pesar tejido en el tubo del *Precellys* (intentar mantenerlo congelado).

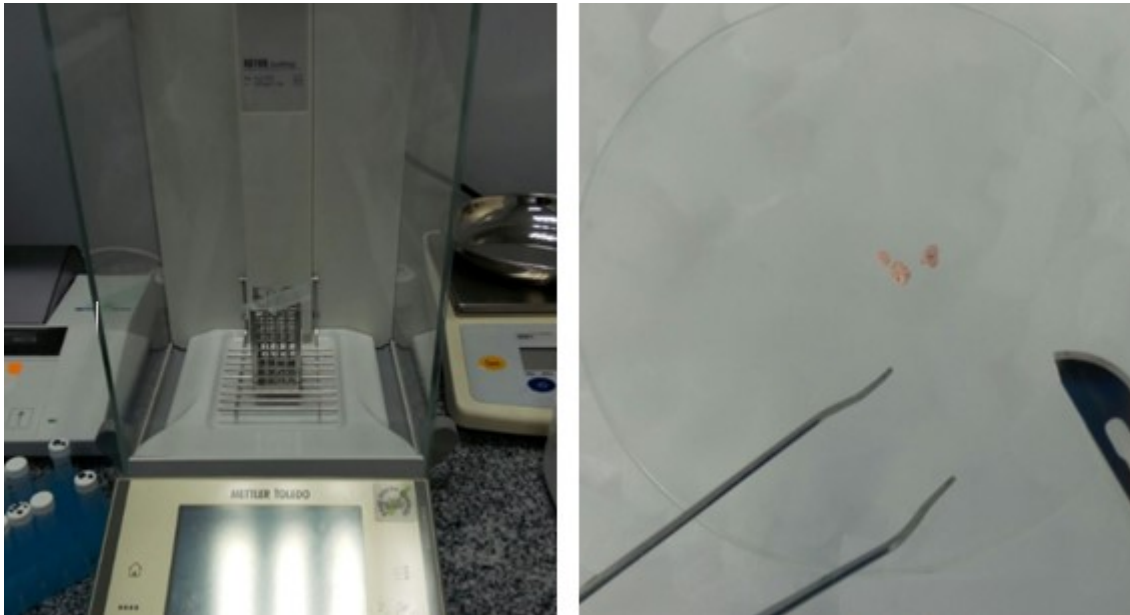


Figura 14: A) proceso de pesado e las muestras tumorales dentro del tubo de homogenización Precellys. B) Proceso de cortado de las muestras sobre vidrio de reloj en hielo seco.

- 2) Añadir el volumen correspondiente de disolvente según los mg ($25\mu\text{L}/\text{mg}$). Las cantidades de tejido pesado y la cantidad de volumen añadido se detallan en la siguiente tabla:

PBS 100%		PBS:MeOH		MeOH 100%	
Mg	μL	mg	μL	mg	μL
13,51	337,8	11,41	285,3	10,23	255,8
12,86	321,5	12,65	316,3	11,63	290,8
13,09	327,3	11,7	293	11,89	297,3

Tabla 2: Cantidades correspondientes al volumen de disolvente a añadir en función de la masa de la pieza tumoral

- 3) Introducir los tejidos con su respectivo disolvente en el homogenizador Precellys. seguidamente se someten a la homogenización en las condiciones de 4°C : 6.000rpm 3x20 y una pausa de 30s.
- 4) Recoger 230 μL de la muestra.
- 5) Centrifugar 10min, 10.000g (4°C).
- 6) Recoger sobrenadante (200 μL) y añadir la misma cantidad según condición:
- (PBS 100%) \rightarrow 200 μL MeOH (Ac.fórmico 0,1%)
 - (PBS:MeOH 1:1) \rightarrow 200 μL mix MeOH:H₂O (Ac.fórmico 0,1%)
 - (MeOH 100%) \rightarrow 200 μL H₂O (Ac.fórmico 0,1%)
- 7) Centrifugar 10min, 10.000g (4°C) .
- 8) Recoger sobrenadante (300 μL) y guardar en eppendorfs nuevos.
- 9) Montar la placa con 100 μL muestra por pocillo.

10) Añadir patrón interno: 5µL de patrón a cada pocillo.

11) Preparar 1 QC: coger 20 µL de cada pocillo y colocarlo en un único pocillo.

Observación: (En la muestra 7 en el paso 6) no habían 200 µL sino 150, así que cogimos ese volumen y añadimos 150µL H₂O (Ac.fórmico 0,1%)

3.3.2 Elección de condiciones del Precellys

A continuación y una vez decidida la combinación de PBS:MeOH (1:1) como el disolvente óptimo se realiza otro estudio con 12 tejidos derivados de un mismo tumor con el fin de determinar las condiciones óptimas de homogenización. Al igual que en el apartado anterior añadiremos un blanco por cada condición.

Condición 1) 6.000 rpm (4°C); 3 ciclos de 10s en agitación; 30s pausa entre ciclos (tejidos 1-3).

Condición 2) 6.000 rpm (4°C); 3 ciclos de 20s en agitación; 30s pausa entre ciclos (tejidos 4-6).

Condición 3) 6.000 rpm (4°C); 3 ciclos de 30s en agitación; 30s pausa entre ciclos (tejidos 7-9).

Condición 4) 6.000 rpm (4°C); 3 ciclos de 40s en agitación; 30s pausa entre ciclos (tejidos 10-12).

Blanco 1: 300µL PBS:MeOH 1:1 ;3 ciclos de 10s en agitación; 30s pausa entre ciclos.

Blanco 2: 300µL PBS:MeOH 1:1; 3 ciclos de 20s en agitación; 30s pausa entre ciclos.

Blanco 3: 300µL PBS:MeOH 1:1; 3 ciclos de 30s en agitación; 30s pausa entre ciclos.

Blanco 4: 300µL PBS:MeOH 1:1,3 ciclos de 40s en agitación; 30s pausa entre ciclos.

Procedimiento:

1. Cortar el tejido y lo pesamos en el tubo del Precellys
2. Añadir el volumen de disolvente (PBS:MeOH 1:1) correspondiente según la relación (25µL/mg). La masa del tejido pesado y su volumen añadido se detalla a continuación.

PBS:MeOH (1:1)							
Condición 1		Condición 2		Condición 3		Condición 4	
mg	µL	mg	µL	mg	µL	mg	µL
14,61	365,5	11,54	188,5	12,04	301	13,94	348,5
10,42	260,5	12,92	323	12,84	321	11,60	290
13,25	331,5	11,38	284,5	10,25	256,2	9,89	247,3

Tabla 3: Masas y volúmenes usados para evaluar las diferentes condiciones de homogenización

3. Introducir en el *Precellys* según cada condición.
4. Recoger 220µL de la muestra en eppendorfs.
5. Centrifugar: 10min 10.000g (4°C).
6. Recoger 200µL de sobrenadante y pasarlo a otro eppendorf.
7. Centrifugar: 10min 10.000g (4°C).
8. Recoger 150µL sobrenadante en eppendorfs.
9. Añadir 100µL de muestra a cada pocillo de la placa + 5µL de cada patrón interno.
10. Añadimos 5 µL de patrón interno a los blancos.
11. Preparar QC con 20 µL de cada muestra.

3.4 Análisis metabólico de tejido tumoral vesicales vs tejido sano

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el análisis de los tejidos: PBS-MeOH(1:1) como disolvente y 6.000 rpm (4°C); 3 ciclos de 10s en agitación; 30s pausa entre ciclos como condiciones de homogenización, procedimos al análisis de diferentes muestras de tejidos tumorales y sanos recogidos de 7 pacientes diferentes.

Las muestras de tejido tumoral tomadas para llevar a cabo el estudio corresponden a pacientes diagnosticados de un tumor vesical primario no invasivo (pTa-pT1). En algunos casos los tumores presentan asociado un CIS, indicando un peor pronóstico para el paciente. Los tamaños de los tumores primarios rondaron los 4-5 cm, por lo que tras la extracción de la muestra en el quirófano tuvimos suficiente tejido como para dividirlo y hacer réplicas. La cantidad de tejido tumoral usada para cada experimento estaba entre 10 y 20mg. A continuación en la tabla 4 y 5 se detallan las características clínicas, anatomo-patológicas y ambientales de las muestras recogidas.

Código	Nº de tumores	Tamaño	RTU	Estadío	Cis asociado	Primario o recidiva
191	3	4	Completa	pT1	Sí	Primario
206	2	5	Completa	pT1	Sí	Primario
203	1	0.5	Completa	pTa	No	Primario
210	3	>6	Incompleta	pT1	No	Primario
223	1	5	Completa	pT1	No	Primario
216	1	4	Completa	pTa	No	Primario
225	1	4	Completa	pT1	No	Primario

Tabla 4: Características anatómo-patológicas de los tejidos tumorales

Código	Sexo	Edad	Fumador actual Nº cigarrillos/día()	Años fumador	Nº cigarrillos (día)	Trabajo ind. química
191	Hombre	68	Sí (20)	54	50	No
206	Hombre	63	No	30	20	Sí
203	Mujer	78	No	NA	NA	No
210	Hombre	64	No	40	10	Sí
223	Hombre	86	Sí (1)	70	30	No
216	Hombre	68	No	50	15	Sí
225	Hombre	74	No	60	40	Sí

Tabla 5: Factores ambientales correspondientes a los donantes de las muestras

Las muestras tumorales y sanas utilizadas fueron las siguientes:

Nº muestra T TUMOR	Peso (mg)	Volumen añadir (µL)
191.1	11,65	291
191.2	19,67	492
206.1	8,33	208
206.2	9,65	241
203.1	11,44	286
203.2	18,08	452
210.1	15,42	386
210.2	16,12	403
216.1	11,58	290
223.1	19,64	491
223.2	19,85	496
223.3	7,64	191
225.1	16,55	414
225.2	16,55	414

Tabla 6: Volumen de disolvente a añadir a cada muestra en función de su masa durante el cortado de la pieza tumoral

Nº muestra T SANO	Peso (mg)	Volumen añadir (µL)
191.1	12.08	302
191.2	11.28	282
202.1	7.99	200
202.2	8.88	222
203.1	12.25	306.25
203.2	13.45	336.25
210.1	9.32	233
210.2	10.6	265
216.1	8.89	222.25
216.2	8.58	214.25
223.1	16.52	413
223.2	12.9	322.5
225.1	14.62	365.5

Tabla 7: Volumen de disolvente a añadir a cada muestra en función de su masa durante el cortado de la pieza sana

Procedimiento:

- 1) Añadir el volumen de disolvente (PBS:MeOH 1:1) correspondiente (25µL/mg)
- 2) Percellys 6.000 rpm (4°C); 3 ciclos de 10s en agitación; 30s pausa entre ciclos
- 3) Recoger 220µL de la muestra en eppendorfs.
- 4) Centrifugar: 10min 10.000g (4°C)
- 5) Recoger 200µL de sobrenadante y pasarlo a otro eppendorf
- 6) Centrifugar: 10min 10.000g (4°C)
- 7) Recoger 150µL sobrenadante en eppendorfs
- 8) Añadir 100µL de muestra a cada pocillo de la placa + 5µL de patrón interno
- 9) Añadimos 5 µL de patrón interno a los blancos, que se han tratado como si fuesen una muestra más)
- 10) Preparar QC con 20 µL de cada muestra

Una vez llegados a este punto las muestras que ya se encuentran en su placa de medición se introducen en el espectrómetro de masas en combinación con un HPLC. Las condiciones del instrumento que se utilizaron para llevar a cabo las medidas se detallan en el siguiente apartado.

3.5 Condiciones del espectrómetro de masas

3.5.1 Reactivos y materiales

Todos los disolventes utilizados en UPLC-MS fueron comprados a Scharlau (Barcelona, España). El agua ultrapura fue generada con un sistema de purificación de agua Mili-Q (Merck Milipore, Darmstadt, Alemania). Los estándares internos usados en el UPLC-TOF fueron : Fenilalanina-D₅ (Cambridge Isotopes laboratory INC., Andover, MA, USA), cafeína-D₉ (Toronto Research Chemicals, Toronto, Ontario, Canada), leucina encefalina y reserpina (Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, España). El ácido fórmico \geq 95% fue obtenido de Sigma Aldrich Quimica SA.

3.5.2 Análisis UPLC- QTOF

Tanto las condiciones análisis mediante UPLC-QTOF llevado a cabo para determinar la optimización del disolvente como el usado para determinar diferentes patrones metabólicos entre tejidos tumorales y sanos fueron las mismas. El análisis cromatográfico fue llevado a cabo en un instrumento Agilent 1290 Infinity UPLC Chromatograph usando una columna UPLC BEH C₁₈(100x2.1 mm, 1.7 μ m, Waters, Wexford, Ireland). Las temperaturas usadas en el autosampler y la columna fueron de 4°C y 40°C respectivamente y el volumen de inyección fue de 4 μ L.

El gradiente de elución fue llevado a cabo con un ratio de flujo de 400 μ L min⁻¹ como se detalla a continuación: Las condiciones iniciales fueron del 98% para la fase móvil A (H₂O (0,1% v/v HCOOH)) se mantuvieron durante 5,5 min, seguidas de un gradiente lineal desde 2% al 20% de la fase móvil B (CH₃CN(0,1% v/v HCOOH)) en el minuto 3,5y desde un 20 % hasta el 95% en el minuto 4. El 95% de la fase móvil B se mantiene durante un minuto y después, se usa un gradiente durante 0,25 minutos para restaurar las condiciones iniciales de la columna, el cual se mantuvo durante 2,75 min.

Se llevó a cabo un escaneado de las relaciones m/z desde 100 hasta 1700 con una frecuencia de escaneado de 6Hz mediante el uso de un detector cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) y un espectrómetro Agilent 6550 (Agilent Technologies, CA, USA) en el módulo TOF-MS.

En cuanto a la ionización se utilizó un sistema de electrospray cuyas condiciones se detallan a continuación. La temperatura del gas fue de 200°C, el gas secante 14L/min, nebulizador de 37psig, la temperatura del gas envolvente fue de 350°C con un flujo de 11L/min.

A su vez se llevó a cabo una recalibración automática durante el análisis introduciendo un estándar de referencia en la muestra usando los compuestos 149.02332 (contaminante de fondo), 121.050873 (purina) y 922.009798(HP-0921)

como referencias de m/z . Esto nos proporciona una medida de la precisión con la que se ha llevado a cabo el análisis en un rango de 5 ppm. La adquisición de los datos fue randomizada y las muestras de QCs fueron analizadas cada 5 inyecciones con el objetivo de monitorizar y corregir los cambios que se pudieran dar en el instrumento.

3.6 Selección de picos en el UPLC-TOFMS

Los datos en crudo se organizan en una serie de tablas de picos generadas mediante el software XCMS. Posteriormente estas tablas fueron convertidas a un formato mzXML usando el software Proteo Wizard.

(<http://proteowizard.sourceforge.net>)

El método utilizado para la selección de los picos fue llevado a cabo con los siguientes parámetros: $ppms=15$, $peakwidth=(6,20)$, $snthresh=25$. Una diferencia mínima de 5 mDa en la m/z fue la seleccionada para diferenciar picos con tiempos de retención solapantes. Los valores de intensidad para cada carácter fueron calculados usando la función $wMean$.

El agrupamiento de picos fue llevado a cabo usando el método del “pico más cercano” usando un $mzVsRT=1$ y un tiempo de retención (RT) de 6s y tolerancias de 5 mDa. Después del agrupamiento de los picos se llevó a cabo un método de $fillPeaks$ con los parámetros predefinidos para llenar todos los datos de los picos perdidos.

Finalizado el proceso de integración cromatográfica, de-convolución y alineamiento los datos correspondientes a los picos se ordenaron en unas tablas en función de su m/z - RT y fueron importados a MATLAB R2011a (Mathworks Inc., Natick, MA, USA) para su análisis.

La precisión en la integración de los picos fue evaluada mediante la comparación automática y manual de los resultados de integración de los estándares internos. Las muestras de los blancos fueron usadas para identificar y eliminar señales de fondo correspondientes a contaminantes de la muestra impurezas de los disolventes etc.. Para ello se eliminaron las señales que no eran al menos 10 veces superiores a la señal que provenía del blanco.

3.7 Pretratamiento de los datos

Una vez se ha realizado la medición de las muestras de tejido en el espectrómetro de masas se obtiene un conjunto de datos organizados en una matriz de m filas x n columnas. Donde m es el número de muestra incluyendo los blancos y los QCs mientras que en las columnas tenemos todos los metabolitos obtenidos. Estos metabolitos se encuentran clasificados en función del tiempo de elución obtenido en el HPLC junto con una relación m/z obtenida en el espectrómetro de masas. Los elementos de la matriz son las diferentes áreas de los picos de elución obtenidos.

En un primer lugar los datos son cargados en el programa MATLAB vs2011 como una matriz tal y como se ha descrito anteriormente. Esta matriz fue acotada para obtener solo valores de m/z inferiores a 600.

- Seguidamente es necesario un tratamiento de los datos, para ellos existen un gran multitud de posibles métodos. El tratamiento previo que le demos a estos datos condicionara en gran medida el resultado final que obtengamos. Con este proceso intentaremos corregir una serie de factores como puede ser las diferencias en órdenes de magnitud entre concentraciones de metabolitos que, desde un punto de vista biológico, aquellos presentes en altas concentraciones no son necesariamente más importantes que los que se encuentran en concentraciones más bajas. También debemos tener en cuenta que los metabolitos que se encuentren en el metabolismo central tienen una menor fluctuación que aquellos correspondientes a rutas secundarias, además algunos metabolitos sufren de grandes variaciones bajo las mismas condiciones experimentales (variación biológica no inducida)(67)
- Se llevaran a cabo 3 procesos de centrado de los datos, en un primer lugar los datos serán centrados en torno a la media, este método sustrae la media a cada una de las medidas de una variable, de manera que solo tenemos la variabilidad presente entre las muestras. Otra posibilidad es el autoescalado en el cual después de un centrado en torno a la media, cada elemento de la matriz es dividido por la desviación estándar de manera que la nueva la desviación estándar es 1 siendo todos los metabolitos igualmente importantes. Por último se puede llevar a cabo un escalado de Pareto en el cual los datos una vez centrados son divididos por la raíz de la desviación estándar, de manera que los datos están más cerca de su valor real, sin embargo este método es más sensible a variaciones muy grandes entre los datos.

3.8 Búsqueda de metabolitos

Para buscar que metabolitos se asocian con cada masa hacemos uso del software online METLIN (metlin.scripts.edu). Seleccionamos Batch en la página principal y colocamos en la ventana de masa nuestro valor. Seleccionamos positivo como tipos de iones generados y todas las combinaciones posibles de ionización positiva. La tolerancia por defecto es de 30 ppm que es generalmente aceptable para experimentos Q-TOFs(68), sin embargo para cometer menor error se ajustó a una tolerancia de 5 ppm. (**Figura 15**)

METLIN: Metabolite Search

Batch

[Simple \(Saved Searches\)](#) | [Advanced](#) | [Batch](#) | [Fragment](#) | [Neutral Loss](#) | [MS/MS Spectrum Match](#) | [Unknowns](#)

Masses:

Charge:

Accuracy (ppm):

Display Structure:

Remove peptides from search:

*To select multiple Adducts:
 - Hit Ctrl + Adducts
 - Hit Command + Adducts
 Select: all | none

[Find Metabolites](#) [Restablecer](#)

(74.036 - 74.0371 daltons): 7 Metabolites [M+K]⁺

MetlinID	Mass	Δ ppm	Name	Formula	CAS	MS/MS	Structure
3214	74.0368	2	Lactaldehyde	C3H6O2	598-35-6	NO	
3215	74.0368	2	Propionic acid	C3H6O2	79-09-4	View	
64743	74.0368	2	Hydroxyacetone	C3H6O2	116-09-6	NO	

Figura 15: Ejemplo de búsqueda de metabolitos en la base de datos METLIN.

4. Resultados y discusión

4.1 Resultados Optimización del protocolo de tejidos

Como se ha comentado anteriormente en el apartado de materiales y métodos, a partir de una única muestra de tumor llevamos a cabo el experimento en diversas condiciones previas con el fin de averiguar cuáles eran las más eficientes en la extracción de metabolitos. En la **Figura 16** podemos ver que las gráficas muestran por una parte que el disolvente preferente para la extracción de un mayor número de metabolitos es el PBS:MeOH porque con una menor desviación estándar relativa entre las diferentes réplicas de tejido observamos un mayor número de metabolitos. En el caso de las condiciones del Precellys vemos que se siguió el mismo procedimiento. El número de metabolitos encontrado fue representado en función del porcentaje de desviación estándar entre la integración del área de los picos en las diferentes réplicas. Como resultado podemos decir que se eligió los 10s de agitación por ser la condición que mayor número de metabolitos consiguió encontrar con un menor porcentaje de desviación estándar relativa.

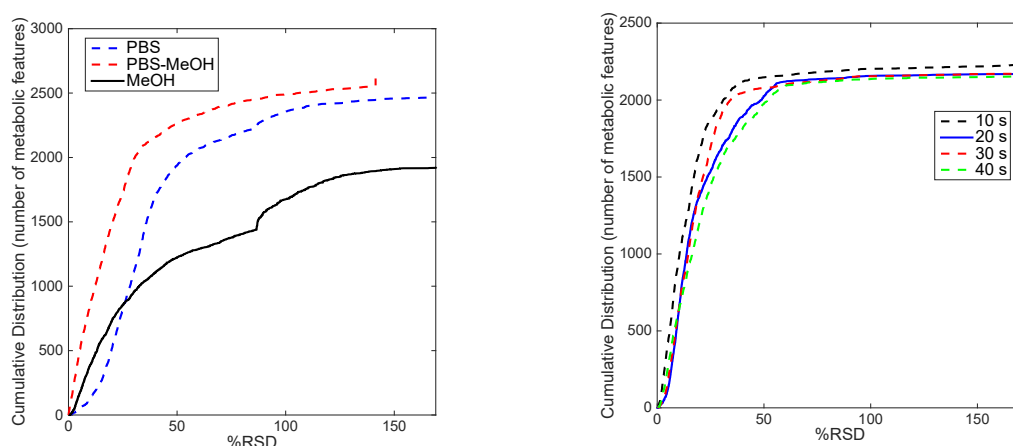


Figura 16: Metabolitos encontrados vs % RSD en función del disolvente utilizado y el tiempo de agitación en el homogenizador

El siguiente diagrama de Venn (**Figura 17**) muestra la cantidad de metabolitos encontrados según cada disolvente. Como podemos ver la combinación de PBS-MeOH (1:1) proporciona una cantidad de metabolitos muy similar al PBS 100% por sí solo (92%). El uso de MeOH 100% únicamente genera un 46% de los metabolitos encontrados con PBS y un 44% de PBS-MeOH. Por ello elegiremos como disolvente el PBS:MeOH(1:1) ya que es el que más metabolitos es capaz de extraer (2613). Existen a su vez 1144 metabolitos comunes entre PBS:MeOH (1:1) y MeOH 100% que podrían extraerse de las muestras usando cualquiera de los tres disolventes.

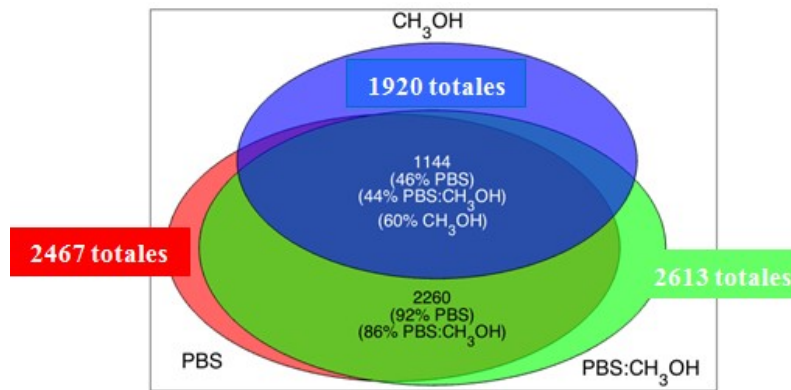
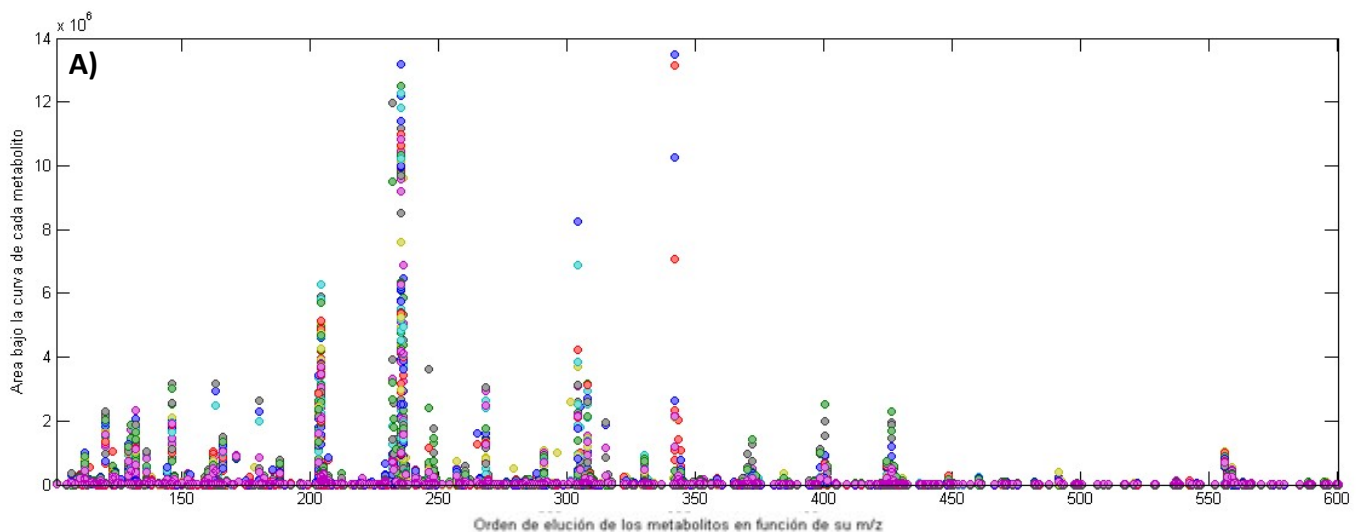


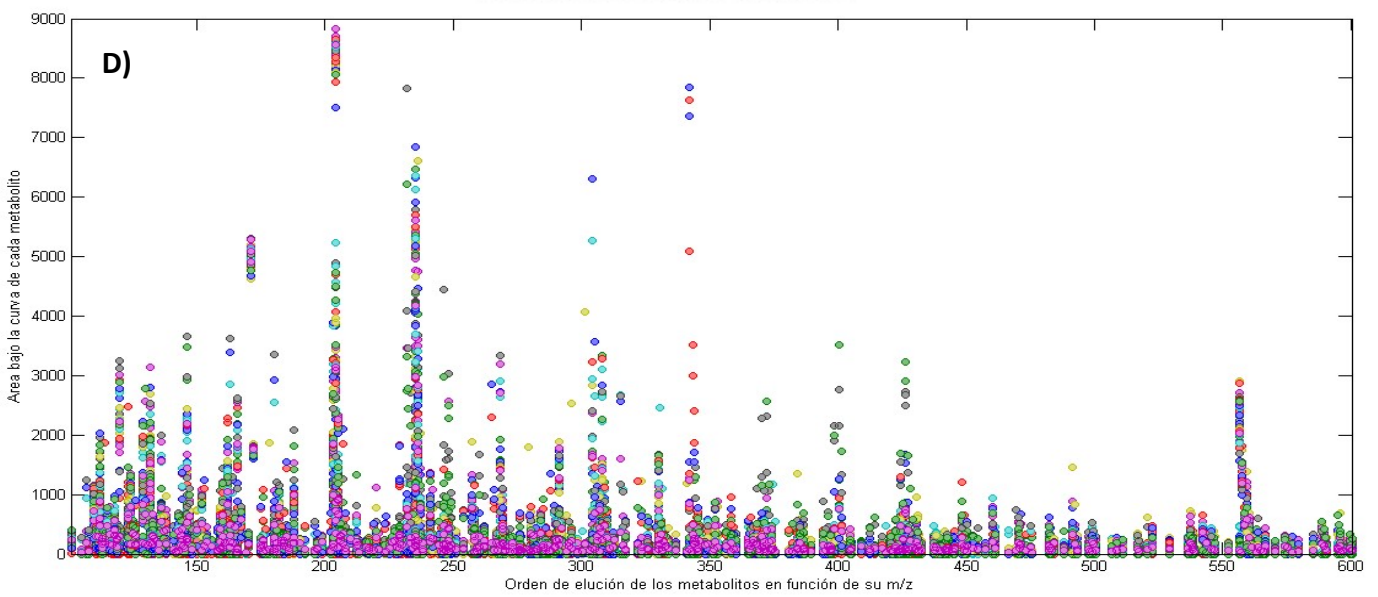
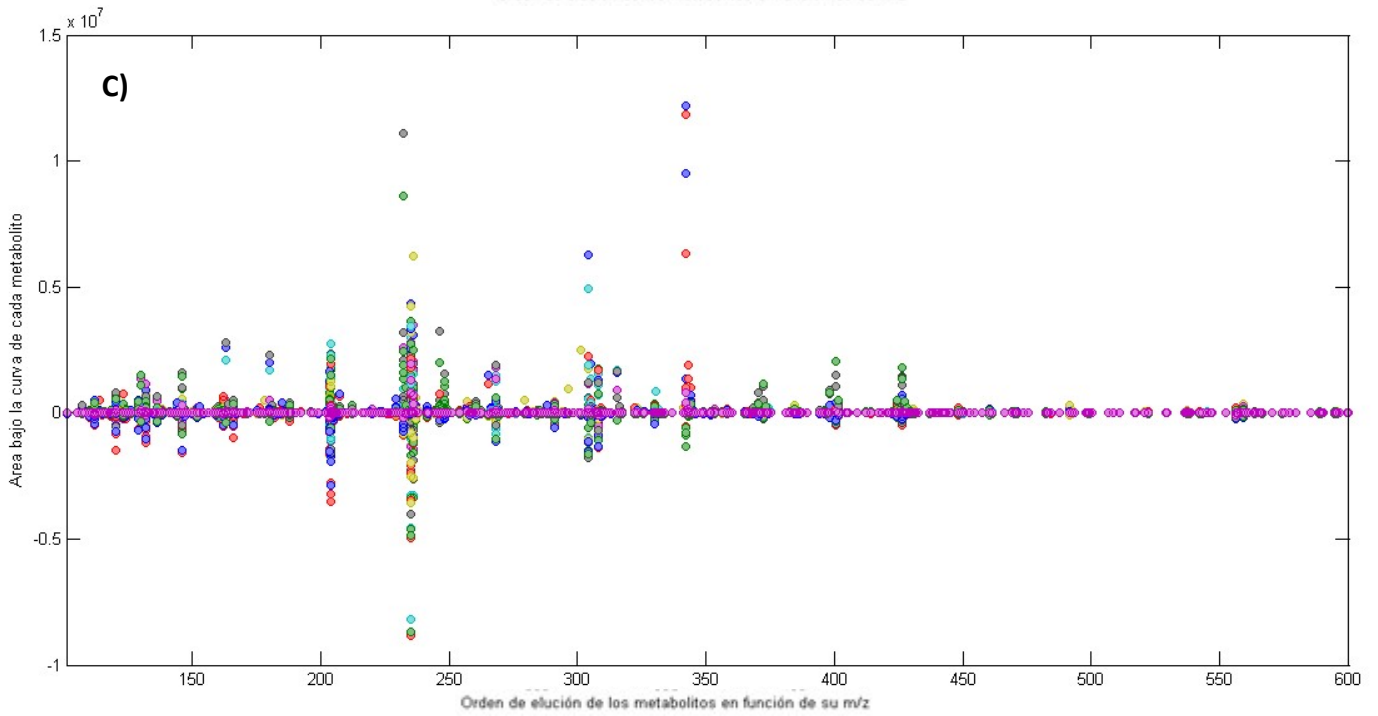
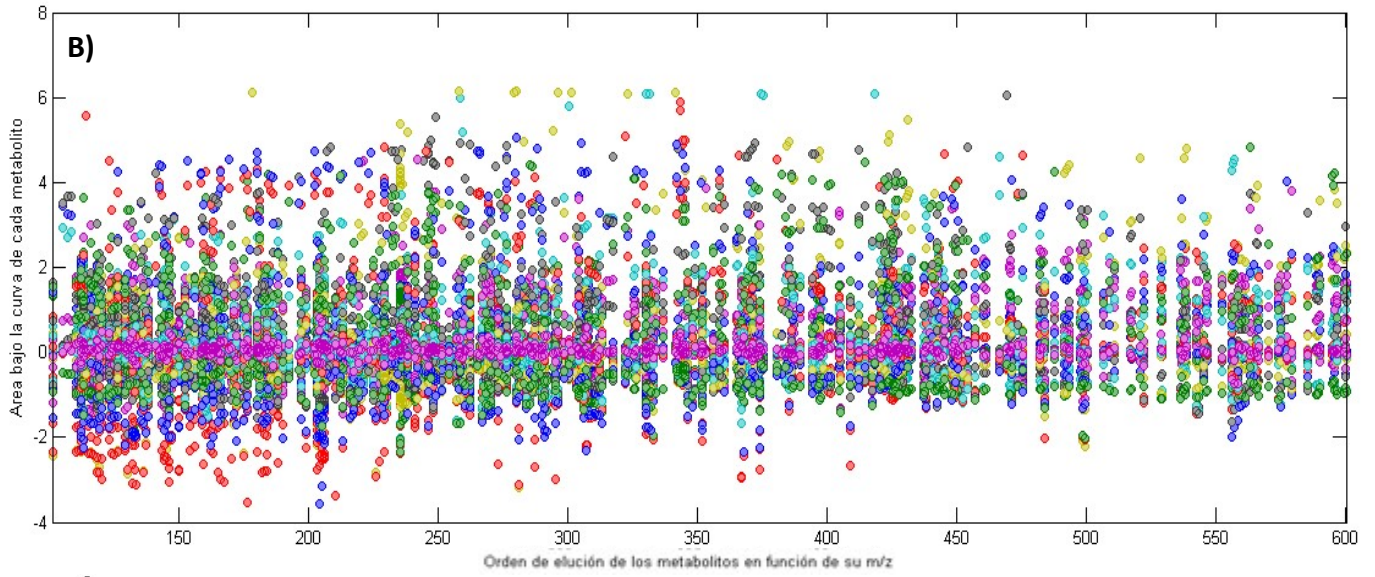
Figura 17: Diagrama de Venn sobre los metabolitos encontrados por cada disolvente.

4.2 Resultado del análisis de tejidos tumoral vs no tumoral

4.2.1 Resultados de los pretratamientos de los datos

A continuación se presentan las gráficas obtenidas como resultado de los diferentes procesos de pretratamiento de los datos. En ellas podemos ver todos los metabolitos encontrados una vez han sido filtrados y considerados como ruido o contaminantes por comparación con los blancos. Las gráficas muestran cada uno de los metabolitos encontrados en el orden de elución correspondiente y el área del pico del mismo. Como puede observarse las diferencias existentes entre los datos sin escalar (**Figura 18A**) o simplemente con un centrado en torno a la media (**Figura 18B**) son del orden de 10^7 , mientras que en el escalado de Pareto descenden a 10^4 (**Figura 18D**) y en el autoescalado es apenas de 10 (**Figura 18C**)





● QC01	● QC02	● QC05	● T191-T1
● T210-NT2	● QC03	● T210-T1	● T206-T1
● T216-NT1	● T191-NT1	● T203-T2	● QC08
● T206-NT2	● T206-NT1	● T216-NT2	● T216-T1
● QC04	● T223-T1	● T210-NT1	● T223-T3
● T203-NT1	● T223-NT2	● BLANK1	● T203-T1
● T206-T2	● QC07	● QC06	● T225-T1
● T210-T2	● T223-NT1	● T191-NT2	● QC09
● T225-NT1	● T223-T2	● T191-T2	● QC10
● T225-T2	● T203-NT2	● BLANK2	● QC11

Figura 18: Proceso de escalado de los datos. Pueden verse los datos A) sin procesar B) centrados en torno a la media de los valores C) autoescalado D) escalado de Pareto E) código de colores para cada una de las muestras donde T son las muestras de tejido tumoral, NT los no tumorales BLANK los blancos y QC los controles de calidad

4.2.2 Análisis de componentes principales PCA

Una vez que tenemos los datos escalados de diferentes maneras, procedemos a ver las gráficas que nos muestran la separación en grupos de las muestras según los diferentes componentes principales (PC) que tenemos. Las figuras obtenidas se han calculado con el número de PCs que sugiere el propio programa. En la primera gráfica(**Figura 19A**) donde los datos se encuentran sin escalar podemos ver que la separación realizada entre las dos primeras componentes no es capaz de diferenciar correctamente los grupos de tumorales y no tumorales.

En la **Figura 19B**, en la cual se ha realizado un centrado de los datos en torno a la media, vemos que empiezan a diferenciarse los datos ligeramente en torno a el primer y segundo componente, sin embargo muchas de las muestras se encuentran juntas y sin diferenciar. En la **Figura 19D** donde se ha realizado el escalado de Pareto podemos ver ya hay una clara separación de las muestras tumorales y no tumorales en torno a la segunda componente.

La **Figura 19C** donde hemos realizado una operación de autoescalado muestra una separación triple entre los no tumorales, tumorales y QCs mientras que los blancos se muestran separados de todos los grupos situándose por debajo de la segunda componente. El método de escalado que utilizaremos será entonces el de autoescalado ya que es el modelo que consigue una mejor separación de los datos.

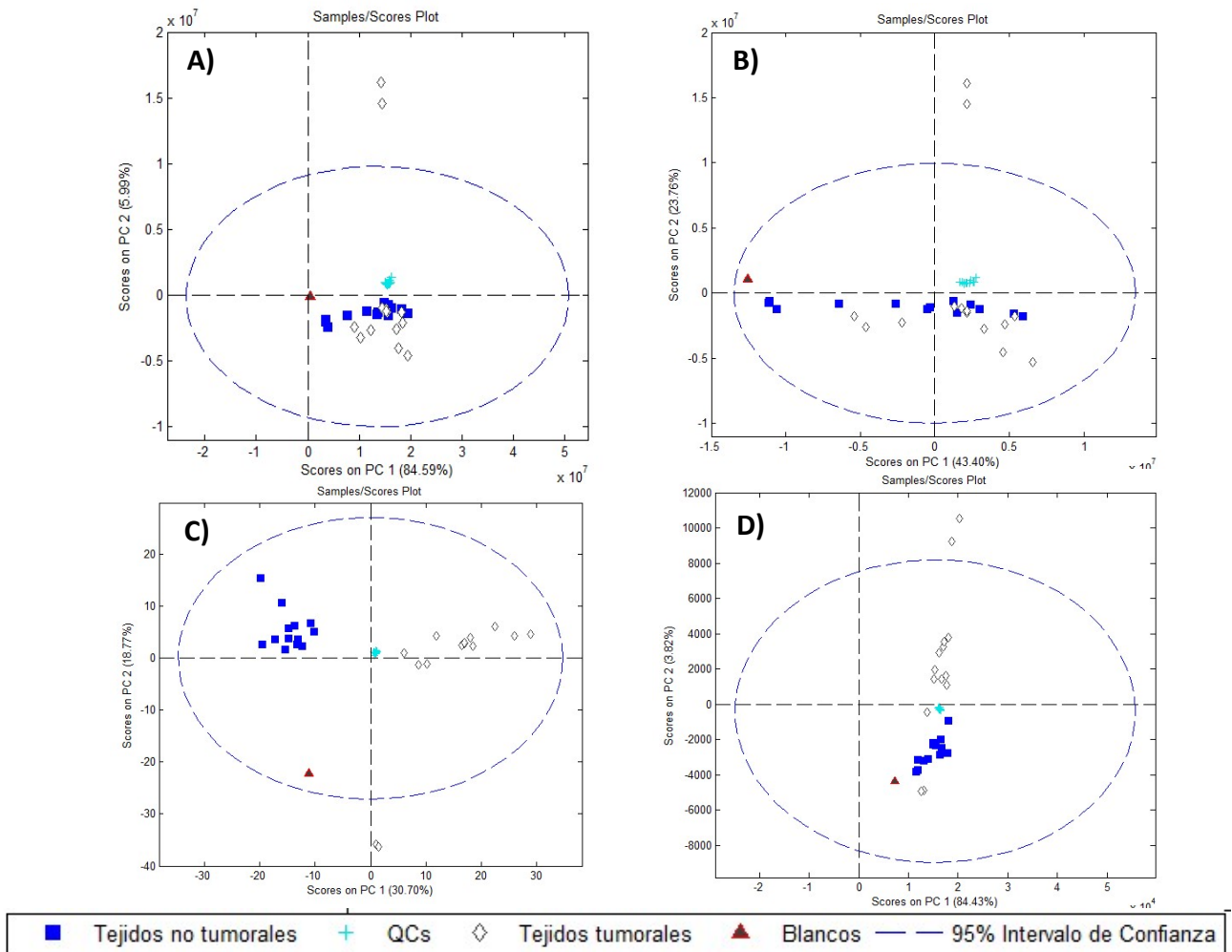


Figura 19: Gráficas de las muestras en función de su primera y segunda componente principal. A) Datos sin procesar B) Datos centrados en torno a la media C) Datos autoescalados D) Datos con escalado de Pareto

4.2.3 Detalles del modelo construido

A continuación se detalla los datos correspondientes al modelo construido. En la Tabla 8 podemos ver las características numéricas de este donde se detallan el valor propio de la matriz de covarianza de cada componente, el % de varianza que explica cada uno de ellas, la varianza acumulativa de las componentes hasta ese momento y el RMSECV (root mean square error of cross validation). Como puede observarse nuestro modelo utiliza las 3 primeras componentes las cuales pueden explicar un 59.84% de toda la información.

	Eigenvalue of Cov(X)	% Variance This PC	% Variance Cumulative	RMSEC	RMSECV	
1	1.81e+002	30.70	30.70	0.822	37.72	
2	1.10e+002	18.77	49.47	0.7019	35.98	current
3	6.10e+001	10.37	59.84	0.6258	34.61	suggested
4	3.65e+001	6.21	66.05	0.5753	34.31	
5	3.47e+001	5.90	71.95	0.5229	33.64	
6	2.64e+001	4.49	76.44	0.4792	33.36	
7	2.42e+001	4.11	80.56	0.4354	32.93	

Tabla 8: Valores numéricos del modelo. Incluyendo el valor propio de la matriz de covarianza de cada componente, la varianza individual y acumulativa y el error en forma de RMSEC y RMSECV.

4.2.4 Elección del número de componentes

Aunque ya hemos visto los resultados generados con un número de componentes sugerido por el programa debemos asegurarnos de que es el correcto. Generalmente cuanto más componentes tenga un modelo mayor cantidad de información conseguiremos explicar de nuestros datos, sin embargo a veces dos componentes explican la misma información o la disminución de la variabilidad que explica una variable es prescindible(69).

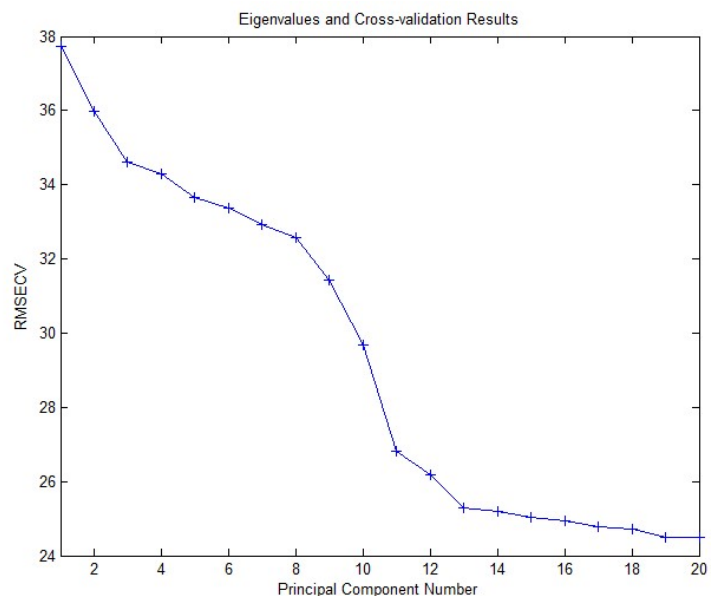


Figura 20: Representación del error RMSECV frente al número de componentes del modelo

La gráfica de RMSECV frente al número de componentes principales (**Figura 20**) refleja el proceso en el que los datos se dividen en paquetes de igual tamaño, y se reconstruye el modelo con todos los paquetes salvo uno. Este último paquete se utiliza para comprobar el modelo. El error se representa en función de las componentes principales mostrándonos la forma en la que disminuye conforme añadimos componentes al modelo. Vemos como el error en el modelo construido apenas disminuye después de la tercera componente añadida, salvo en el caso de añadir hasta 9 componentes en el que sí vemos una disminución importante, sin embargo con 3 componentes principales se produce una separación óptima de los grupos por lo cual se elegirá este número para el análisis. Generalmente porcentajes de covarianza inferiores a 1 no son añadidos al modelo ya que se consideran cantidades prescindibles.

4.3 Búsqueda de metabolitos

Como se puede apreciar en el análisis de componentes principales efectuado en los apartados anteriores se consigue una separación correcta de los grupos en el caso de utilizar un pretratamiento de autoescalado para los datos. En este modelo las muestras correspondientes a los tejidos tumorales se situaban más a la derecha de la primera componente principal con los valores más altos. Por ello se lleva a cabo una inspección de las entidades químicas encontradas o “loadings” para ver cómo se distribuyen estos en torno a las componentes principales (**Figura 21**)

Para comprobar cuáles son los metabolitos más contribuyentes en la primera componente principal podemos representar la PC1 vs PC1 y elegir los puntos que se encuentren en una posición superior derecha de la recta.

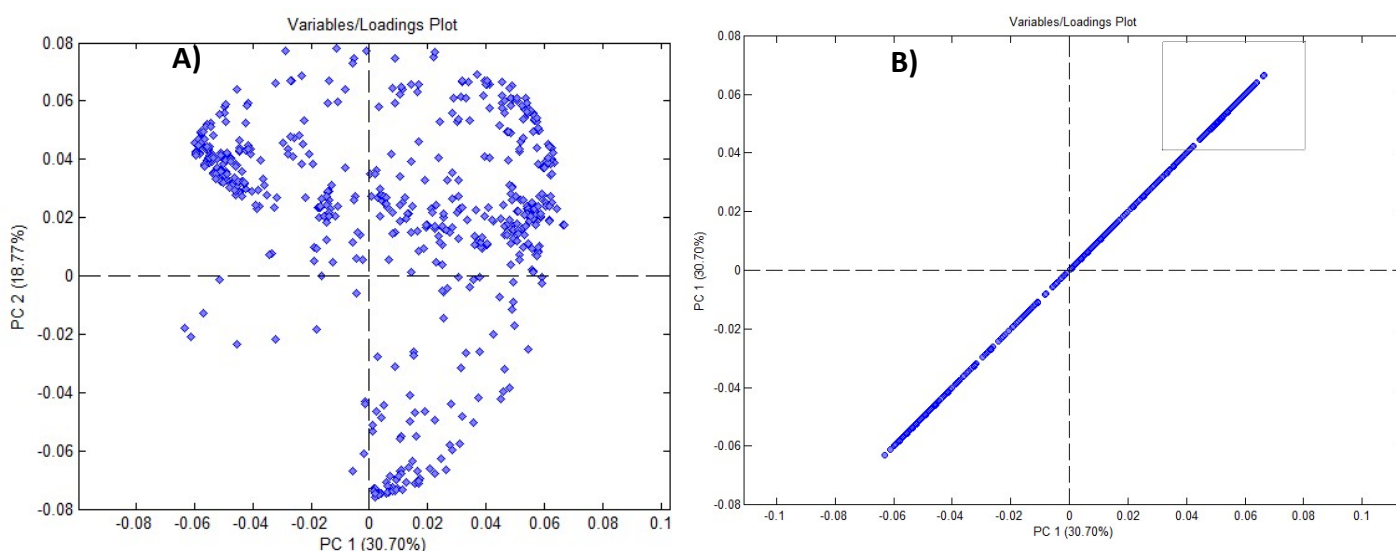


Figura 21: Representación de metabolitos en de sus componentes principales A) Representación de los loadings o entes químicos en función de la primera y la segunda componentes principal B) Representación de los loadings en función de su primera componente principal.

Una vez tenemos esta disposición de las variables en torno a la primera componente principal seleccionamos la opción de mostrar la masa de los 10 metabolitos más influyentes en la primera componente ya que estos son los que más desplazan el resultado hacia el grupo de tejidos tumorales por lo tanto son aquellos que se encuentran asociados al fenotipo tumoral. También se llevó a cabo el estudio de metabolitos asociados al fenotipo no tumoral y a las dos muestras de tejido tumoral que se muestran separadas del resto.

4.3.1 Identificación de metabolitos encontrados

A continuación se detallan los metabolitos encontrados mediante el proceso de búsqueda con la base de datos online METLIN detallado en el apartado de materiales y métodos.

<u>m/z</u>	<u>lón</u>	<u>Δppm</u>	<u>Fórmula</u>	<u>Nombre</u>
424,3421	M+H	0	C25H45NO4	Linoelaidyl carnitine
108 compuestos mas	M+H	0	C25H45NO4	Linoleyl carnitine
397,3141	M+K	4	C17H12Cl2N4O	α-Hydroxytriazolam
	M+K	4	C17H12Cl2N4O	4-Hydroxytriazolam
	M+2Na+H	4	C17H14Cl2O4	Bisphenol A bis(chloroformate)
184,9605	M+K	3	C5H7NO4	2-Keto-glutaramic acid
	M+K	3	C5H7NO4	4-Oxoglutaramate
396.3102	M+ACN+H	1	C21H38O4	Lynoleil-glycerol
49 Compuestos mas	M+CH3OH+H	1	C22H37NO3	oxy-Arachidonoyl Ethanolamide
330.0742	M+Na	3	C10H17N3O6S	Glutathion
	M+Na	3	C10H17N3O6S1	Combinaciones de 3 Aa: Ala-Cys-Asp Glu-Cys-Gly
296.0656	M+H	4	C8H14N3O7P	5-Aminoimidazole ribonucleotide
14 compuestos mas				
112.9997	M+H	1	CH5O4P	Hydroxymethylphosphonate
	M+K	2	C3H6O2	Lactaldehyde
	M+K	2	C3H6O2	Propionic Acid
	M+K	2	C3H6O2	Hidroxiacetone
422.3259	M+Na	4	C23H45NO4	Palmitoyl-L-Carnitine
67 compuestos				

mas				
281.0935	M+K	1	C16H18O2	Bisfenol B
27 compuestos más				
116.0707	M+H	0	C5H9NO2	l-prolina
41 compuestos mas				

Tabla 9: Metabolitos encontrados en función de su relación m/z usando el software online Metlin.

4.4 Discusión de los resultados

En relación a la serie de metabolitos de la **tabla 9** asociados en mayor medida con la primera componente es necesario aclarar que en aquellos casos en los que la relación m/z introducida en METLIN proporciona más de un resultado no podemos decir con seguridad cuál de ellos es el correcto ya que no contamos con los espectros de fragmentación. En el caso de que se quisiera comprobar la presencia concreta de algún metabolito sobre el resto sería necesario llevar a cabo un experimento MS/MS para obtener el espectro de fragmentación. Generalmente se obtuvo una o varias fórmulas moleculares de compuestos asociados a la masa introducida que a su vez pueden corresponder a diferentes compuestos.

A su vez en algunos casos los picos buscados correspondían al mismo compuesto pero con otro tipo de ionización diferente. Por ejemplo en el caso del glutatión correspondía al 5º metabolito más influyente con una relación m/z de 330.0742, sin embargo también aparecía un pico en 7º lugar correspondiente a la relación con una relación m/z 16 unidades superiores, la explicación de esto se debe a que la primera corresponde al compuesto [M+Na] mientras que el segundo es [M+K].

En primer lugar de la tabla puede observarse la presencia de linoleil-carnitina y linoelaidil carnitina así como otras formas de carnitina en las últimas posiciones de la tabla. La carnitina es esencial en la beta oxidación de ácidos grasos, facilitando la entrada de estos en la mitocondria, y cuyo producto final es acetil-CoA (**Figura 22**). Así pues, niveles alterados de especies de carnitina evidencian que la beta oxidación de ácidos grasos se encuentra alterada en el cáncer de vejiga(70). Este hecho ya había sido

visto en estudios anteriores(63). Un aumento de la glicolisis junto con una desincronización con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) puede dar lugar a una acumulación de acetil-CoA. También se encuentra estudiado un aumento de cuerpos cetónicos en pacientes diagnosticados con cáncer de vejiga debido a una derivación secundaria del acetil-CoA una vez se encuentra saturado el ciclo de Krebs por falta de oxalacetato, lo que podría explicar la aparición de hidroxiketona en nuestros resultados. Aunque el metabolismo anaeróbico de la glucosa se plantea como una vía clave para la obtención de ATP en tejidos tumorales, estos resultados apoyarían una mayor inclinación de estos tumores por una vía aeróbica (71). A su vez un posible aumento de glicerol en las muestras tumorales podría indicar un consumo de triglicéridos para la obtención de energía ya que este es el producto final de su metabolismo. También se han visto aumentados niveles de lípidos como el araquidonato en cáncer vesical.

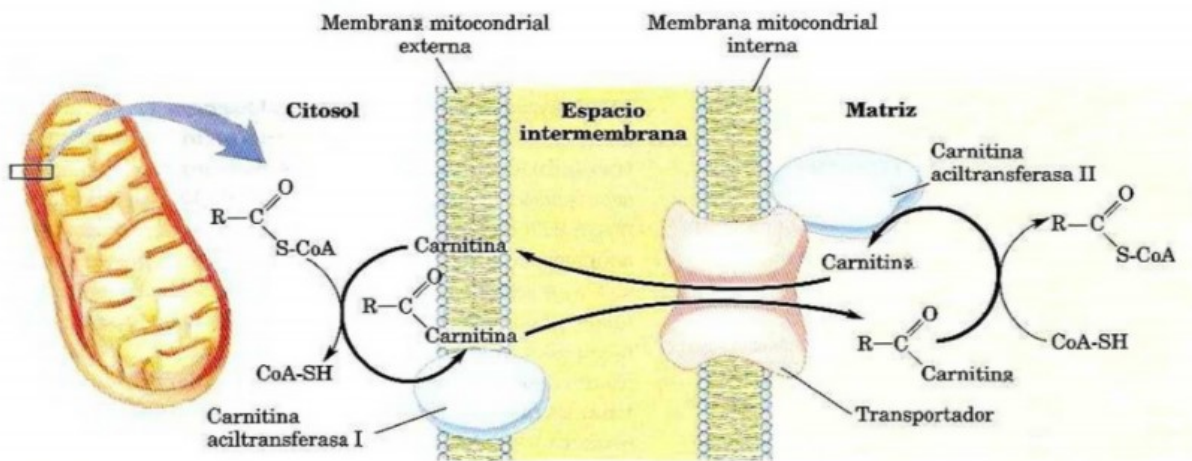


Figura 22: Imagen de la carnitina ejerciendo su función como transportador de ácidos grasos a la mitocondria. Imagen tomada de: <https://biochemist01.wordpress.com>

El siguiente en la lista de los metabolitos que aparecen correlacionados al fenotipo tumoral tenemos el hidroxitriazolam y el bisfenol A. El hidroxitriazolam es la forma hidroxilada del triazolam una benzodiazepina utilizada como sedante, mientras que el Bisfenol A es un tipo de policarbonato usado para la fabricación de plásticos por lo que se supone que este no es un metabolito que esté presente en tejido tumoral

También vemos un aumento de la concentración de oxoglutarato o alfa-cetoglutarato presente en las células tumorales. Este metabolito es un intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y está comprobado que puede encontrarse aumentado en los tumores de vejiga. Este intermediario a su vez interviene en otras vías como puede ser la síntesis de aminoácidos como la glutamina o como precursor de metabolitos reguladores en hipoxia mediante modificaciones epigenéticas o contribuir al estrés redox. (76)

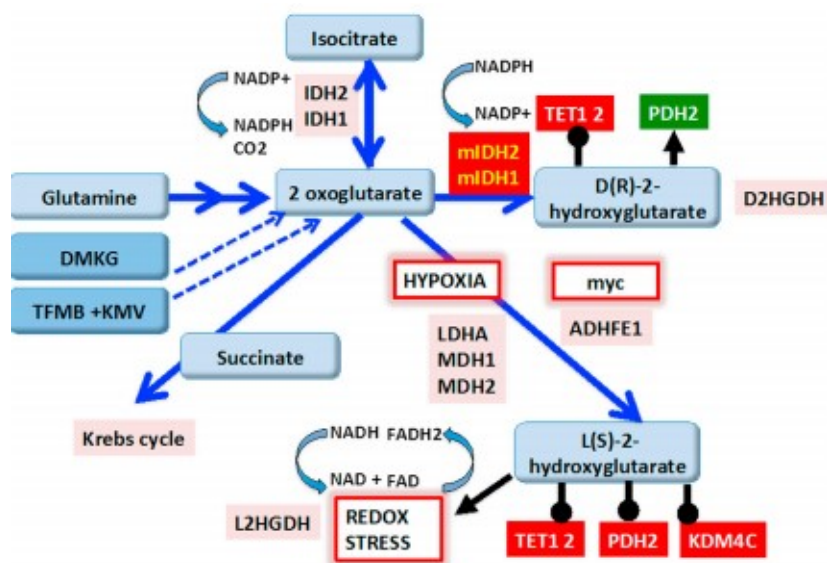


Figura 23: Metabolismo del oxoglutarato en condiciones normales, de mutación de la IDH1 y 2 o en condiciones de hipoxia. Imagen tomada de: Harris AL. A New Hydroxy Metabolite of 2-Oxoglutarate Regulates Metabolism in Hypoxia. Cell Metab . Elsevier Inc.; 2015;22(2):198–200

En el caso del glutatión hemos podido comprobar que se encuentra elevado en especies tumorales. Ciertos estudios revelan que su concentración se encuentra hasta 6 veces aumentada en líneas celulares modelos de cáncer de vejiga como UCRU-BL-13 y -17(63). La sobreexpresión del glutatión así como de ciertas enzimas antioxidantes es crucial para la supervivencia de las células tumorales bajo el estrés oxidativo en las que se encuentran.

Además del cáncer de vejiga el aumento de glutatión es un marcador de células tumorales en general, lo que significa que no es algo específico para cáncer de vejiga. De hecho el glutatión se encuentra con unos niveles similares en otros tipos de cáncer como puede ser el cáncer de mama(77), de riñón(78), pulmón(79), hígado(80) y próstata.(81)

EL 5 aminoimidazol ribonucleotido es un intermediario que se encuentra en la ruta de síntesis de las purinas.(AIR). Su síntesis proviene de la formilglicinamida-ribonucleótido mediante la acción de la AIR sintetasa y el gasto de una molécula de ATP. El rápido crecimiento de las células tumorales puede dar lugar a desregulaciones existentes en el metabolismo de nucleótidos(82) como en este caso y podrían provocarse acumulaciones en las rutas de síntesis de novo de purinas necesarias para la replicación celular.

En cuanto a las muestras de tejido que aparecían separadas del resto de tejidos tumorales puede observarse que cuentan con un perfil metabólico bastante diferente. Estos tejidos correspondían a la única paciente de sexo femenino en el

estudio y que jamás había sido fumadora ni tenía exposición a contaminantes químicos. Estas razones nos permiten hacer la hipótesis que la generación del cáncer en este paciente es de un origen totalmente diferente al resto pudiendo ser provocado por otros motivos no relacionados con la exposición de carcinógenos. Mientras que en resto de los tumores vemos que son pacientes que han sido fumadores en gran parte de su vida o en su trabajo podrían estar expuestos a diferentes carcinógenos, por lo que suponemos que la generación del tumor se debe a ello, aunque quizás el hecho de que sea la única paciente de sexo femenino suponga una variación en su perfil metabólico. Por supuesto se tratan de hipótesis que necesitarían ser confirmadas en estudios posteriores con una gama de pacientes más amplia y que abarcara ambos miembros, tanto fumadores como no fumadores de ambos sexos.

5. Conclusiones

1. El cáncer de vejiga es uno de los cánceres con mayor incidencia a nivel mundial en el caso de los hombres. España presenta elevadas tasas de incidencia respecto a otros países de la Unión Europea.
2. Existen una gran cantidad de factores de riesgo que pueden predisponer a la enfermedad, sobre todo factores ambientales asociados al contacto con compuestos carcinogénicos.
3. El alto grado de recurrencia en pacientes con un cáncer de vejiga no músculo invasivo supone una gran carga económica para los sistemas sanitarios.
4. Hoy en día no existen biomarcadores moleculares no invasivos con suficiente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico y monitorización de pacientes con CaV. Esto conlleva una disminución en la calidad de vida de aquellos pacientes sometidos a un seguimiento exhaustivo mediante cistoscopias debido a la elevada tasa de recurrencia que presentan.
5. Hay poca información sobre qué condiciones son las óptimas para el análisis de tejidos vesicales mediante MS. En nuestro protocolo se han establecido como condiciones óptimas para la extracción de metabolitos a partir de muestras tisulares vesicales el uso del PBS:MeOH (1:1) como disolvente y las siguientes condiciones de agitación del Precellys (4°C:6000rpm, 10 x 3 ciclos, 30s pausa entre ciclos).
6. Mediante un análisis de componentes principales de los extractos de las muestras tisulares vesicales tumorales y no tumorales se identificó un patrón de metabolitos asociado a un fenotipo tumoral, ya que estos fueron capaces de separarse en grupos bien diferenciados unos de otros.
7. La identificación de metabolitos asociados a un fenotipo tumoral mostró ciertas moléculas importantes como puede ser la carnitina, el oxoglutarato, o el glutatión. Asociados con el fenotipo tumoral podemos destacar los que se encuentran relacionados con la reducción del estrés oxidativo como puede ser el glutatión, de gran importancia para la reducción de especies reactivas de hidrogeno, o el oxoglutarato cuyo papel en condiciones de hipoxia se encuentra ligado al oncogén myc. También podemos ver metabolitos relacionados con la obtención rápida de energía como la carnitina, que se encarga de transportar ácidos grasos a la mitocondria para llevar a cabo la beta oxidación con su respectiva producción energética.
8. En las dos muestras tumorales de tejidos que vemos separadas del resto del grupo se puede observar que el perfil metabolómico que presentan es diferente. Esto podría estar provocado por el hecho de ser el único paciente de sexo femenino del grupo, aunque también puede ser por el hecho de que esta paciente jamás fue fumadora ni tuvo contacto en su trabajo con productos químicos potencialmente carcinogénicos. Estas observaciones requieren de estudios más completos para ser verificadas.

6. Bibliografía

Bibliografía

1. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, et al. GRADING , AND DIAGNOSIS. 2005;
2. Instituto Nacional del Cáncer. Información general sobre el cáncer de vejiga Incidencia y mortalidad. 2016;1–6.
3. Globocan Project International Agency for Research on Cancerv 2016 . [10.10.2014]., [Http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp](http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp).
4. Lopez-Abente G, Aragonés N, Ramis R, Hernández-Barrera V, Pérez-Gómez B, Escolar-Pujolar A, et al. Municipal distribution of bladder cancer mortality in Spain: possible role of mining and industry. *BMC Public Health*. 2006;6:17.
5. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013;63(2):234–41.
6. Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2009 Jun 7;27(3):295–300.
7. Yeung C, Dinh T, Lee J. The Health Economics of Bladder Cancer: An Updated Review of the Published Literature. *Pharmacoeconomics*. 2014;32(11):1093–104.
8. Bernal-Pérez M, Souza DLB, Romero-Fernández FJ, Gómez-Bernal G, Gómez-Bernal FJ. Estimación de las proyecciones del cáncer de vejiga en España. *Actas Urológicas Españolas*. 2013 May;37(5):286–91.
9. Svatek RS, Hollenbeck BK, Holmng S, Lee R, Kim SP, Stenzl A, et al. The economics of bladder cancer: Costs and considerations of caring for this disease. *Eur Urol*. 2014;66(2):253–62.
10. Campbell / Walsh. *Urología*. ©2015. Editorial Médica Panamericana. 2015;
11. Montironi R, Cheng L, Scarpelli M, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A. How much do you know about benign, preneoplastic, non-invasive and invasive neoplastic lesions of the urinary bladder classified according to the 2004 WHO scheme? *Diagn Pathol* . 2011;6(1):1–9.
12. Richter J, Jiang F, Gã J, Egenter C, Gasser TC, Moch H, et al. Marked Genetic Differences between Stage pTa and Stage pT1 Papillary Bladder Cancer Detected by Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Res*. 1997;57(V):2860–4.
13. Tosoni I, Wagner U, Sauter G, Egloff M, Knönagel H, Alund G, et al. Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer. *BJU Int*. 2000;85(1):48–53.
14. Girgin C, Sezer A, Delibaş M, Şahin O, Öder M, Dinçel C. Impact of the Level of

- Muscle Invasion in Organ-Confined Bladder Cancer. *Urol Int.* 2007;78(2):145–9.
15. Mark Soloway SK. Bladder cancer. 2^o ed. ICUD; 2012.
 16. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BWG, Compérat E, et al. EAU Guidelines on Non–Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2013. *Eur Urol.* 2013 Oct;64(4):639–53.
 17. Thompson L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear Nose Throat J.* 2006;85(2):74.
 18. Sylvester RJ, Meijden APM Van Der, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffouix C, Denis L, et al. Predicting Recurrence and Progression in Individual Patients with Stage Ta T1 Bladder Cancer Using EORTC Risk Tables : A Combined Analysis of 2596 Patients from Seven EORTC Trials. 2006;49:466–77.
 19. DN M, KP O, RA O, Melton L, III. Asymptomatic microhematuria and urologic disease: A population-based study. *JAMA.* 1986 Jul 11;256(2):224–9.
 20. Hudson MA, Herr HW. Carcinoma in Situ of the Bladder. *J Urol.* Elsevier; 2016 May 30;153(3):564–72.
 21. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J, et al. Guía clínica sobre el cáncer de vejiga TaT1 (sin invasión muscular). 2010;1:1–19.
 22. Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *CUAJ.* 2008;2
 23. Mertens LS, Neuzillet Y, Horenblas S, van Rhijn BW. Landmarks in non-muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev.* Nature Publishing Group; 2014;11(8):476–80.
 24. Holmang S, Hedelin H, Anderstrom C, Johansson SL. The Relationship Among Multiple Recurrences, Progression and Prognosis of Patients with Stages TA and T1 Transitional Cell Cancer of the Bladder Followed for at least 20 years. *J Urol.* 1995 Jun;153(6):1823–7.
 25. Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento – para profesionales de salud Cáncer de vejiga en estadio 0. 2015;.
 26. Pichler R, Fritz J, Zavadil C, Schäfer G, Culig Z, Brunner A. Tumor-infiltrating immune cell subpopulations influence the oncologic outcome after intravesical bacillus calmette-guérin therapy in bladder cancer. *Oncotarget.* 2016;34(2):447-452
 27. Highley MS, Van Oosterom AT, Maes RA, De Bruijn EA. Intravesical drug delivery. Pharmacokinetic and clinical considerations. *Clin Pharmacokinet.* 1999;37(1):59–73.
 28. García García, Noelia; García Barreras, Silvia; Téllez Martínez-Fornés M (Servicio de UHSOLM). Cáncer de vejiga: tratamiento actualizado. *Jano.* 2011;72–6.

29. Cantor KP, Lynch CF, Johnson D. Bladder cancer, parity, and age at first birth. *Cancer Causes Control*. 1992;3(1):57–62.
30. Reid LM, Leav I, Kwan PW, Russell P, Merk FB. Characterization of a human, sex steroid-responsive transitional cell carcinoma maintained as a tumor line (R198) in athymic nude mice. *Cancer Res*. 1984;44(10):4560–73.
31. Prout GR, Wesley MN, McCarron PG, Chen VW, Greenberg RS, Mayberry RM, et al. Survival Experience of Black Patients and White Patients with Bladder Carcinoma. *Cancer*. 2004;100(3):621–30.
32. Rothman N. A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci. *Nat Genet*. 2011;42(11):978–84.
33. Rothman N, Garcia-Closas M, Hein DW. Commentary: Reflections on G. M. Lower and colleagues' 1979 study associating slow acetylator phenotype with urinary bladder cancer: Meta-analysis, historical refinements of the hypothesis, and lessons learned. *Int J Epidemiol*. 2007;36(1):23–8.
34. Williams S V., Hurst CD, Knowles MA. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum Mol Genet*. 2013;22(4):795–803.
35. Kandimalla R, van Tilborg A a, Zwarthoff EC. DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer. *Nat Rev Urol*. Nature Publishing Group; 2013;10(6):327–35.
36. Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. 2012;306(7):737–45.
37. Samanic C, Kogevinas M, Dosemeci M, Malats N, Real FX, Garcia-Closas M, et al. Smoking and bladder cancer in Spain: Effects of tobacco type, timing, environmental tobacco smoke, and gender. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(7):1348–54.
38. Jiang X, Yuan J-M, Skipper PL, Tannenbaum SR, Yu MC. Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles County. *Cancer Res*. 2007;67(15):7540–5.
39. Carrato A, Sala M, Lloreta J, Rothman N, Samanic CM, Kogevinas M, et al. Occupation and bladder cancer in a hospital-based case-control study in Spain. *Occup Environ Med*. 2008;65(5):347–53.
40. DONAT SM, BAYUGA S, HERR HW, BERWICK M. Fluid Intake and the Risk of Tumor Recurrence in Patients With Superficial Bladder Cancer. *J Urol*. Elsevier; 2016 May 30;170(5):1777–80.
41. Villanueva C. Coffee consumption, genetic susceptibility and bladder cancer risk. *NIH Public Access*. 2009;20(1):121–7.
42. Büchner FL, Bueno-De-Mesquita HB, Ros MM, Kampman E, Egevad L, Overvad K, et al. Variety in vegetable and fruit consumption and risk of bladder cancer in

- the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2011;128(12):2971–9.
43. Brinkman MT, Karagas MR, Zens MS, Schned AR, Raoul C, Zeegers MP. Intake of α -linolenic acid and other fatty acids in relation to the risk of bladder cancer: results from the New Hampshire case– control study. 2012;106(7):1070–7.
 44. Collier HA. Is Cancer a Metabolic Disease ? *Am J Pathol* . American Society for Investigative Pathology; 2014;184(1):4–17.
 45. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* . Elsevier Ltd; 2016;41(3):211–8.
 46. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (80-)* . 2009 May 21;324(5930):1029–33.
 47. Jin X, Yun SJ, Jeong P, Kim IY, Kim W-J, Park S. Diagnosis of bladder cancer and prediction of survival by urinary metabolomics. *Oncotarget* . 2014;5(6):1635–45.
 48. Zhou W, Liotta LA, Petricoin EF. Cancer metabolism and mass spectrometry-based proteomics. *Cancer Lett* . Elsevier Ireland Ltd; 2015;356(2):176–83.
 49. Liesenfeld D, Haberman N, Owen R., Review of mass spectrometry-based metabolomics in cancer research 2015. 161-169 p.
 50. Brown M V, McDunn JE, Gunst PR, Smith EM, Milburn M V, Troyer D a, et al. Cancer detection and biopsy classification using concurrent histopathological and metabolomic analysis of core biopsies. *Genome Med* . 2012;4(4):33.
 51. Saylor PJ, Karoly ED, Smith MR. Prospective Study of Changes in the Metabolomic Profiles of Men during Their First Three Months of Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(13):3677–85.
 52. A J, Qian S, Wang G, Yan B, Zhang S, Huang Q, et al. Chronic myeloid leukemia patients sensitive and resistant to imatinib treatment show different metabolic responses. *PLoS One*. 2010;5(10).
 53. Farshidfar F, Weljie AM, Kopciuk K, Buie WD, MacLean A, Dixon E, et al. Serum metabolomic profile as a means to distinguish stage of colorectal cancer. *Genome Med* . 2012;4(5):42.
 54. Locasale JW, Melman T, Song S, Yang X, Swanson KD, Cantley LC, et al. Metabolomics of Human Cerebrospinal Fluid Identifies Signatures of Malignant Glioma. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(6):M111.014688–M111.014688.
 55. Wedge DC, Allwood JW, Dunn W, Vaughan AA, Simpson K, Brown M, et al. Is Serum or Plasma More Appropriate for Intersubject Comparisons in

- Metabolomic Studies? An Assessment in Patients with Small-Cell Lung Cancer. *Anal Chem* . American Chemical Society; 2011 Sep 1;83(17):6689–97.
56. Dettmer K, Aronov P, Hammock B, MASS SPECTROMETRY-BASED METABOLOMICS . 2010;48(Suppl 2):1–6.
 57. Gaspar EM, Lucena AF, Duro da Costa J, Chaves das Neves H. Organic metabolites in exhaled human breath—A multivariate approach for identification of biomarkers in lung disorders. *J Chromatogr A* . 2009 Apr 3;1216(14):2749–56.
 58. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*. 2010;6(1):78–95.
 59. Cao H, Huang H, Xu W, Chen D, Yu J, Li J, et al. Fecal metabolome profiling of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients by ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal Chim Acta* . 2011 Apr 8;691(1–2):68–75.
 60. Ye F, Wang L, Castillo-martin M, Mcbride R, Galsky MD, Zhu J, et al. Biomarkers for bladder cancer management : present and future. 2014;2(1):1–14.
 61. Pendyala L, Velagapudi S, Toth K, Zdanowicz J, Glaves D, Slocum H, et al. Translational studies of glutathione in bladder cancer cell lines and human specimens. *Clin Cancer Res*. 1997;3(5):793–8.
 62. Dettmer K, Vogl FC, Ritter AP, Zhu W, , Kreutz M, et al. Distinct metabolic differences between various human cancer and primary cells. *Electrophoresis*. 2013;34(19):2836–47.
 63. Henrique R, Bastos MDL, Pinho PG De. Biomarkers in bladder cancer : A metabolomic approach using in vitro and ex vivo model systems. 2016;00.
 64. Putluri N, Shojaie A, Vasu VT, Vareed SK, Nalluri S, Putluri V, et al. Metabolomic Profiling Reveals Potential Markers and Bioprocesses Altered in Bladder Cancer Progression. *Cancer Res*. 2011;71(24):7376–86.
 65. Tripathi P, Somashekar BS, Ponnusamy M, Gursky A, Dailey S, Kunju P, et al. HR-MAS NMR Tissue Metabolomic Signatures Cross-Validated by Mass Spectrometry Distinguish Bladder Cancer from Benign Disease. *J Proteome Res*. 2014;12(7):3519–28.
 66. Rosser CJ, Urquidi V, Goodison S. Urinary biomarkers of bladder cancer: an update and future perspectives. *Biomark Med* . Future Medicine; 2013 Sep 17;7(5):779–90.
 67. Van den Berg R a, Hoefsloot HCJ, Westerhuis J a, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* . 2006;7:142.

68. Louis AS. Andrew Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Characterization of Metabolites Guided by the METLIN Database . 2013;8(3):451–60.
69. Wise BM, Gallagher NB, Windig W. Chemometrics Tutorial for PLS _ Toolbox and Solo. 2006. 420 p.
70. Wittmann BM, Stirdivant SM, Mitchell MW, Wulff JE, McDunn JE, Li Z, et al. Bladder Cancer Biomarker Discovery Using Global Metabolomic Profiling of Urine. PLoS One . Public Library of Science; 2014 Dec 26;9(12):e115870.
71. Cao M, Zhao L, Chen H, Xue W, Lin D. NMR-based metabolomic analysis of human bladder cancer. Anal Sci . 2012;28(5):451–6.
72. Bailin P, Byrne M, Lewis S, Liroff R. Public Awareness Drives Market for Safer Alternatives: Bisphenol A Market Analysis Report. New York. 2008;1–37.
73. Hengstler JG, Foth H, Gebel T, Kramer P-JP-J, Lilienblum W, Schweinfurth H, et al. Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A. Crit Rev Toxicol. 2011;41(4):263–91.
74. Seachrist DD, Bonk KW, Ho SM, Prins GS, Soto AM, Keri RA. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. Reprod Toxicol . Elsevier Inc.; 2016;59:167–82.
75. Dekant W, Völkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. Toxicol Appl Pharmacol. 2008;228(1):114–34.
76. Harris AL. A New Hydroxy Metabolite of 2-Oxoglutarate Regulates Metabolism in Hypoxia. Cell Metab . Elsevier Inc.; 2015;22(2):198–200.
77. K. M. Hines, B. R. Ballard DMM and JAM. Structural mass spectrometry of tissue extracts to distinguish cancerous and non-cancerous breast diseases. Mol Biosyst. 2015;6(2):356–72.
78. Ganti S, Taylor SL, Aboud OA, Yang J, Evans C, Osier M V., et al. Kidney tumor biomarkers revealed by simultaneous multiple matrix metabolomics analysis. Cancer Res. 2012;72(14):3471–9.
79. Rocha CM, Barros AS, Goodfellow BJ, Carreira IM, Gomes A, Sousa V, et al. NMR metabolomics of human lung tumours reveals distinct metabolic signatures for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Carcinogenesis. 2015;36(1):68–75.
80. Huang Q, Tan Y, Yin P, Ye G, Gao P, Lu X, et al. Metabolic characterization of hepatocellular carcinoma using nontargeted tissue metabolomics. Cancer Res. 2013;73(16):4992–5002.
81. Bayet-Robert M, Loiseau D, Rio P, Demidem A, Barthomeuf C, Stepien G, et al.

Quantitative two-dimensional HRMAS ¹H-NMR spectroscopy-based metabolite profiling of human cancer cell lines and response to chemotherapy. *Magn Reson Med.* 2010;63(5):1172–83.

82. Liu X, Zhang C, Liu Z, Wei L, Liu Y, Yu J, et al. LC-based targeted metabolomics analysis of nucleotides and identification of biomarkers associated with chemotherapeutic drugs in cultured cell models. *Anticancer Drugs* . Elsevier; 2014;25(6):690–703.

7. Anejos

1. Identificación y descripción del procedimiento

El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente muestra/s biológica/s de Estas muestras biológicas se almacenarán en un biobanco y sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica que previamente sean aprobados por los comités externos, ético y científico, a los que está adscrito el biobanco.

Las muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

2. Objetivo

La finalidad del biobanco es recoger y almacenar muestras biológicas humanas para realizar proyectos de investigación biomédica o diagnósticos. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades y de nuevas medicinas para tratarlas.

3. Condiciones de la donación

Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, si las investigaciones que se realicen tuvieran éxito, podrán ayudar en el futuro a pacientes que tienen su misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras de los tejidos y/o sangre que usted dona no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales, pero los costes de obtención, conservación y envío de las muestras se repercutirán, sin ánimo de lucro, a quienes las utilicen.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando así lo requieran.

En caso de producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a disposición en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto de las muestras.

4. Consecuencias previsibles de su realización

Se podría dar la circunstancia de ser contactado/a con el fin de recabar nueva información sobre su situación o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o rechazar dicha participación. Por tal motivo, es importante que comunique al Servicio de Admisión del centro FUTUROS CAMBIOS DE DIRECCIÓN y números de TELÉFONO, ya que es la única vía para poder contactar con usted.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud derivada del desarrollo de los proyectos de investigación y, en particular, datos genéticos con relevancia clínica. En este sentido, puede solicitar la información relativa a su salud derivada del estudio de las muestras donadas. Para ejercer este derecho, tiene a su disposición en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud.

La información que se obtenga puede ser relevante también para sus familiares biológicos. Es decisión suya informarles – algo que nosotros le aconsejamos – con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cual es el riesgo personal y sus opciones de salud en un futuro.

Cuando esta información, según criterio médico, sea necesaria para evitar un grave perjuicio a la salud de sus familiares biológicos, previa consulta del comité asistencial, se les informará de ello.



5. Derecho de revocación del consentimiento

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si revoca el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, podrá decidir que sean destruidas o anonimizadas. Tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo antes de la revocación de su consentimiento.

6. Riesgos

La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en las zonas de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días.

7. Protección de datos personales y confidencialidad

Los datos personales y de salud obtenidos de su historia clínica o equivalente serán incorporados y tratados en una base de datos que cumple con las garantías que establece la legislación sanitaria y sobre protección de datos de carácter personal.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de disociación, esto es, suprimiendo la información personal que la identifica y sustituyéndola por un código.

Es posible que en el desarrollo de un proyecto de investigación se genere mucha información genética de sus muestras. Si los resultados fueran relevantes desde el punto de vista científico, la información obtenida, desligada de cualquier dato que pueda permitir su identificación por medios razonables, podría ser remitida para su inclusión en bases científicas y demás medios de difusión de contenido científico a los que tendrán acceso, con carácter restringido, investigadores científicos.

El biobanco en el que se custodiarán sus muestras forma parte de la Red Valenciana de Biobancos cuya coordinación es llevada a cabo por el Centro Superior de Investigación de Salud Pública de la Comunitat Valenciana.

Como consecuencia de lo anterior, el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos, esto es, el Centro Superior de Investigación en Salud Pública de la Comunitat Valenciana, tendrá acceso a sus datos personales y a la información clínica asociada a la muestra donada voluntariamente, con el único fin de cumplir con las labores atribuidas a la Red Valenciana de Biobancos en virtud de la legislación vigente. En particular, el eventual acceso a sus datos personales por parte de la Red Valenciana de Biobancos tendrá como finalidad poder coordinar de la manera más eficiente posible desde el punto de vista científico la información obtenida por los biobancos adscritos a la Red Valenciana de Biobancos, mediante la gestión y coordinación del Sistema de Gestión de la Información de la Red Valenciana de Biobancos, así como la coordinación de las actividades desarrolladas por los biobancos, todo ello de acuerdo con la normativa aplicable.

Podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, para lo cual tiene en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud. En dicho escrito, deberá adjuntar copia de su DNI para que el Centro responsable de sus datos pueda comprobar su identidad.

8. Seguro

Los profesionales de enfermería que colaboran con el biobanco tienen un seguro de responsabilidad civil con _____, concertado con _____
Poliza Nº: _____ que cubre el acto profesional, en este caso la extracción, y por tanto también las extracciones realizadas con fines de investigación.





EJEMPLAR PARA EL BIOBANCO

Declaración de consentimiento

D./D^a de años de edad, con domicilio en

DNI y nº de SIP

D./D^a de años de edad, con domicilio en.....

DNI en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente con DNI y nº de SIP

DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.

He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.

He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:

CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

A completar por el donante:

Fdo.: D./D^a
DNI:

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./D^a
DNI:
Colegiado Nº:
En condición de:

En a de de 20.....

EJEMPLAR PARA EL DONANTE

Declaración de consentimiento

D./D^a de años de edad, con domicilio en

DNI y nº de SIP

D./D^a de años de edad, con domicilio en.....

DNI en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad)
del paciente con DNI y nº de SIP

DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.

He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.

He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:

CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

A completar por el donante:

Fdo.: D./D^a
DNI:

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./D^a
DNI:
Colegiado N^o:
En condición de:

En a de de 20.....





EJEMPLAR PARA EL CENTRO

Declaración de consentimiento

D./D^a de años de edad, con domicilio en

DNI y nº de SIP

D./D^a de años de edad, con domicilio en.....

DNI en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente con DNI y nº de SIP

DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.

He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.

He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:

CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

A completar por el donante:

Fdo.: D./D^a

DNI:

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./D^a

DNI:

Colegiado N^o:

En condición de:

En a de de 20.....

Revocación del consentimiento

Revoco el consentimiento prestado en fecha de de 2..... y no deseo proseguir la donación voluntaria que doy con esta fecha por finalizada.

A completar por el donante:

Fdo.: D./D^a
DNI:

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./D^a
DNI:
Colegiado N^o:
En condición de:

En a de de 20.....

