



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina.



TÍTULO DEL PROYECTO

PERFIL METABOLÓMICO DE FOCOS HEPÁTICOS DE CÉLULAS CLARAS Y DEL TEJIDO NO TUMORAL CIRCUNDANTE EN MUESTRAS PARAFINADAS DE PACIENTES PERUANOS CON CARCINOMA HEPATOCELULAR

(Proyecto de tesis para optar grado de Magíster en Bioquímica)

Autor: BACHILLER FÉLIX HUALLPA, BRAYAM FELIPE

Asesor: Mg. ACOSTA CONCHUCOS, OSCAR

Lima, 2021

1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1	SITUACIÓN PROBLEMÁTICA	4
1.2	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	5
1.3	JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.4	VIABILIDAD DEL PROYECTO	5
1.5	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	6
1.5.1	<i>Objetivo General</i>	6
1.5.2	<i>Objetivos Específicos</i>	6
2	MARCO TEÓRICO	7
2.1	ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	7
2.2	BASES TEÓRICAS	9
2.2.1	<i>Epidemiología del Carcinoma Hepatocelular (CHC)</i>	9
2.2.2	<i>Factores de riesgo del CHC</i>	11
2.2.2.1	Hepatitis Virales (VHB, VHC)	11
2.2.2.2	Cirrosis	12
2.2.2.3	NAFLD	12
2.2.2.4	Alcohol	12
2.2.2.5	Aflatoxinas	13
2.2.3	<i>Diagnóstico de CHC</i>	13
2.2.3.1	Diagnóstico no invasivo	13
2.2.3.2	Diagnóstico invasivo	14
2.2.4	<i>Biomarcadores para la vigilancia y diagnóstico de CHC</i>	14
2.2.4.1	Biomarcadores séricos de CHC	15
2.2.4.2	Biomarcadores Tisulares de CHC	16
2.2.5	<i>Tratamiento de CHC</i>	16
2.2.6	<i>Tejido Hepático no tumoral (Lesiones preneoplásicas)</i>	17
2.2.6.1	Focos Hepáticos de células claras	17
2.2.7	<i>Metabolómica</i>	18
2.2.7.1	Aproximaciones metabolómicas	19
2.2.7.2	Metabolómica no dirigida	19
2.2.7.3	Metabolómica dirigida	20
2.2.7.4	Imagen metabolómica	20
2.2.8	<i>Espectrometría de masas en metabolómica</i>	20
2.3	MARCOS CONCEPTUALES O GLOSARIO	21
3	HIPÓTESIS Y VARIABLES	22
3.1	IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES	22
3.2	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	23
3.3	MATRIZ DE CONSISTENCIA	24

4	METODOLOGÍA.....	25
4.1	TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	25
4.2	UNIDAD DE ANÁLISIS	25
4.3	POBLACIÓN DE ESTUDIO	25
4.4	TAMAÑO DE MUESTRA.....	25
4.5	SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	25
4.5.1.1	Criterios de inclusión:.....	25
4.5.1.2	Criterios de exclusión:	25
4.6	TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	26
4.6.1	<i>Recolección de datos y muestras archivadas.....</i>	26
4.6.2	<i>Recolección de muestras de CHC.....</i>	26
4.6.3	<i>Proceso de alicuotado y fijación de las muestras.....</i>	26
4.6.4	<i>Identificación de los focos de células claras y tejido no tumoral.....</i>	27
4.6.5	<i>Microdissección de los focos de células claras y tejido no tumoral.....</i>	27
4.6.6	<i>Extracción de metabolitos (Método adaptado de Yuang et al.,2012)</i>	27
4.6.7	<i>Proceso de muestras en Cromatografía Líquida de ultra alta presión asociado a espectrometría de masas (UHPLC-MS).....</i>	28
4.7	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LA INFORMACIÓN	29
4.8	ASPECTOS ÉTICOS	29
5	PRESUPUESTO.....	30
6	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	32
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
8	ANEXOS	39

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Situación Problemática

El Carcinoma Hepatocelular (CHC) constituye la principal forma de cancer primario de hígado y representa la sexta neoplasia mas comun, así como la tercera causa de muerte por cáncer en todo el mundo; además, las tasas de mortalidad se encuentran en incremento de acuerdo a los reportes de las últimas décadas en la mayoría de los países (Bertuccio et al., 2017). La incidencia y mortalidad asociada con CHC en los Estados Unidos viene aumentando constantemente en las últimas dos décadas, con más de 40 000 nuevos casos de cáncer de hígado que se diagnosticaron en el 2018, de los cuales más del 75% es CHC (Xu et al., 2016).

El cancer de hígado en el Perú, representa el 6.5% de todos los casos de cancer reportados, y el 10% de la mortalidad general por esta enfermedad. (Perú. Ministerio de Salud., 2013).

Un estudio realizado en pacientes peruanos con CHC reveló características clínico patológicas particulares y diferentes en este grupo de estudio respecto a países de otras zonas geográficas. Entre las características epidemiológicas mas notables descritas fue la presencia de un subconjunto inusualmente joven de pacientes con CHC, cuya edad media fue menor de 40 años y una tasa de cirrosis de solo el 11% (Bertani et al., 2013). Debido a estas características inusuales, un grupo de investigadores realizó un estudio histológico del parenquima hepático no tumoral en pacientes peruanos con CHC no cirróticos y reportaron la presencia significativa de focos de alteración celular de células claras y lo asociaron con el desarrollo de CHC (Cano et al., 2018).

Desde un punto de vista morfohistológico, este tipo de lesiones hepáticas se ha descrito hasta ahora solo en modelos animales, que han estado expuestos a compuestos químicos genotóxicos (Hailey et al., 2005). Sin embargo, el rol exacto de estos focos hepáticos de células, la alteración y su función en la carcinogénesis hepática en el modelo animal aún no está dilucidado, así como la relación con las características en pacientes con CHC peruano.

1.2 Formulación del Problema

¿Cuál es el perfil metabolómico de los focos hepáticos de células claras y del tejido no tumoral circundante en muestras parafinadas de pacientes peruanos con Carcinoma Hepatocelular?

1.3 Justificación de la Investigación

En el proceso de carcinogénesis, es importante la reprogramación metabólica para su evolución y desarrollo; por lo tanto, estas variaciones del perfil metabólico se ha observado también en pacientes con CHC al momento de su diagnóstico (Ferrarini et al., 2019). Ante esta realidad, un estudio de análisis metabolómico puede tener el potencial de dilucidar la fisiopatología del CHC y de hallar nuevos biomarcadores que permitan la detección oportuna de esta enfermedad.

En la actualidad, se maneja la hipótesis de que los focos hepáticos de células claras, pueden tener el potencial de progresión de la neoplasia y que tienen un rol activo en la historia natural de la enfermedad, en una proporción significativa de pacientes con CHC (Bannasch et al., 2017).

Por lo expuesto y ante la ausencia de información en cuanto a la composición y función de los focos hepáticos descritos anteriormente, se plantea este proyecto de investigación; el cual busca analizar el metaboloma de los focos hepáticos de células claras en muestras de Carcinoma Hepatocelular. En tal sentido, el presente estudio busca sentar bases de información para búsqueda de probables nuevos biomarcadores predictivos de CHC, a través de estudios metabolómicos dirigidos posteriores.

1.4 Viabilidad del proyecto

El presente proyecto de investigación forma parte del proyecto financiado por FONDECYT: "ANÁLISIS METABOLÓMICO DE FOCOS HEPÁTICOS SIN PRECEDENTES DE ALTERACIÓN CELULAR EN CARCINOMA

HEPATOCELULAR (HCC) EN LA POBLACIÓN PERUANA” INEN – FONDECYT N°096-2018.

El proyecto contará con recursos humanos especializados de apoyo (Tecnólogo Médico, Médico Patólogo, Biólogo); así como también acceso a laboratorios de Anatomía Patología y Microdissección Laser del área de Banco de Tejidos Tumorales del INEN. Además, se recibirá el apoyo del Instituto Francés para el Desarrollo (IRD, por sus siglas en Francés).

1.5 Objetivos de la Investigación

1.5.1 Objetivo General

Evaluar el perfil metabolómico de focos hepáticos de células claras y del tejido no tumoral circundante en muestras parafinadas de pacientes peruanos con carcinoma hepatocelular.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Identificar el perfil metabolómico de los focos hepáticos de células claras en muestras parafinadas de pacientes peruanos con carcinoma hepatocelular.
- Identificar el perfil metabolómico del tejido no tumoral circundante en muestras parafinadas de pacientes peruanos con carcinoma hepatocelular.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del Problema

Un estudio realizado por el grupo de investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) e Instituto Francés de Investigación para el Desarrollo (IRD, por sus siglas en inglés), describió una presentación clínica inusual del carcinoma Hepatocelular (CHC) con características diferenciales respecto a la epidemiología observada en otras regiones del mundo. Por ejemplo, describen una población bimodal; es decir, mientras el CHC ocurre principalmente en hombres mayores de 50 años, también se observa una población más joven con una edad media de 25 años. Además, la gran mayoría de los pacientes presentaba CHC en etapa avanzada y un tumor grande superior a los 10 centímetros de diámetro, así como también el 11% de los casos ocurrieron en el contexto de la cirrosis, mientras que la proporción de pacientes cirróticos con CHC en la literatura relevante oscila principalmente entre el 80% y 90% (Bertani et al., 2013; Ruiz et al., 2016).

Posterior a la evidencia científica reportada respecto a la epidemiología inusual del CHC en la población peruana (Bertani et al., 2013), se realizó un estudio que tuvo como objetivo indagar en las características histológicas asociadas con esta forma singular de CHC, para obtener una idea de la historia natural de la enfermedad. Para ello realizaron un análisis exploratorio de la histología de tejidos hepáticos tanto tumorales como no tumorales de 50 pacientes con CHC peruano. Los resultados destacaron la baja tasa de alteraciones del parénquima hepático en una cohorte de pacientes jóvenes (mediana de edad: 40 años), a pesar de una fuerte prevalencia de infección por VHB subyacente (67%). Además, como característica significativa, identificaron la presencia de focos de células claras de alteración del hígado que se asociaron genuinamente con el CHC. Este estudio confirma la aparición de un entorno particular de CHC en América del Sur, una región donde la fisiopatología del cáncer de hígado permanece en gran parte inexplorada (Cano et al., 2018). Por otro lado, se ha observado que este tipo de fenómeno, no se limita solo a Perú, sino que se encuentra en toda América del Sur y en cierta población Africana. (Debes y col., 2018)

La metabolómica del tejido hepático tiene el potencial de reflejar los cambios fisiológicos detrás del desarrollo de CHC. Además, permite la identificación de candidatos a nuevos biomarcadores para futuras evaluaciones en biofluidos e investigación en cáncer. En ese sentido, un estudio colaborativo realizado en los Estados Unidos, realizó un análisis metabolómico de tejidos tumorales y no tumorales de 40 pacientes con CHC, en donde las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y plataformas de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) para aumentar la cobertura del metaboloma. Entre los analitos con alteraciones significativas detectados por GC-MS y LC-MS, se seleccionaron 18 metabolitos en función de su relevancia biológica; estos metabolitos pertenecen al ciclo TCA, la glucólisis, las purinas, metabolismo de los lípidos. Algunos de ellos han sido reportados previamente en otros estudios metabolómicos del hígado, donde se observa una correlación con la progresión del CHC (Huang et al., 2013). Adicionalmente, identificaron metabolitos específicos de grupos raciales asociados con el CHC. (Ferrarini et al., 2019).

El carcinoma hepatocelular tiene un mal pronóstico debido a su rápido desarrollo y metástasis temprana. En ese sentido urge la búsqueda de nuevos biomarcadores complementarios a los que se usan en la actualidad (Ejm: alfafetoproteína), con la finalidad de aumentar la sensibilidad diagnóstica y la detección oportuna de esta enfermedad. Ante esta realidad, un estudio buscó analizar las características metabólicas del CHC utilizando una estrategia de metabolómica no dirigida basada en cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). Para ello, analizaron cincuenta pares de muestras de CHC (tejidos tumorales, tejidos adyacentes no cancerosos y tejidos distales no cancerosos) de donde se filtraron e identificaron 105 metabolitos de todo el metaboloma tisular. Entre los principales alteraciones metabólicas en los tumores CHC, hallaron glucólisis, gluconeogénesis y beta oxidación elevados; así como una reducción del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Además, niveles de glutatión y otras moléculas antioxidantes aumentados, junto con niveles reducidos de ácidos grasos poliinsaturados relacionados con la inflamación y fosfolipasa A2. Adicionalmente se analizaron los niveles diferenciales de metabolitos en los tejidos en 298 muestras de suero de pacientes con enfermedades crónicas (hepatitis, cirrosis y CHC), y se confirmó que la betaína y la propionilcarnitina confieren buen potencial diagnóstico para distinguir el CHC de la hepatitis crónica y

la cirrosis, así como su utilidad para el diagnóstico de CHC complementario a la alfa-fetoproteína (Huang et al., 2013).

Otro estudio de metabolómica tisular, proporcionó mayor información sobre la remodelación metabólica que se desarrolla en el tumor de CHC; desde la oxidación mitocondrial hasta la glucólisis aeróbica. Para ello desarrollaron un estudio combinado de transcriptómica y metabolómica del metabolismo energético en el CHC. En este estudio se analizaron 31 muestras pareadas de CHC (tumoral y no tumoral) de cada paciente, mediante metabolómica basada en cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). El CHC se caracterizó por una reducción aproximada del doble de glucosa, glicerol 3- y 2- fosfato, malato, alanina, *myo*-inositol y ácido linoleico. Los resultados implican un aumento de cuatro veces de la glucólisis sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial. En un segundo panel de 59 muestras de CHC que había sido tipificado por transcriptómica y clasificado en subgrupos G1 a G6, no se encontraron diferencias en las concentraciones tisulares de glucosa, lactato, alanina, glicerol 3- fosfato, malato, *mioinositol* o ácido esteárico; sin embargo, el subgrupo G1 tenía concentraciones tisulares notablemente reducidas de 1-estearoilglicerol, 1- palmitoilglicerol y ácido palmítico, lo que sugiere que el fenotipo alto de α -fetoproteína sérica de G1, asociado con la sobreexpresión conocida de enzimas catabólicas lipídicas, podría detectarse mediante metabolómica como un aumento del catabolismo de lípidos (Beyoğlu, et al., 2013).

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Epidemiología del Carcinoma Hepatocelular (CHC)

El carcinoma hepatocelular (CHC) representa la principal forma de cancer primario de hígado en todo el mundo, con más del 80% de casos reportados (El-Serag & Rudolph, 2007); además de ocupar el sexto lugar en incidencia de cancer y ser la cuarta causa mas común de muerte relacionado a esta enfermedad a nivel mundial (Incidence et al., 2017).

En la actualidad se observa variaciones globales en la incidencia y mortalidad por CHC, debido a varios determinantes como la exposición a factores de riesgo

ambientales e infecciosos, acceso de mejores sistemas sanitarios, capacidad de detección temprana de CHC, así como acceso a un tratamiento oportuno y potencialmente curativo de la enfermedad (Yang et al., 2019). Por ejemplo, se conoce que alrededor del 85% de los casos de CHC en el mundo, ocurren en países con bajos o medios recursos económicos, como en Asia oriental y África subsahariana (Tang et al., 2018).

En general, la prevalencia de CHC varía según la región geográfica, así como la prevalencia de infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) o virus de la hepatitis C (VHC), y la enfermedad hepática alcohólica. La incidencia es mas alta en áreas con infección endémica por el VHB (20 casos por cada 100 000 personas) como el África subsahariana y Asia oriental. En los países europeos como España, Italia y Grecia se presentan tasas intermedias de incidencia (10 a 20 casos por cada 100 000 personas), mientras que en los países de América del Norte y del Sur la incidencia es menor (menor a 5 casos por cada 100 000 personas) (Sherman, 2010). Además, el CHC es más común en hombres que en mujeres y alrededor de los 80 y 90% de los casos, cursan con cirrosis (El-Serag, 2020).

En los Estados Unidos, la tasa de incidencia de CHC se ha incrementado en las últimas tres décadas (Altekruse et al., 2009). Este fenómeno en parte se debe a una alta tasa de prevalencia de infección por el virus de la hepatitis c (VHC) en una cohorte de personas nacidas entre 1945 y 1965, así como a un aumento progresivo de la enfermedad de hígado graso asociado a obesidad (Hajarizadeh et al., 2013).

En América latina, es escasa la información respecto a la prevalencia, incidencia y factores de riesgo asociados. Un estudio prospectivo evidenció que la infección por VHC es la etiología mas frecuente de CHC en Latinoamérica, seguido de cirrosis alcohólica y el VHB; además, los resultados demográficos mostraron un predominio del sexo masculino en una proporción de 2.6 sobre el sexo femenino, así como un mayor número de pacientes diagnosticados alrededor de los 60 años de edad (Fassio et al., 2010). Sin embargo, se ha observado una tendencia epidemiológica del CHC hacia el aumento de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (Piñero, Pages, et al., 2018; Piñero, Poniachik, et al., 2018).

La edad de diagnóstico y desarrollo del carcinoma CHC es variable en diferentes regiones del mundo. Por ejemplo, tiende a aparecer en Japón, América del Norte, y países europeos, con un media superior a los 60 años. Estos datos contrastan con

algunas regiones de Asia y África donde el CHC se presenta entre los 30 y 60 años (Yang et al., 2019).

En el Perú, la distribución por edades de la población, presentó una media de 44.8 años \pm 21,9 años y también mostró un patron bimodal correspondiente a dos subpoblaciones distintas. Por un lado un grupo poblacional mayor de edad, que se asemeja a la casuistica presentada en otras partes del mundo, y como contraste un grupo poblacional muy joven, con una media de 25 años y predominantemente en las regiones del interior de los Andes. Además, la proporción general de sexos según la misma evidencia, es de 1.6 predominantemente hombres sobre mujeres (Bertani et al., 2013).

Otra caracterpistica particular en la población peruana con CHC, es la propoción de pacientes con y sin cirrosis hepática (11% y 89% respectivamente), lo cual contrasta con la literatura de otras zonas geográficas. Además, la tasa de infección por VHB fue mayor en población joven, y la infección por VHC en poblacion mayor de edad. Todo ello apoya la hipotesis de un factor de riesgo genetico, ambiental o infeccioso singular en esta población (Bertani et al., 2013; Ruiz et al., 2016).

2.2.2 Factores de riesgo del CHC

La enfermedad hepática crónica y la cirrosis siguen siendo los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de CHC, de los cuales la hepatitis viral y el consumo excesivo de alcohol son los principales factores de riesgo en todo el mundo. La hepatitis viral crónica puede provocar cirrosis y / o CHC. La hepatitis B y C son las causas más comunes de hepatitis crónica en el mundo (Balogh et al., 2016).

2.2.2.1 Hepatitis Virales (VHB, VHC)

Se ha observado que las infecciones crónicas por VHB y VHC conducen a un riesgo alto de desarrollar CHC, por lo que constituyen su causa mas relevante y representan el 80% de los casos a nivel mundial (McGlynn et al., 2012).

En los Estados Unidos, el 25% de pacientes con CHC son positivos para VHB; además, por un proceso inflamatorio inespecífico relacionado con el VHC, que promueve la proliferación de hepatocitos asociado con un aumento de los niveles de alanina

aminotransferasa, son mas propensos a desarrollar CHC (Méndez-Sánchez et al., 2014).

2.2.2.2 Cirrosis

La cirrosis constituye un factor de riesgo clínico e histopatológico importante en el desarrollo de CHC, independientemente de su causa. De acuerdo a estudios epidemiológicos, un tercio de los pacientes cirróticos desarrollará CHC en el transcurso de sus vidas (Méndez-Sánchez et al., 2014). En latinoamérica, un estudio mostró que el 85% de pacientes con CHC, cursaban con cirrosis hepática entre otros hallazgos (Fassio et al., 2010).

Las causas de desarrollo de cirrosis pueden ser producto de una hepatitis viral crónica, alcoholismo, enfermedades metabólicas hereditarias (hemocromatosis o deficiencia de alfa 1 antitripsina) y enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) (Méndez-Sánchez et al., 2014).

2.2.2.3 NAFLD

EL NAFLD representa la enfermedad hepática más común en las ultimas décadas y un factor de riesgo importante para CHC en varios paises desarrollados principalmente. Un claro ejemplo de ello, es que entre el 10 y 20% de los casos de CHC en los Estados Unidos se atribuyen a NAFLD. (Younossi et al., 2016). La prevalencia de esta enfermedad aumenta en grupos de alto riesgo, oscilando entre 70% y 86 % en pacientes con obesidad y diabetes (Méndez-Sánchez et al., 2014).

Un estudio mostró la asociación entre el NAFLD y CHC, reportando un riesgo de 2.6 veces mayor de desarrollar CHC (Younossi et al., 2015). La diabetes y la obesidad, independientemente del NAFLD, aumentan el riesgo de padecer CHC. La diabetes tipo 2 se asoció con un aumento de 2 a 3 veces es riesgo de padecer CHC (El-Serag et al., 2006).

2.2.2.4 Alcohol

La ingesta excesiva de alcohol, definida como el consumo de más de 50 g a 70 g por día, durante periodos prolongados de tiempo, representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de cirrosis y CHC. Además, existe evidencia de un efecto sinérgico entre el consumo excesivo de alcohol y la infección por VHC o VHB, lo cual puede

aumentar en dos veces el riesgo (respecto a solo la ingesta del alcohol) de desarrollar CHC, al promover de forma más activa la cirrosis.(El-Serag & Rudolph, 2007). Sin embargo, el riesgo absoluto de desarrollar CHC en pacientes con cirrosis relacionada con alcohol, parece menor que en pacientes con hepatitis viral crónica (Yang et al., 2019).

2.2.2.5 Aflatoxinas

Son micotoxinas producidas por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, los cuales presentan fuertes efectos hepatocarcinogénicos y se encuentran contaminando muchos cereales y semillas oleaginosas (maní) principalmente en las regiones de África occidental y Asia. Ello se produce debido a un procesamiento post cosecha inadecuado.(Abu Al-Rub, 2008; Méndez-Sánchez et al., 2014).

La principal forma de aflatoxina con efecto hepatocarcinogénico es la aflatoxina B1, la cual causa mutaciones en el codon 249 del gen supresor de tumores TP53 (AGG a AGT), resultando en la sustitución de serina por arginina (R249S). Esta mutación explica el desarrollo temprano de CHC en las regiones expuestas a aflatoxinas como el África subsahariana (Gouas et al., 2009).

2.2.3 Diagnóstico de CHC

2.2.3.1 Diagnóstico no invasivo

En la actualidad, se diagnostica mediante los métodos de imagen con contraste, tales como la tomografía computarizada (TC) o imágenes por resonancia magnética (IRM), este ultimo muestra una mayor sensibilidad y especificidad (ambos de 84%) (Méndez-Sánchez et al., 2014). Los criterios de la Asociación Estadounidense para el Estudio de Enfermedades Hepáticas (AASLD, por sus siglas en inglés) para el diagnóstico de CHC, se han basado en características de imagen bien definidas, sin necesidad de una biopsia confirmatoria (H.B, 2018)

Según las guías de la AASLD y la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL, por sus siglas en inglés), el diagnóstico de CHC puede ser radiológicamente si se encuentra una nueva masa mayor o igual a 1 cm que demuestre hiperrealce arterial y lavado venoso en un hígado cirrótico mediante TC con contraste multifásico o IRM (Yang et al., 2019).

Las lesiones nodulares detectados por TC o IRM, según un Grupo de Concenso Internacional para el CHC (Kojiro et al., 2009), son clasificados de la siguiente manera según su evolución:

- Macronódulos regenerativos: No premalignos
- Nódulos displásicos de bajo grado: Dificulta diferenciarlo de proceso regenerativo.
- Nódulos displásicos de alto grado: precursor frecuente de CHC.
- CHC pequeño: menores de 2 cm de diámetro de patron nodular.

Los niveles de Alfa-fetoproteína (AFP) no representan un buen marcador diagnóstico en pacientes con nódulos hepaticos pequeños. Sólo un tercio de estos pacientes tienen niveles de AFP mayores a 100ng por mL(Méndez-Sánchez et al., 2014).

2.2.3.2 Diagnóstico invasivo

A pesar del desarrollo de las técnicas de imagen, el método "*gold estándar*" para el diagnóstico definitivo en lesiones pequeñas que miden entre 1 y 2 cm, es la biopsia hepática; el cual puede realizarse con aguja fina o cortante dependiendo de la ubicación de la lesión. Alrededor del 30% de los pacientes requerirá el uso de biopsias para el diagnóstico definitivo (El-Serag et al., 2008).

La sensibilidad y especificidad de la biopsia hepática son de 100% y 75% para nódulos menores o iguales a 2 cm, 100% y 100% para nódulos mayores de 2 cm y menores o iguales de 3cm y 96% y 71% para nódulos mayores a 3 cm y menores o iguales a 5 cm respectivamente. En nódulos menores a 1 cm, por lo general se elabora un plan de seguimiento por ecografía cada tres meses.(Méndez-Sánchez et al., 2014)

2.2.4 Biomarcadores para la vigilancia y diagnóstico de CHC

En la actualidad, la utilidad clínica de los diferentes biomarcadores séricos o tisulares para CHC no ha sido ampliamente aceptada, con excepción de la AFP, debido principalmente a la baja sensibilidad reportada en alguna de ellas. Por ello, es importante el desarrollo de nuevos biomarcadores para el diagnóstico precoz, selección adecuada de tratamiento por paciente, así como la vigilancia y pronóstico posterior al tratamiento (Piñero et al., 2020)

2.2.4.1 Biomarcadores séricos de CHC

Alfa-fetoproteína (AFP): Es el biomarcador más utilizado para la vigilancia de CHC. Es una glicoproteína de 70kD, estructuralmente muy similar a la albúmina, producida inicialmente por el hígado fetal y saco vitelino durante el primer trimestre de embarazo y disminuye rápidamente luego del nacimiento (Piñero et al., 2020)

La especificidad de este biomarcador es cuestionada y se ve mermado por su incremento en otras enfermedades como la hepatitis aguda y crónica, así como también en colangiocarcinoma intrahepático, tumores embriogénicos e incluso el embarazo. Por ese motivo su uso debe de ser evaluado en un contexto clínico (Wong et al., 2015).

El punto de corte de AFP se ve afectado por varios indicadores, uno de ellos es prevalencia de CHC en la población atendida. Por ejemplo, en una población con prevalencia de 5% de CHC, el punto de corte de 20ng/mL tiene un valor predictivo positivo (VPP) de 97.7% y un valor predictivo negativo (VPN) de 25%, haciendo del AFP un biomarcador útil para la exclusión de CHC, pero deficiente como marcador precoz. Por otro lado, cuando la prevalencia de CHC es del 20%, el mismo punto de corte tuvo un VPP de 61% y VPN de 91% (Trevisani et al., 2001)

Por lo expuesto, el punto de corte de la AFP con la mayor sensibilidad para la detección oportuna de CHC es de una concentración mayor a los 20ng/mL (Piñero et al., 2020).

Lente de AFP *culinaris* aglutinina -3 (AFP-L3): Representa una de las tres fracciones de AFP, obtenido por electroforesis en función a su afinidad por aglutinina *Lens culinaris*. Esta isoforma (AFP-L3) parece ser más específica que la AFP, puesto que es producida exclusivamente por las células de CHC. Sin embargo los estudios retrospectivos no muestran un aumento significativo de sensibilidad de la prueba cuando se usa aislado de los otros biomarcadores. (Piñero et al., 2020; Wong et al., 2015)

Des- γ -carboxi protrombina (DCP): Es una proteína anormal sin función coagulante, posiblemente producido por un defecto adquirido en la carboxilación pos traduccional del precursor de protrombina en células malignas. Este biomarcador es útil para la vigilancia de CHC, ya que es independiente de la secreción de AFP. A pesar de que diversos estudios evidencian una mayor precisión en comparación a AFP (Ji et al., 2016), algunos detalles técnicos como la presencia de vitamina K o el uso de anticoagulantes orales, puede afectar su utilidad (Piñero et al., 2020).

Según las guías técnicas del FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos), para la evaluación de riesgo de CHC, se debe manejar un panel de AFP-L3 más DCP, o la combinación de AFP-L3 con AFP y DCP para mejorar la sensibilidad y especificidad (Wong et al., 2015).

Otros biomarcadores tumorales propuestos son la Osteopontina (OPN), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyectina 2 (ANG-2), proteína de golgi 73 (Gp-73), factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1), Glypican 3 y c-Met; los cuales están en estudio (Piñero et al., 2020)

2.2.4.2 Biomarcadores Tisulares de CHC

Un enfoque de “biopsia líquida”, que incluyen células tumorales circulantes, ctDNA, microRNA, y vesículas extracelulares, se encuentran en evaluación como predictores de respuesta a tratamientos.

El CHC es un tumor heterogéneo con mutaciones sustanciales en el ADN, tales como a nivel del TERT (gen que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa), TP53 (gen supresor de tumores p53) y CTNNB1 (gen de la beta catenina). Estas mutaciones dependen de la enfermedad hepática subyacente y no se encuentran en todos los casos, sin embargo son detectables en tejido (Piñero et al., 2020).

2.2.5 Tratamiento de CHC

En el esquema de tratamiento realizado por el cuerpo médico, se tienen en cuenta varios factores que van desde la extensión del tumor, comorbilidades del paciente, gravedad de la disfunción hepática, e incluso la disponibilidad de recursos con la finalidad de evaluar el procedimiento a seguir. Entre los tratamientos más comunes tenemos (Yang et al., 2019):

- a) **Resección quirúrgica:** Recomendado en pacientes con enfermedad resecable e individuos con enfermedad en estadio intermedio o avanzado que no presenten hipertensión portal clínicamente significativo. Es un tratamiento potencialmente curativo, pero con alta probabilidad de recurrencia.
- b) **Transplante:** Constituye un tratamiento definitivo para el CHC y es ideal para los estadios tempranos de la enfermedad.

- c) Ablación: es potencialmente curativo y realizado en pacientes con CHC de estadio temprano y/o como terapia puente al trasplante de hígado.

2.2.6 Tejido Hepático no tumoral (Lesiones preneoplásicas)

Durante las primera etapas del proceso de hepatocarcinogénesis del hígado, se puede evidenciar la aparición de lesiones pre neoplásicas, de las cuales algunos se convertirán en CHC. Según Libbrecht y colaboradores (2005), se describen las siguientes lesiones:

- a) Los focos displásicos de células pequeñas: Es el más pequeño morfológicamente y es la primera lesión reconocible de CHC; mientras que la displasia de células grandes no es reconocida como una lesión precursora de CHC (Libbrecht et al., 2005).
- b) Los nódulos displásicos (ND) de alto y bajo grado: Son lesiones precursoras de CHC reconocibles macroscópicamente. Aunque la detección y diferenciación de ND de bajo grado y los CHC pequeños (menores de 2 cm de diámetro) son difíciles (especialmente cuando solo se utilizan técnicas de imagen), se deben recurrir a manejo por biopsia y otros estudios histológicos para su diagnóstico. Por otro lado, los nódulos regenerativos representan un paso distinto en la carcinogénesis.(Libbrecht et al., 2005)
- c) Focos de hepatocitos alterados: Se diferencian en focos de almacenamiento de glucógeno y focos oncocíticos con potencial preneoplásico. Los focos de almacenamiento de glucógeno reportados por Libbrecht, presentan citoplasma claro y solo se habían reportado en modelos animales inducidos a CHC por altos niveles de insulina (Jin et al., 2009; Tanihara et al., 1995).

2.2.6.1 Focos Hepáticos de células claras

Un estudio realizado en pacientes peruanos, analizó el tejido no tumoral circundante a CHC, evidenciando la presencia de focos hepáticos de células claras, los cuales bajo la tinción del ácido peryódico de schiff (PAS), denotaban una mayor acumulación de glucógeno citoplasmático en comparación de los hepatocitos periféricos. Bajo la

tinción de hematoxilina-eosina, estos focos de células claras estaban bien definidos y presentaban un reordenamiento desorganizado de las placas hepáticas en un área parenquimatosa de 0,14 mm² en promedio, con una distorsión de la arquitectura trabecular. Además, se observó que dentro de un foco, las células se redujeron de tamaño en comparación con los hepatocitos circundantes; adicionalmente, se evidenció una relación nucleo-citoplasma alterada con un núcleo y un citoplasma en posición central con tinción eosinofílica pálida, sin inclusiones intracitoplasmáticas. Por otro lado, en algunos casos, se observaron algunos hepatocitos esteatóticos en el microambiente tisular circundante. (Cano et al., 2018).

2.2.7 Metabolómica

La metabolómica es la disciplina que estudia el conjunto de metabolitos existentes en un sistema biológico, es decir, el metaboloma. Los metabolitos son compuestos de bajo peso molecular resultantes de la actividad celular. A diferencia de las proteínas o los genes, que necesitan modificaciones post-transduccionales o epigenéticas respectivamente para ser activos, los metabolitos son indicadores directos de la actividad bioquímica de la célula en un momento determinado (Regional & Sociedad, 2012) Por este motivo se considera que la metabolómica es el punto final de la cascada "ómica".

El objetivo de las ciencias "ómicas" es entender el funcionamiento global de un organismo a partir del funcionamiento de cada una de sus partes y de las interacciones entre ellas. Por estos motivos es necesario desarrollar un conjunto de técnicas experimentales e informáticas que permitan la generación de las muestras, su análisis instrumental y el posterior tratamiento e interpretación de los datos obtenidos. Las cuatro disciplinas "ómicas" principales son la genómica, transcriptómica, proteómica y más recientemente, la metabolómica (Frias, 2016).

El estudio del metaboloma implica el análisis de un vasto número de compuestos como, por ejemplo, ácidos nucleicos, aminoácidos, azúcares y lípidos. Estos compuestos presentan diferentes propiedades fisicoquímicas y rangos de concentración que pueden variar en el espacio y el tiempo (Frias, 2016).

2.2.7.1 Aproximaciones metabolómicas

La identificación y la cuantificación de la totalidad de metabolitos son tareas complejas que requieren un elevado esfuerzo y tiempo. Debido a esta complejidad, antes de empezar el estudio metabolómico se debe determinar la aproximación que se realizará en función de la información previa disponible sobre el objetivo de estudio. Existen dos enfoques principales: aproximación dirigida y aproximación no dirigida. La selección del tipo de aproximación que se realizará y, por lo tanto, la complejidad del método analítico que se aplicará dependerá de los objetivos del estudio metabolómico. Si el objetivo del estudio se centra en un análisis dirigido, la preparación de la muestra se centrará en los metabolitos de interés. Por el contrario, si se pretende realizar un estudio global, se aplicarán protocolos no selectivos con la finalidad de maximizar la capacidad de detección de metabolitos (Schalley, 2004).

2.2.7.2 Metabolómica no dirigida

El análisis metabolómico no dirigido o global permite una evaluación de los metabolitos extraídos de una muestra y puede revelar perturbaciones nuevas e inesperadas. Los análisis no dirigidos son más efectivos cuando se implementan en un espectrómetro de masas de alta resolución, para facilitar la caracterización estructural de los metabolitos. Su principal ventaja es que ofrece un medio imparcial para examinar la relación entre metabolitos interconectados de múltiples vías. Sin embargo, todavía no es posible obtener todas las clases de metabolitos simultáneamente, ya que muchos factores afectan la recuperación del metabolito, dependiendo del grupo funcional del metabolito. Además, hay una gran cantidad de metabolitos desconocidos que permanecen sin anotar en las bases de datos de metabolitos (Zamboni et al., 2015). Por lo tanto, dependiendo del pH, solvente, química de columna y técnica de ionización utilizada, la metabolómica no dirigida puede proporcionar una evaluación detallada de los metabolitos en una muestra, revelando una amplia gama de clases de metabolitos (Johnson et al., 2016).

2.2.7.3 *Metabolómica dirigida*

Los análisis metabólicos específicos miden las concentraciones de un conjunto predefinido de metabolitos. Se prepara una curva estándar para un rango de concentración del metabolito de interés, de modo que se pueda obtener una cuantificación precisa. Este tipo de análisis se puede utilizar para obtener concentraciones exactas de metabolitos identificados por la metabolómica no dirigida, lo que proporciona una validación analítica del mismo (Johnson et al., 2016).

2.2.7.4 *Imagen metabolómica*

También es posible revelar la localización de metabolitos seleccionados dentro de una muestra de tejido utilizando técnicas de espectrometría de masas por imagen, como la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) (Tanaka et al., 1988).

2.2.8 *Espectrometría de masas en metabolómica*

La espectrometría de masas es una excelente plataforma analítica para el análisis metabólico, ya que proporciona alta sensibilidad, reproducibilidad y versatilidad. Mide las masas de moléculas y sus fragmentos para determinar su identidad. Esta información se obtiene midiendo la relación masa-carga (m/z) de iones que se forman al inducir la pérdida o ganancia de una carga de una especie neutral (Johnson et al., 2016).

La muestra, que comprende una mezcla compleja de metabolitos, puede introducirse en el espectrómetro de masas directamente o precedida por un enfoque de separación (usando cromatografía líquida o cromatografía de gases). La inyección directa se ha implementado con éxito para la metabolómica de alto rendimiento. Sin embargo, como miles de iones pueden estar presentes en los experimentos metabólicos, la separación cromatográfica antes de ingresar al espectrómetro de masas minimiza la supresión de la señal y permite una mayor sensibilidad y, al proporcionar un identificador de tiempo de retención, puede ayudar aún más a la identificación del metabolito. Además de la relación m/z y la información del tiempo de retención, la identificación de un ion se

ve facilitada por la información del patrón de fragmentación que se adquiere mediante la espectrometría de masas en tándem (Schalley, 2004).

2.3 Marcos Conceptuales o Glosario

ACP: Análisis de componentes principales

AFP: Alfa-fetoproteína

AFP-L3: Lente de AFP culinaris aglutinina 3

CHC: Carcinoma hepatocelular

FFEP: Fijado en formol y embebido en parafina

HE: Hemátoxilina y eosina

M/z: Masa/carga

MS: Espectrometría de masas.

MVA: Análisis multivariante

ND: Nódulo displásico

PAS: Ácido peryódico de schiff

PMH: Proyecto Metaboloma Humano

RT: Tiempo de retención

UHPLC: Cromatografía Líquida de ultra alta presión

UVA: Análisis univariado

3 HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1 Identificación de variables

VARIABLE: Perfil metabolómico de focos hepáticos de células claras y de tejido no tumoral circundante.

3.2 Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicadores	Escala
Perfil metabólico de focos hepáticos de células claras y de tejido no tumoral circundante.	Identificación y cuantificación de un número limitado predeterminado de metabolitos relacionados entre sí por similitudes físico-químicas o rutas metabólicas concretas (Fiehn, 2001) en muestras parafinadas de carcinoma hepatocelular	Identificación y descripción de la mayor cobertura de los metabolitos en focos hepáticos y tejido no tumoral circundante de muestras parafinadas según los modos de ionización (positivo y negativo) y rangos obtenidos de los indicadores, contrastado con la base de datos de Metaboloma Humano (HMDB) y el sistema Metaboanalyst.	Perfil metabólico de focos hepáticos de células claras	Masa exacta (Da)	Razón
				Tiempo de retención (min)	Razón
				Distribución Isotópica (Fc)	Razón
				Relación Masa/Carga (m/z)	Razón
		Identificación y descripción de la mayor cobertura de los metabolitos en focos hepáticos y tejido no tumoral circundante de muestras parafinadas según los modos de ionización (positivo y negativo) y rangos obtenidos de los indicadores, contrastado con la base de datos de Metaboloma Humano (HMDB) y el sistema Metaboanalyst.	Perfil metabólico de tejido hepático no tumoral circundante	Masa exacta (Da)	Razón
				Tiempo de retención (min)	Razón
				Distribución Isotópica (Fc)	Razón
				Relación Masa/Carga (m/z)	Razón

3.3 Matriz de consistencia

Problema de investigación	Variables	Objetivo general	Objetivos específicos	Métodos
¿Cuál es el perfil metabólico de los focos hepáticos de células claras y del tejido no tumoral circundante en muestras parafinadas de pacientes peruanos con carcinoma hepatocelular?	Perfil metabólico en muestras parafinadas de pacientes con carcinoma hepatocelular	Evaluar el perfil metabólico de focos hepáticos de células claras y del tejido no tumoral circundante en muestras parafinadas de pacientes peruanos con carcinoma hepatocelular.	Identificar el perfil metabólico de los focos hepáticos de células claras en muestras parafinadas de pacientes peruanos con carcinoma hepatocelular. Identificar el perfil metabólico del tejido no tumoral circundante en muestras parafinadas de pacientes peruanos con carcinoma hepatocelular.	Identificación y análisis histológicos de focos hepáticos de células claras. Microdissección láser de focos de células claras y tejido no tumoral circundante. Extracción de metabolitos, método adaptado de Yuang (Yuan et al., 2012): Desparafinado con calor y agregando metanol 80% a la muestra, seguido de centrifugaciones sucesivas. Proceso de separación mediante cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) y detección por sistema acoplado a espectrometría de masas (MS). Análisis de datos mediante Mzmine y Metaboanalyst, así como el análisis estadístico de Componentes principales y el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales.

4 METODOLOGÍA

4.1 Tipo y Diseño de Investigación

TIPO: Descriptivo, comparativo.

DISEÑO: No Experimental (observacional).

4.2 Unidad de análisis

Muestras fijadas en Formol y embebidas en parafina (FFEP) de pacientes con carcinoma hepatocelular.

4.3 Población de estudio

120 Muestras FFEP de tejido hepático de pacientes con carcinoma hepatocelular

4.4 Tamaño de muestra

40 muestras FFEP de pacientes con carcinoma hepatocelular que presenten focos hepáticos de células claras.

4.5 Selección de la muestra

Se cuenta con una base de datos previa de muestras FFEP de CHC, sobre los cuales se buscarán la presencia de focos Hepáticos de células claras. Asimismo se realizará la búsqueda en sistema informático SISINEN del INEN de nuevos casos de CHC.

4.5.1.1 Criterios de inclusión:

Muestras con diagnóstico confirmado de CHC.

Muestras que cuenten con tejido FFEP en el Banco de Tejidos Tumorales.

4.5.1.2 Criterios de exclusión:

Muestras de pacientes que presenten metástasis.

4.6 Técnicas de recolección de Datos

4.6.1 Recoleccion de datos y muestras archivadas

Se procederá a la búsqueda de casos en una Base de Datos pre existente de registro de muestras del Banco de Tejidos Tumorales (BTT) del INEN; con el apoyo del Sistema Informático Hospitalario “SISINEN” de la entidad colaboradora. A través de este sistema, podemos acceder a algunos datos clínico patológicos de interés. En la base de datos mencionada, se realizará la búsqueda de muestras con diagnóstico confirmado de Carcinoma Hepatocelular (CHC).

4.6.2 Recoleccion de muestras de CHC

Se realizará una búsqueda diaria de las citas pre operatorias programadas en el apartado de trillado general del SISINEN. Para este fin, se contará con la colaboración del Departamento de Cirugía de Tórax del INEN, a través del cual se realiza la programación de operaciones de los pacientes con diagnóstico presuntivo de CHC.

Luego de la operación y de forma inmediata, se recibirán las muestras biológicas en los exteriores de la sala de operaciones, mediante el uso de una caja térmica o *cooler* de transporte y hielo o gel refrigerante (Gel pack) para mantener la cadena de frío.

La recolección y proceso de muestras biológicas se realizará a través de un protocolo diseñado por el Banco de Tejidos Tumorales y adaptado al estudio. Este proceso contempla la recepción de la muestra, transporte, proceso (disección y preparación de alícuotas), codificación, almacenamiento y registro de los especímenes en la Base de Datos del Departamento. Las muestras obtenidas de Sala de operaciones, constan de dos fragmentos: Tumoral y No Tumoral.

4.6.3 Proceso de alicuotado y fijación de las muestras

Los fragmentos de tejidos serán diseccionados en un ambiente especial, dentro de una cabina de flujo laminar, cumpliendo las medidas de bioseguridad adecuadas. Las

muestras No tumorales serán alicuotados y fijados en formalina bufferada al 10% durante 24 horas, para luego ser incluídas en parafina.

4.6.4 Identificación de los focos de células claras y tejido no tumoral

Las muestras FFEP de CHC serán seccionadas en el Micrótomó CM2245 de Leica a 3 micrómetros de grosor. Luego del proceso de microtomía, las muestras serán coloreadas con la técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

Las láminas serán revisadas en conjunto con un Médico Patólogo, siguiendo la ficha de análisis histológico adjunto (Anexo n°1).

Luego de la identificación de focos hepáticos de células claras, se procederá a realizar un nuevo corte de las muestras FFEP de CHC a 6 micrómetros de grosor, para ser montado sobre una láminas portaobjeto especial con membrana PEN (naftalato de polietileno) y se procederá con la tinción de Hematoxilina – Eosina, (Anexo N°2)

4.6.5 Microdissección de los focos de células claras y tejido no tumoral

Una vez identificado la zona de interés en el tejido, se procederá a emplear el Equipo MDL7 (Microdissección Laser) de acuerdo al protocolo del fabricante y se ejecutará el software “LEICA LMD7”.

Se recolectarán 4 mm² de tejido de focos hepáticos de células claras y tejido no tumoral circundante de cada muestra.

Todas las regiones y/o células aisladas usando MDL se recogerán en criotubos de 0.5 mL estériles, posteriormente todas las muestras se almacenarán a -80 ° C hasta la extracción de metabolitos.

4.6.6 Extracción de metabolitos (Método adaptado de Yuang et al.,2012)

La extracción de metabolitos de las muestras de FFPE se realizará agregando 1 ml de metanol al 80% directamente a la muestra e incubando a 70 ° C durante 30-45 min en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml sin ningún procedimiento previo de

desparafinización. Luego, la muestra se colocará en hielo durante 15 min y se centrifugará a 14.000 g durante 10 minutos en refrigeración de 4°C a 8°C.

El sobrenadante se transfrirá a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se enfriará en hielo durante 10 min, seguido de una centrifugación a 14.000 g durante 5 min (4-8°C). Finalmente, se recogerá el sobrenadante y se almacenará a -80 ° C.(Yuan et al., 2012)

4.6.7 Proceso de muestras en Cromatografía Líquida de ultra alta presión asociado a espectrometría de masas (UHPLC-MS)

Para el perfil metabolómico de las muestras, emplearemos un sistema metabolómico integrado de UHPLC / MS (Waters Acquity, Millford, MA, USA) no dirigido. La plataforma de metabolómica, para asegurar una cobertura amplia del metaboloma utilizará dos modos de operación: UHPLC / MS-MS en el modo de ionización por electrospray positivo (ESI) optimizado para la detección de especies básicas y UHPLC / MS-MS en el modo ESI negativo optimizado para la detección de especies ácidas.

Los parámetros cromatográficos se establecerán de la siguiente manera: el volumen de inyección será de 1,5 µl y se empleará una columna de fase inversa ACQUITY UHPLC CSH C18 (1,7 µm, 100 x 2,1 mm) a una temperatura de 55°C.

La separación de los metabolitos se realizará a un caudal de 0,4 mL / min con una fase móvil compuesto de acetonitrilo: H₂O (60:40) durante 15 minutos de separación cromatográfica total.

Los parámetros de MS se ejecutarán de la siguiente manera: voltaje capilar a 1.8 kV y 1.5 kV, y voltaje de cono a 70 V y 20 V, para los modos de polaridad positiva y negativa, respectivamente; así como un flujo de gas de desolvatación a 900 Lhr⁻¹ y temperatura a 500 ° C y 550 °C para el modo de polaridad positiva y negativa, respectivamente.

Se trabajará con datos de UHPLC-MS en modo de barrido completo de centroide de 50 a 1200 de relación m/z.

4.7 Análisis e interpretación de la información

Los datos en crudo se organizarán en una serie de tablas de picos generadas mediante el software de uso libre MZmine. Posteriormente estas tablas serán convertidas a un formato mzXML usando el software MZmine (libre y multiparamétrico).

A través del Mzmine y la plataforma Metaboanalyst (Xia et al., 2012) se llevará a cabo un análisis no dirigido de los resultados obtenidos. Para ello se seleccionarán muestras con un mínimo de dos iones. Las muestras serán alineadas utilizando una ventana de tiempo de retención de $0.1\% \pm 0.25$ minutos y una ventana de masa de $10.0 \text{ ppm} \pm 2.0$ mDa. Se analizarán las características comunes, corrigiendo sesgos individuales.

El análisis estadístico de Componentes principales y el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales, facilitará la interpretación funcional de los datos en el análisis de las vías metabólicas.

4.8 Aspectos éticos

El proyecto de investigación contempla la recolección de nuevos casos de estudio. Para lograr este objetivo, en coordinación con el médico tratante, se contactará con el paciente y/o familiares directos un día antes de la fecha de operación programada, con la finalidad brindar información del estudio de investigación y proceder con la firma del consentimiento informado (Anexo N° 3). Los investigadores mantendrán la confidencialidad de los datos e identidad de los usuarios, limitándose a los objetivos del presente proyecto.

5 PRESUPUESTO

El presente proyecto de investigación forma parte del proyecto financiado por FONDECYT "ANÁLISIS METABOLÓMICO DE FOCOS HEPÁTICOS SIN PRECEDENTES DE ALTERACIÓN CELULAR EN CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC) EN LA POBLACIÓN PERUANA" INEN – FONDECYT 096-2018.

PARTIDA		DETALLE	MONTO (S/.)
BIENES	Materiales de escritorio	Lapiceros, hojas bond, tintas y toner de impresión.	200.00
	Materiales de Laboratorio	Micropipetas Cuchillas descartables de perfil alto Leica 818 Láminas porta objetos PEN para MDL. Láminas portaobjetos de vidrio Criotubos 0.2 mL.	7000.00
	Productos químicos	Agua MiliQ MTBE Metanol Acetonitrilo Hematoxilina de harris Eosina Alcohol absoluto grado HPLC	3000.00
	Equipos de computo	Laptop	0

	Equipos (laboratorio)	UHPLC / MS MDL7 Centrífugas Micrótopo de rotación	0
	Materiales de aseo	Gel antibacteriano, jabón líquido, alcohol, papel toalla, papel tissue	300.00
		Subtotal bienes	S/.10500.00
SERVICIOS	Courier envío de muestras biológicas	Universidad de Toulouse-Francia	5000.00
	Fotocopiado e impresión	Impresiones, empastado	600.00
		Subtotal servicios	S/. 5600.00
		Total General	S/. 16100.00

6 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

N°	ACTIVIDADES	MES 1				MES 2				MES 3				MES 4				MES 5			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Adquisicion de insumos y reactivos	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x								
2	Recolección de muestras	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x								
3	Identificación de focos hepaticos							x	x	x	x	x	x	x							
4	Estudios pilotos previos pre proceso de muestras.							x	x	x	x	x	x								
5	Corte con MDL 7 de los focos hepaticos											x	x	x	x	x					
6	Extracción de metabolitos												x	x	x	x					
7	Análisis de LC –MS																x	x	x	x	
8	Análisis estadístico de datos obtenidos e interpretacion																x	x	x	x	x
9	Redacción y presentación del Informe de Investigación																			x	x

7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abu Al-Rub, R. K. (2008). Surface/inter facial effects on size dependent strength of micro/nano systems. In *Collection of Technical Papers - AIAA/ASME/ASCE/AHS/ASC Structures, Structural Dynamics and Materials Conference* (Issue 9). <https://doi.org/10.2514/6.2008-1946>
- Altekruse, S. F., McGlynn, K. A., & Reichman, M. E. (2009). Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *Journal of Clinical Oncology*, 27(9), 1485–1491. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.7753>
- Balogh, J., Iii, D. V., Gordon, S., Li, X., Ghobrial, R. M., & Jr, H. P. M. (2016). Jhc-3-041. *Journal of Hepatocellular Carcinoma, Volume 3*, 41–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/JHC.S61146>
- Bannasch, P., Ribback, S., Su, Q., & Mayer, D. (2017). Clear cell hepatocellular carcinoma: origin, metabolic traits and fate of glycogenotic clear and ground glass cells. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, 16(6), 570–594. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(17\)60071-7](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(17)60071-7)
- Bertani, S., Pineau, P., Loli, S., Moura, J., Zimic, M., Deharo, E., & Ruiz, E. (2013). An Atypical Age-Specific Pattern of Hepatocellular Carcinoma in Peru: A Threat for Andean Populations. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067756>
- Bertuccio, P., Turati, F., Carioli, G., Rodriguez, T., La Vecchia, C., Malvezzi, M., & Negri, E. (2017). Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality. *Journal of Hepatology*, 67(2), 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.011>
- Cano, L., Cerapio, J. P., Ruiz, E., Marchio, A., Turlin, B., Casavilca, S., Taxa, L., Marti, G., Deharo, E., Pineau, P., & Bertani, S. (2018). Liver clear cell foci and viral infection are associated with non-cirrhotic, non-fibrolamellar hepatocellular carcinoma in young patients from South America. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28286-0>

- El-Serag, H. B. (2020). Hepatocellular carcinoma. *British Journal of Hospital Medicine*, 53(3), 74–80.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119436812.ch59>
- El-Serag, H. B., Hampel, H., & Javadi, F. (2006). The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: A systematic review of epidemiologic evidence. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(3), 369–380.
<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2005.12.007>
- El-Serag, H. B., Marrero, J. A., Rudolph, L., & Reddy, K. R. (2008). Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 134(6), 1752–1763.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.090>
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557–2576.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061>
- Fassio, E., Díaz, S., Santa, C., Reig, M. E., Artola, Y. M., de Mattos, A. A., Míguez, C., Galizzi, J., Zapata, R., Ridruejo, E., de Souza, F. C., Hernández, N., & Pinchuk, L. (2010). Etiology of hepatocellular carcinoma in Latin America: A prospective, multicenter, international study. *Annals of Hepatology*, 9(1), 66–69.
[https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31681-3](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31681-3)
- Ferrarini, A., Di Poto, C., He, S., Tu, C., Varghese, R. S., Kara Balla, A., Jayatilake, M., Li, Z., Ghaffari, K., Fan, Z., Sherif, Z. A., Kumar, D., Kroemer, A., Tadesse, M. G., & Resson, H. W. (2019). Metabolomic Analysis of Liver Tissues for Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Proteome Research*, 18(8), 3067–3076. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00185>
- Frias, G. I. (2016). *Guillermo Iriondo Frias*.
- Gouas, D., Shi, H., & Hainaut, P. (2009). The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): Biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Letters*, 286(1), 29–37.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.057>
- H.B, K. L. and E.-S. (2018). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.065> Epidemiology

- Hailey, J. R., Walker, N. J., Sells, D. M., Brix, A. E., Jokinen, M. P., & Nyska, A. (2005). Classification of Proliferative Hepatocellular Lesions in Harlan Sprague–Dawley Rats Chronically Exposed to Dioxin-Like Compounds. *Toxicologic Pathology*, 33(1), 165–174. <https://doi.org/10.1080/01926230590888324>
- Hajarizadeh, B., Grebely, J., & Dore, G. J. (2013). Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(9), 553–562. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.107>
- Huang, Q., Tan, Y., Yin, P., Ye, G., Gao, P., Lu, X., Wang, H., & Xu, G. (2013). Metabolic characterization of hepatocellular carcinoma using nontargeted tissue metabolomics. *Cancer Research*, 73(16), 4992–5002. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0308>
- Incidence, N. C., Lived, Y., & Disability, W. (2017). Erratum: Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A systematic analysis for the global burden of disease study (JAMA. *JAMA Oncology*, 3(3), 418. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0098>
- Ji, J., Wang, H., Li, Y., Zheng, L., Yin, Y., Zou, Z., Zhou, F., Zhou, W., Shen, F., & Gao, C. (2016). Diagnostic Evaluation of Des-Gamma-Carboxy Prothrombin versus α -Fetoprotein for Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in China: A Large-Scale, Multicentre Study. *PLoS ONE*, 11(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153227>
- Jin, M., Dewa, Y., Kawai, M., Nishimura, J., Saegusa, Y., Kemmochi, S., Harada, T., Shibutani, M., & Mitsumori, K. (2009). Induction of liver preneoplastic foci in F344 rats subjected to 28-day oral administration of diheptyl phthalate and its in vivo genotoxic potential. *Toxicology*, 264(1–2), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.07.006>
- Johnson, C. H., Ivanisevic, J., & Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(7), 451–459. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>
- Kojiro, M., Wanless, I. R., Alves, V., Badve, S., Balabaud, C., Bedosa, P., Bhathal, P., Bioulac-Sage, P., Brunt, E. M., Burt, A. D., Craig, J. R., Dhillon, A., Ferrell, L., Geller, S. A., Goodman, Z. D., Gouw, A. S. H., Guido, M., Guindi, M.,

- Hytioglou, P., ... Taniakos, D. (2009). Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: A report of the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia. *Hepatology*, 49(2), 658–664. <https://doi.org/10.1002/hep.22709>
- Libbrecht, L., Desmet, V., & Roskams, T. (2005). Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. *Liver International*, 25(1), 16–27. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01016.x>
- McGlynn, K. A., Evans, A. A., & Thomas London, W. (2012). Epidemiology of Viral Hepatitis B-related Hepatocellular Carcinoma. *Chronic Hepatitis B and C: Basic Science to Clinical Applications*, 142(6), 71–97. https://doi.org/10.1142/9789814299794_0003
- Méndez-Sánchez, N., Ridruejo, E., Alves de Mattos, A., Chávez-Tapia, N. C., Zapata, R., Paraná, R., Mastai, R., Strauss, E., Guevara-Casallas, L. G., Daruich, J., Gadano, A., Parise, E. R., Uribe, M., Aguilar-Olivos, N. E., Dagher, L., Ferraz-Neto, B. H., Valdés-Sánchez, M., & Sánchez-Avila, J. F. (2014). Latin American Association for the Study of the Liver (LAASL) Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatocellular Carcinoma. In *Annals of Hepatology* (Vol. 13, Issue 4215). [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)30919-6](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)30919-6)
- Perú. Ministerio de Salud. (2013). *Análisis de la situación del cáncer en el Perú, 2013*. https://www.dge.gob.pe/portal/docs/asis_cancer.pdf
- Piñero, F., Dirchwolf, M., & Pessôa, M. G. (2020). Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis, Prognosis and Treatment Response Assessment. *Cells*, 9(6), 1–27. <https://doi.org/10.3390/cells9061370>
- Piñero, F., Pages, J., Marciano, S., Fernández, N., Silva, J., Anders, M., Zerega, A., Ridruejo, E., Ameigeiras, B., D'Amico, C., Gaite, L., Bermúdez, C., Cobos, M., Rosales, C., Romero, G., McCormack, L., Reggiardo, V., Colombato, L., Gadano, A., & Silva, M. (2018). Fatty liver disease, an emerging etiology of hepatocellular carcinoma in Argentina. *World Journal of Hepatology*, 10(1), 41–50. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i1.41>
- Piñero, F., Poniachik, J., Ridruejo, E., & Silva, M. (2018). Hepatocellular carcinoma in Latin America: Diagnosis and treatment challenges. *World Journal of Gastroenterology*, 24(37), 4224–4229. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i37.4224>

- Regional, G., & Sociedad, A. (2012). *Boletín graseqa*.
- Ruiz, E., Rojas Rojas, T., Berrospi, F., Chávez, I., Luque, C., Cano, L., Doimi, F., Pineau, P., Deharo, E., & Bertani, S. (2016). Hepatocellular carcinoma surgery outcomes in the developing world: A 20-year retrospective cohort study at the National Cancer Institute of Peru. *Heliyon*, 2(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2015.e00052>
- Schalley, C. A. (2004). The expanding role of mass spectrometry in biotechnology Gary Siuzdak. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(4), 625–625. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2003.12.009>
- Sherman, M. (2010). Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Seminars in Liver Disease*, 30(1), 3–16. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1247128>
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., & Matsuo, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8), 151–153. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290020802>
- Tang, A., Hallouch, O., Chernyak, V., Kamaya, A., & Sirlin, C. B. (2018). Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. *Abdominal Radiology*, 43(1), 13–25. <https://doi.org/10.1007/s00261-017-1209-1>
- Taningher, M., Peluso, M., Parodi, S., Ledda-Columbano, G. M., & Columbano, A. (1995). Genotoxic and non-genotoxic activities of 2,4- and 2,6-diaminotoluene, as evaluated in Fischer-344 rat liver. *Toxicology*, 99(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)02976-F](https://doi.org/10.1016/0300-483X(95)02976-F)
- Trevisani, F., D’Intino, P. E., Morselli-Labate, A. M., Mazzella, G., Accogli, E., Caraceni, P., Domenicali, M., De Notariis, S., Roda, E., & Bernardi, M. (2001). Serum α -fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: Influence of HBsAg and anti-HCV status. *Journal of Hepatology*, 34(4), 570–575. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)00053-2)
- Wong, R. J., Ahmed, A., & Gish, R. G. (2015). Elevated Alpha-Fetoprotein: Differential Diagnosis - Hepatocellular Carcinoma and Other Disorders. *Clinics in Liver Disease*, 19(2), 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.01.005>

- Xu, L., Kim, Y., Spolverato, G., Gani, F., & Pawlik, T. M. (2016). Racial disparities in treatment and survival of patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 5(1), 43–52. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2015.08.05>
- Yang, J. D., Hainaut, P., Gores, G. J., Amadou, A., Plymoth, A., & Roberts, L. R. (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(10), 589–604. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y>
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>
- Younossi, Z. M., Otgonsuren, M., Henry, L., Venkatesan, C., Mishra, A., Erario, M., & Hunt, S. (2015). Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology*, 62(6), 1723–1730. <https://doi.org/10.1002/hep.28123>
- Yuan, M., Breitkopf, S. B., Yang, X., & Asara, J. M. (2012). A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nature Protocols*, 7(5), 872–881. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.024>
- Zamboni, N., Saghatelian, A., & Patti, G. J. (2015). Defining the Metabolome: Size, Flux, and Regulation. *Molecular Cell*, 58(4), 699–706. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.021>

8 ANEXOS

Anexo N° 1:

FICHA DE ANÁLISIS FOCOS HEPÁTICOS

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA:

- HC:
- AP:
- Registra muestra en BTT

- Tipo de muestra disponible:
 - CT
 - OCT
 - Adicional
- Diagnóstico descriptivo:
- Presencia de focos de células claras:
 - Láminas Presentes:
 - Zona de análisis

OTROS HALLAZGOS DE INTERÉS EN EL CASO DE ESTUDIO:

- Hepatitis de interfase:
 - Ausente:
 - Presente:
 - Leve (focal en algunas áreas portales)
 - Leve/moderada (focal en la mayoría de áreas portales)
 - Moderada (continua en alrededor < 50% de tractos o septos)
 - Severa (continua en alrededor > 50% de tractos o septos)

- Esteatosis
 - Ausente:
 - Presente: ¿Subtipo?

- Microvacuolar
 - Macrovacuolar
- Grado
 - Leve (<33%)
 - Moderada (33% a 66%)
 - Severa (>66%)
- Fibrosis
 - Ausente
 - Presente
 - Grado:
- Inflamación Portal
 - Ausente
 - Presente
 - Tipo predominante:

Anexo N° 2:

PROTOCOLO DE TINCIÓN DE HEMATOXILINA (HARRIS) – EOSINA

DESPARAFINIZACIÓN

1. Colocar las láminas en la Estufa a 63°C durante 30 minutos.
2. Retirar de la estufa, dejar enfriar y colocar sobre Xilol durante 3 minutos.
3. Colocar sobre Xilol durante 3 minutos

HIDRATACIÓN

4. Llevar las láminas a Alcohol absoluto 1 durante 3 minutos.
5. Colocar sobre Alcohol absoluto 2 durante 3 minutos.
6. Colocar sobre Alcohol corriente durante 3 minutos.
7. Llevar a Agua corriente durante 1 minuto.

COLORACIÓN NUCLEAR

8. Incubar en Hematoxilina de Harris durante 6 minutos a temperatura ambiente.
9. Lavar en Agua corriente durante 1 minuto.

DECOLORACIÓN

10. Introducir en Agua acida 2 veces.
11. Lavar en Agua corriente durante 1 minuto.

AZULAMIENTO

12. Introducir en Agua amoniacal 15 veces.
13. Lavar en Agua corriente durante 1 minuto.

CONTRASTE

14. Llevar a Alcohol corriente durante 30 segundos.
15. Colocar en Eosina/Floxina durante 15 a 20 segundos.

DESHIDRATACIÓN

16. Introducir en Alcohol corriente 1 por 10 veces.
17. Introducir en Alcohol corriente 2 por 10 veces.
18. Colocar en Alcohol absoluto 1 durante 2 minutos.
19. Colocar en Alcohol absoluto 2 durante 2 minutos.

20. Colocar en Alcohol absoluto 3 durante 2 minutos.

ACLARAMIENTO

21. Colocar en Master Clear 1 durante 3 minutos.

22. Colocar en Master Clear 2 durante 3 minutos.

Anexo N° 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ALMACENAMIENTO Y USO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

BANCO DE TEJIDOS TUMORALES

(Ley General de Salud N° 26842, RM N° 214-2018-MINSA que aprueba la NTS N° 139-MINSA/2018/DEGAIN: “Norma Técnica de Salud para la Gestión de la Historia Clínica”, Ley N° 29733)

Descripción:

Las muestras biológicas humanas, pueden ser: sangre, células, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, tejidos que puedan albergar información genética y/o molecular y/o biológica, entre otras.

Este material biológico se conserva y almacena en el Banco de Tejidos Tumorales del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) en condiciones de adecuada seguridad y trazabilidad, y serán utilizadas en proyectos de investigación científica aprobados por el Comité Institucional de Ética en Investigación del INEN.

Los datos personales serán disociados de las muestras mediante un sistema de codificación propio, manteniendo la confidencialidad de su identidad. Tenga la plena seguridad que al amparo de la Ley N° 29733, Ley de Protección de Datos Personales, resguardaremos en todo momento su intimidad y confidencialidad de sus datos personales.

Los datos personales y muestras biológicas serán utilizados en investigación científica y/o académica en análisis de expresión de genes, detección de mutaciones, secuenciamiento parcial o total del genoma, análisis de proteínas, entre otras metodologías con fines de publicaciones científicas.

La decisión de permitir utilizar las muestras para fines de investigación es totalmente voluntaria. Su decisión, sea cual fuere, no conllevará penalización alguna, ni afectará en ningún modo a los cuidados médicos, tratamiento o la asistencia que pueda necesitar en un futuro. Así mismo, es posible la revocación del consentimiento, y cuando usted

lo desee, puede solicitar la eliminación de todos sus datos personales y muestras que permanezcan almacenadas en el Banco.

No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas. Las muestras no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales.

Objetivo:

Autorizar la conservación y uso de muestras biológicas humanas para fines de investigación científica.

Consecuencias de participar en el procedimiento:

Contribuir en investigaciones científicas, con fines diagnósticos, terapéuticos, educativos, destinadas a la prevención y control del cáncer en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas y del Perú.

Consecuencias de no participar en el procedimiento:

No existen consecuencias, ya que usted puede decidir otorgar o negar su consentimiento, sin afectar la calidad de atención en salud a la que usted tiene derecho.

Riesgos reales y potenciales:

No existen riesgos reales ni potenciales al participar en las investigaciones que se realicen a partir de las muestras donadas, pues los datos personales, sus muestras y los resultados de las mismas se manejarán manteniendo la confidencialidad, mediante medidas que garantizan el anonimato.

Recomendaciones:

Dejar información de contacto, en caso se encuentre datos relevantes, posibles hallazgos genéticos de relevancia clínica para el donante

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO:

Yo, de años de edad, con domicilio en; en calidad de Donante (), Representante Legal o Tutor () del donante:, con número de Historia Clínica N°, con el Diagnóstico:

Declaro:

En mi calidad de donante y/o representante legal del mismo, en pleno uso de mis facultades mentales y de mis derechos de salud, declaro:

1. Que se me ha explicado sobre las actividades de investigación que realiza el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).
2. Haber recibido y comprendido la información brindada acerca de las ventajas e inconvenientes de este procedimiento y el manejo de mis muestras biológicas donadas.
3. Haber sido informado que se resguardará mi intimidad, confidencialidad de mis datos personales, información sobre mi enfermedad en las investigaciones científicas.
4. Haber podido formular todas las preguntas que he creído oportunas sobre el procedimiento a realizar.
5. Saber que en cualquier momento puedo revocar (rechazar) mi consentimiento, esta no afectará la calidad de atención a la que tengo derecho.
6. Por lo tanto, con la información correcta, oportuna, completa, adecuada y sin presión alguna, voluntaria y libremente SI () NO () doy mi consentimiento para la donación de:

Tejido Tumoral	()	Sangre	()	Cabello	()
Tejido No Tumoral	()	Mucosa Bucal	()	Orina	()
Medula Ósea	()	Uña	()	Otros:	()

SI () NO () doy autorización para que el personal del Banco de Tejidos contacte a mis familiares, en caso se necesite añadir nuevos datos, a los ya recogidos.

SI () NO () doy autorización para que mis familiares sean informados de los posibles hallazgos genéticos de relevancia clínica para ellos.

FECHA:/...../..... HORA:

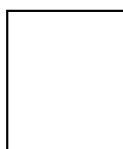
Firma del Donante o representante legal

Nombre y Apellidos:

.....

DNI N°:

.....



Huella Digital
Índice Derecho

Firma y sello del profesional de la salud

Nombre y Apellidos:

N° de colegio profesional:

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO:

Yo, Sr/Sra. de años de edad, con domicilio en; en calidad de Donante (), Representante Legal o Apoderado () revoco el Consentimiento firmado en fecha de del y de forma libre, consciente, en pleno uso de mis facultades, a pesar de haber recibido información sobre la recolección y conservación de mis muestras biológicas y protección de mis datos sensibles en el INEN, decido **NO AUTORIZAR** mi participación en dicho procedimiento.

FECHA:/...../..... HORA:

Firma del Donante o representante legal

Nombre y Apellidos:

.....

DNI N°:

.....



Huella Digital
Índice Derecho

Firma y sello del profesional de la salud

Nombre y Apellidos:

N° de colegio profesional: