



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**CAMBIOS EN EL PERFIL DE
EXPRESIÓN DE GENES EN PACIENTES
PERUANOS JÓVENES CON
CARCINOMA HEPATOCELULAR**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

JUAN PABLO CERAPIO ARROYO

LIMA - PERÚ

2017

Asesor de Tesis:

Michel Sauvain

Al Dr. Stéphane Bertani, investigador del Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD)

Mi más sincero agradecimiento por el apoyo y confianza puestos en mi persona para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Pascal Pineau, investigador del Instituto Pasteur Paris - Francia

Mi sincero agradecimiento por el apoyo, recomendaciones y la experiencia compartida durante la realización de este proyecto.

A Agnes Marchio, ingeniera en el Instituto Pasteur Paris – Francia

Mi eterno agradecimiento por la experiencia compartida y la guía durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Michel Sauvain, director de investigación en el IRD e Investigador principal en la Universidad Peruana Cayetano Heredia

Mi más sincero respeto por el apoyo y recomendaciones brindadas durante el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Franco Doimi, médico patólogo del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN)

Mi más sincero respeto y agradecimiento por la oportunidad de permitirme trabajar en su equipo durante el desarrollo de este proyecto.

INDICE

Página N°

ABSTRACT

RESUMEN

1	INTRODUCCION	1
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3	MARCO TEÓRICO	4
	3.1 Epidemiología del cáncer en el mundo	4
	3.2 Epidemiología del cáncer de hígado	6
	3.3 Factores de riesgo del cáncer de hígado	8
	3.4 Diagnóstico del cáncer de hígado	9
	3.5 Tratamiento del cáncer de hígado	9
	3.6 Cáncer de hígado en el Perú	10
	3.7 Otras aproximaciones para evaluar el CHC en el Perú	13
	3.8 Vías de interés para evaluar en el CHC peruano	14
4	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	17
5	OBJETIVOS	19
6	METODOLOGÍA	20
	6.1 Colección y procesamiento de muestra	20
	6.2 Extracción y purificación de ARN	21
	6.3 Cuantificación de ARN	22
	6.4 Diseño de cebadores	24
	6.5 Evaluación de calidad del cDNA y de los cebadores	33
	6.6 PCR en Tiempo Real en micro-fluidos	35
	6.7 Análisis estadísticos	37
7	RESULTADOS	38
	7.1 Generales	38
	7.2 Expresión de genes que participan en el metabolismo del Arsénico	41
	7.3 Expresión de genes que forman parte de la vía metabólica del Hierro	45

7.4	Expresión de genes que forman parte de los mecanismos de respuesta al estrés oxidativo	49
7.5	Expresión de genes que forman parte de los mecanismos de reparación del ADN	52
7.6	Expresión de genes homeóticos (<i>HOX</i>) y de algunos genes que controlan su expresión	62
7.7	Agrupamiento jerárquico	67
7.8	Selección de genes específicos para cada grupo	70
8	DISCUSIÓN	73
9	CONCLUSIONES	79
10	RECOMENDACIONES	80
11	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	81
12	ANEXOS	90

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the principal histological form of primary liver cancer worldwide and in Peru. Recently, it became the second cause of death by cancer in the world. The HCC generally affect people between 45 and 70 years old, and is caused by chronic diseases (i.e. hepatitis virus), and/or other non-infectious factors (e.g. alcohol, toxins, etc.). In a retrospective study, it has been described that in Peru HCC patients present some unique characteristics in contrast what is observed in Europe, Asia and North America. Peruvian HCC population present age based bimodality (25.5 and 64.5 y.o.), low rate of cirrhosis (12%), extremely big tumor size (>18 cm). Molecular causes and bases of this abnormal situation still unknown, although a first study has shown that the mutational spectrum (insertion/deletion) founded in these patients is not common in HCC patients in other parts of the world, however this new insight could not explain the singularity of this disease in Peru. In the present work has been evaluated expression of genes that are part of arsenic and iron metabolic pathways, because their accumulation in liver tissue is considered a risk factor for HCC development. Genes involved in oxidative stress response and DNA repair were evaluated too, as both are protective response mechanisms of cellular integrity and stability. The homeotic genes (HOX) were also analyzed, they are not expressed or specifically expressed in adult tissues, and their changes of expression could point some cellular reprogramming event. Strong differences of most of the genes evaluated between tumoral (HCC) and non-tumoral (NT) tissue has been observed, specially in those that are part of the DNA repair pathway. The strong differences founded are linked to 2 specific factor, age and hepatitis B virus infection.

KEY WORDS

Liver, Cancer, hepatocellular carcinoma, HCC, Peru, young, expression profile, ARN, molecular study, transcriptomic.

RESUMEN

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la principal forma histológica del cáncer de hígado primario a nivel mundial y en el Perú, y recientemente se ha convertido en la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial. El CHC generalmente afecta a individuos entre los 45 y 70 años, y es causado por una enfermedad crónica (i.e. virus de hepatitis), y/o otros factores no infecciosos (e.g. alcohol, toxinas, etc.). En un estudio retrospectivo se ha descrito que en el Perú los pacientes con CHC presentan características singulares en comparación con lo observado en Europa, Asia y América del Norte. Existe una bimodalidad con respecto a la edad de los pacientes peruanos (25.5 y 64.5 años), la tasa de cirrosis es baja (12%), y los tumores tiene un tamaño extremadamente grande (> 18 cm). Las causas y bases moleculares de esta situación anormal son aún desconocidas, aunque ya se ha reportado que las mutaciones encontradas (inserción/delección) son poco comunes en el perfil de CHC a nivel mundial, pero no explican lo único de esta enfermedad en el Perú. En este trabajo se ha evaluado la expresión de genes que participan en las vías metabólicas del arsénico y el hierro, considerados factores de riesgo para el desarrollo del CHC por el daño que causa su acumulación en el tejido. También se han evaluado genes involucrados en la vía de respuesta al estrés oxidativo y reparación del ADN, ya que ambos mecanismos de respuesta están encargados de proteger la integridad y estabilidad celular. Además, también se han evaluados los genes homeóticos *HOX*, que generalmente no se encuentran expresados en todos los tejidos adultos, pero el diferencial de su expresión puede dar indicio de la ocurrencia de una reprogramación celular. Se ha podido evidenciar que existe un diferencial de expresión entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) en la mayoría de los genes evaluados, específicamente en las vías de reparación del ADN. También se ha podido encontrar que el diferencial de expresión estaría influenciado por dos factores, la edad y la infección por VHB.

PALABRAS CLAVE

Hígado, Cáncer, carcinoma hepatocelular, CHC, Perú, jóvenes, perfil de expresión, ARN, estudio molecular, transcriptómica.

1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la principal forma histológica del cáncer de hígado primario a nivel mundial y en el Perú (1,2), y recientemente se ha convertido en la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial (1). El CHC generalmente afecta a individuos entre los 45 y 70 años (3), y es causado por una enfermedad crónica (i.e. virus de hepatitis), y/o otros factores no infecciosos (i.e. alcohol, toxinas, etc.) (4). Esta enfermedad inicia con un deterioro progresivo y masivo de la función y arquitectura hepática, lo que conlleva al desarrollo de una cirrosis y que finalmente desencadena en CHC (5). En un estudio retrospectivo se ha descrito que en el Perú los pacientes con CHC presentan características singulares en comparación con lo observado en Europa, Asia y América del Norte. Existe una bimodalidad con respecto a la edad de los pacientes (25.5 y 64.5 años), la tasa de cirrosis es baja (12%), y los tumores tiene un tamaño extremadamente grande (> 18 cm) (2). Las causas y bases moleculares de esta situación anormal son aún desconocidas, aunque ya se ha reportado que las mutaciones encontradas (inserción/delección) son poco comunes en el perfil de CHC a nivel mundial (6), pero no explican lo único de esta enfermedad en el Perú.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad el Perú enfrenta numerosos problemas en lo concerniente a salud pública. Principalmente, Enfermedades endémicas como el dengue (arbovirus), SIDA, tuberculosis, paludismo, leishmaniasis o chagas. Además, la alta prevalencia del virus de la Hepatitis B (VHB); donde la incidencia varía por la endemicidad de la zona. En la selva existe una prevalencia de 2.5% – 83%, mientras que en la sierra es de 9.8% y en la costa entre 1% - 3.5% (5,7).

Al igual que en la mayoría de los países en vías de desarrollo, el Perú está presentando un aumento progresivo en los casos de cáncer. En la actualidad, el cáncer es la primera causa de muerte en el Perú con aproximadamente 18500 decesos por año. Recientemente, Bertani *et al* (8) realizaron un estudio retrospectivo de pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC) atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), reportando características singulares de esta enfermedad en la población peruana (e.g. pacientes más jóvenes, niveles de alfa-fetoproteína (AFP) en sangre muy altos, tumores muy grandes, ausencia de cirrosis, etc.); notablemente diferentes a lo observado en Asia, Europa y América del Norte.

En estudios realizados en diferentes partes del mundo se han reportado mutaciones puntuales por sustitución en nueve genes (*arid2*, *axin1*, *braf*, *ctnnb1*, *nfe2l2*, *h/k/n-ras* y *tp53*) involucrados directamente en el proceso de carcinogénesis del CHC (8–11). Estos genes fueron evaluados en pacientes peruanos con CHC, demostrando que esta enfermedad en el Perú es

completamente diferente (i.e. mutaciones de inserción/delección) a lo que se reporta en el resto del mundo (mutaciones puntuales) (8). Este estudio refuerza la idea que el CHC que se desarrolla en el Perú es una manifestación tumoral inusual y singular que merece ser estudiado.

Hasta el momento se ha demostrado que no se observan mutaciones representativas que puedan ser responsables de lo singular del CHC peruano; por lo que se plantea la posibilidad de que a nivel de expresión de los genes (transcripción de ARN) se podría encontrar algún indicio de lo peculiar de este cáncer. Sin embargo, se hace necesario continuar con las investigaciones del CHC en la población peruana para poder confirmar y explicar con mayor claridad este hallazgo inusual reportado en el Perú.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Epidemiología del cáncer en el mundo

Cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades en las que algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin parar y a diseminarse en el tejido adyacente (12). El cuerpo humano está compuesto de billones de células, por lo que el cáncer puede desarrollarse prácticamente en cualquier parte del cuerpo. Cuando las células envejecen o se dañan, mueren, y nuevas células toman su lugar. Sin embargo este proceso se rompe en el desarrollo del cáncer, en donde las células viejas y dañadas sobreviven en vez de morir, y estas se vuelven más y más anormales con el paso del tiempo (12). Estas células anormales que sobreviven, tienen la capacidad de dividirse sin parar y crecen hasta formar tumores. Aproximadamente, 10 millones de personas son diagnosticadas con cáncer anualmente y más de 6 millones mueren por esta enfermedad a nivel mundial, además en el 2003 se estimó que alrededor de 22 millones de personas a nivel mundial eran pacientes con cáncer (13).

El cáncer es una de las enfermedades que genera una mayor carga económica a nivel mundial, aunque existe una variabilidad geográfica muy acentuada relacionada a su incidencia total y el órgano en que se desarrolla. La compilación de ratios estandarizados por edad a nivel mundial ha permitido la identificación de países y regiones donde algunos tipos de tumores son más comunes (13). Estas diferencias entre países y regiones, en la mayoría de los casos, han reflejado la exposición a distintos factores causantes del desarrollo de esta enfermedad (13).

A pesar de estas diferencias entre regiones, todas se ven afectadas por el cáncer. Esta enfermedad se encuentra distribuida de forma desigual entre los países desarrollados y en vías de desarrollo, con tipos de cáncer particulares que exhiben diferentes patrones de disposición (13). Toda Europa, Japón, Australia, Nueva Zelanda y Norte América son clasificados como “*regiones desarrolladas*”; mientras que África, Latino América y el Caribe, Asia (excluyendo Japón), Micronesia, Polinesia y Melanesia son clasificados como “*regiones en vías de desarrollo*” o menos desarrolladas (14).

Las diferencias en la distribución del cáncer entre regiones parecen ser grandemente atribuidas a las diferencias en el estilo de vida, con indicios de que el rol de la alimentación y el desarrollo de los servicios de salud podrían ser dos de los factores con mayor significancia (13). Por ejemplo, en países en vías de desarrollo las poblaciones son más vulnerables a tipos de cánceres en el que los agentes infecciosos (más del 25% de tumores asociados con infecciones crónicas) juegan un rol significativo, e.g. cáncer de estómago (*Helicobacter pylori*), uterino (Papiloma virus humano) y de hígado (virus de hepatitis B) (15,16). En estas regiones también se ha observado la alta incidencia de cánceres de pulmón, recto, hígado y próstata; mientras que todo lo contrario sucede en países desarrollados, donde la incidencia de cánceres de recto, próstata e hígado cae desproporcionalmente (17).

Más de la mitad de los casos de cáncer se dan en países en vías de desarrollo, a pesar de que los ratios de incidencia en esos países son bajos comparados a los

países desarrollados. Los países desarrollados de Europa, Norte América, Australia y Japón han organizado sofisticados sistemas del cuidado de la salud para el control del cáncer, mientras que muy poco se ha conseguido en este campo en varios países de África Sub-Sahariana, donde incluso los requerimientos básicos para el mínimo cuidado del cáncer son escasos (13). Por otro lado, algunos países en Asia (i.e. China, India, Israel, Irán, Jordania, Omán, Filipinas, Vietnam, Tailandia, Singapur) y América del Sur (i.e. Argentina, Brasil, Perú, Costa Rica, Cuba) han sido más exitosos estableciendo y promoviendo las facilidades para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, en por lo menos algunas regiones del país (13).

3.2. Epidemiología del cáncer de hígado

La principal forma histológica del cáncer de hígado primario a nivel mundial es el carcinoma hepatocelular (CHC) (3). Esta enfermedad se origina en hepatocitos maduros, que se transforman en células malignas, y posteriormente dan origen a los primeros nódulos. A partir de la aparición de los primeros nódulos el crecimiento es exponencial y en aproximadamente nueve meses puede originar un tumor de menos de dos centímetros, este proceso es conocido como *fase asintomática* (5). La única forma de detectar este proceso es por la elevación de los valores séricos de AFP, bilirrubina y transaminasas (5). Cuando el tamaño del tumor excede los dos centímetros, inicia lo que se conoce como la *fase sintomática*, en la cual se presentan ligeras molestias no focalizadas. Estas molestias se acentúan cuando el tumor se encuentra alrededor de los dos centímetros o el paciente tiene 15 meses de evolución (5). La sobrevida luego de

la fase sintomática es de tres meses, por lo tanto si el paciente no es tratado en 18 meses (aproximadamente) puede llegar a la muerte (18).

El CHC generalmente afecta a personas entre los 45 y 70 años, variando de acuerdo a la región (3). En África Subsahariana y Asia los pacientes con CHC se encuentran bordeando los 45 años, mientras que en Europa y América del Norte están entre los 60 y 70 años (3). Es poco común encontrar casos que ocurran antes de los 40 años (2), pero en algunas zonas de alto endemismo del VHB (e.g. Japón), donde la transmisión viral se da a muy temprana edad, se ha evidenciado la ocurrencia de CHC en niños (19).

El CHC es la sexta malignidad más común y en el 2012, se estimó que la ocurrencia de casos nuevos de cáncer de hígado eran de 782000 y que aproximadamente 745000 (95%) personas mueren por este cáncer, a nivel mundial (1). Se ha reportado que más del 80% de CHC ocurre en países en vías de desarrollo, en contraste a lo que se observa en países desarrollados. En la última década, uno de los mayores retos en salud pública es reducir el número de casos de CHC en estos países (20). A pesar de los estimados mundiales, debido a la gran variabilidad de los factores de riesgo (e.g. prevalencia de hepatitis B o C, región geográfica y grupo étnico) la variación de las tasas de CHC es muy amplia (18,19,21,22).

3.3. Factores de riesgo del cáncer de hígado

El mayor porcentaje de la población que desarrolla carcinoma hepatocelular (CHC) en países en vías de desarrollo es debido a una infección crónica causada por los virus de la hepatitis B, C o B + Delta; considerados como los principales factores que originan el desarrollo del CHC. Esta infección origina un deterioro progresivo y masivo de la función y la arquitectura hepática, este deterioro conlleva inicialmente al desarrollo de cirrosis y que sin el tratamiento adecuado desencadena un CHC. La cirrosis debido al virus de la Hepatitis C (VHC) es asociado con una alta incidencia de CHC en Japón y cirrosis por virus de la Hepatitis B (VHB) es la mayor causa de muertes por CHC en el mundo (4).

La incidencia del CHC está directamente correlacionada con el nivel de endemicidad de VHB y VHC de la región. Para combatir la alta incidencia en países con una alta endemicidad y bajos recursos, en el 2006 la Organización Mundial de la Salud (OMS) implantó la vacunación mundial (21). No obstante, el CHC también puede ser desencadenado por procesos no-infecciosos como: altos consumos de alcohol, desórdenes hepáticos (esteatohepatitis no alcohólica/NASH), micotoxinas (Afla-toxina B), poli-metales (e.g. hierro y arsénico) y otros desórdenes genéticos ocasionados por estrés oxidativo (21,23). Los otros factores de riesgo no-infecciosos son considerados también “*cofactores de riesgo*”, ya que en la presencia de VHC o VHB estos tienen un efecto sinérgico (23) en la patogénesis del CHC, aumentando el riesgo de desarrollar CHC.

3.4. Diagnóstico del cáncer de hígado

Para el diagnóstico de esta enfermedad se cuenta con dos herramientas muy importantes, los niveles de alfa-fetoproteína (AFP) en suero y tomografías o ultrasonografías. La AFP, es una proteína que se expresa durante la formación del endodermo (embriogénesis), pero además su expresión es reactivada durante el proceso de tumorigénesis del hígado (24). A pesar de que la AFP no es reconocido mundialmente como un marcador estándar, en la práctica clínica es un biomarcador muy útil para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con CHC. Cuando los valores de AFP son mayor a 400 ng/ml, se sospecha de una falla en el hígado y se le realiza seguimiento al paciente (25). Los exámenes radiológicos se utilizan como exámenes confirmatorios para el diagnóstico de CHC y pueden ir desde una simple tomografía hasta una tomografía de contraste de fases o ultrasonografía (dependiendo del país), ya que las dos últimas pruebas son muy costosas y se realizan en mayor proporción en países desarrollados.

3.5. Tratamiento del cáncer de hígado

Actualmente existen diferentes tratamientos para el CHC. Según los estándares recomendados por la *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC), los tratamientos curativos (resección, trasplante de hígado o tratamiento ablativo local percutáneo) son los más recomendados para paciente en estadios tempranos de CHC. Para pacientes asintomáticos con un CHC multinodular lo recomendado es la quimiebolización transarterial (TACE) y finalmente, para pacientes en estado avanzado (tumores invasivos o extra-hepáticos) se recomienda un tratamiento de quimioterapia con un inhibidor de quinasa (26,27). Unos de los principales

criterios de inclusión de la BCLC es la presencia de cirrosis y que el tamaño del tumor que presenta el paciente debe ser menor a 5 cm de diámetro. Este criterio no se aplica bien a pacientes de países en vías de desarrollo, ya que el diagnóstico ocurre en etapas avanzadas (tumores > 5 cm). Así como el criterio de la BCLC existen otros criterios considerados estándares mundiales, como el criterio de Milán. Este tampoco se aplica a países en vías de desarrollo, ya que recomienda que para trasplantes de hígado el paciente debe tener un tumor solitario < 5 cm de diámetro y para más de tres tumores estos deben ser < 3 cm (4). Finalmente, se sabe que en los países en vías de desarrollo los tratamientos más utilizados son la resección hepática y quimioembolización, mientras que en el caso de los países desarrollados (América del Norte, China y Japón) el trasplante y la resección quirúrgica son las terapias curativas más comunes.

3.6. Cáncer de hígado en el Perú

Recientemente, se ha reportado que el Perú es el país de América del Sur que presente la más alta incidencia de cáncer de hígado primario y que comparada al resto del mundo esta incidencia es intermedia (1,6), y además se ha observado que en la literatura la manifestación clínica presente en el Perú presente algunas particularidades con respecto a lo que se observa en otros países latinoamericanos (Argentina, Brasil, Chile, México, Puerto Rico y Venezuela) (28–31). La situación tal como se describe en el resto de América latina es semejante a lo que se observa en Europa, alta incidencia de VHC y pacientes alrededor de los 70 años.

Al igual que en la mayoría de los países en vías de desarrollo, el Perú está presentando un aumento progresivo en los casos de cáncer, lo que podría ser el principal resultado de 1) las mejoras en el sistema de salud con respecto al cáncer en el Perú durante la última década (mejoras en la detección del cáncer) (32) 2) la alta prevalencia de enfermedades infecciosas (virus y/o parásitos) que contribuyen al desarrollo del cáncer (7) y 3) los cambios ambientales que acompañan el desarrollo económico observado en el país durante los últimos 10 años (e.g. contaminación) (33). En la actualidad, el cáncer es la primera causa de muerte en el Perú con aproximadamente 18500 decesos por año (34).

En el 2007, en un análisis retrospectivo de 232 pacientes, Ruiz *et al* reportaron que en el Perú se encontraban características diferentes en el CHC en comparación a lo que se reporta en el resto del mundo. Encontraron que i) los pacientes eran mucho más jóvenes, con una media de 36 años; ii) la AFP era 100 veces mayor a lo reportado; iii) el tamaño de los tumores era más grande (15 cm vs < 8 cm); iv) el índice de cirrosis más bajo (16%) y v) existía una alta tasa de infección por VHB (18). Con la finalidad de corroborar estos hallazgos, en el 2013 se realizó un análisis retrospectivo de pacientes peruanos con CHC. Se evaluaron 1541 historias clínicas entre los años 1997 y 2010, tomando en cuenta datos del funcionamiento del hígado, estado serológico, patología y condición tumoral, características demográficas, factores de riesgo y origen regional (2). Los resultados reportados corroboraron los hallazgos encontrados por Ruiz *et al.* 2007 (18), demostrando que con relación a la edad se observaba una bimodalidad, dos poblaciones (<40 y >40 años) bien definidas, una con media de 25.5 años (<40) y

otra con 64.5 (>40). Adicionalmente, demostraron que estas poblaciones presentan características patofisiológicas y clínicas específicas. Los menores de 40 años son el grupo que se diferencia del resto del mundo, presentando niveles de AFP 100 veces más de lo normal, tamaño de tumor mayor a 15 centímetros, baja tasa de cirrosis y una alta tasa de infección de VHB (2).

En estudios realizados en diferentes partes del mundo se ha caracterizado el CHC por mutaciones puntuales en nueve genes (*arid2*, *axin1*, *braf*, *ctnnb1*, *nfe2l2*, *h/k/n-ras* y *tp53*) (8–11), dentro de estos nueve genes se incluyen oncogenes (i.e. *h/k/n-ras*); supresores tumorales (i.e. *tp53*, *axin1*); reguladores del ciclo y funciones celulares (i.e. *braf*, *ctnnb1*); y algunos factores de transcripción (i.e. *arid2*, *nfe2l2*). Estos mismos genes han sido evaluados en 80 pacientes voluntarios con CHC que acudieron al INEN entre el 2006 y 2011 (6). El patrón de mutación encontrado en los genes evaluados no fue el esperado (mutaciones puntuales), la mayoría de mutaciones fueron de tipo inserción/delección (6). Como se mencionó anteriormente la AFP se expresa cuando existe un mal funcionamiento en el hígado y en este trabajo se ha reportado que el promedio de la concentración de AFP en suero ha llegado hasta 330000 ng/ml y además se ha encontrado una correlación con uno de los reguladores de su expresión, el factor NANOG. Por otro lado, han demostrado el colapso de la vía *Hippo*, vía encargada de controlar el crecimiento de los órganos, pudiendo ser esta la razón del gran tamaño de los tumores. Este estudio demuestra que esta enfermedad en el Perú es completamente diferente a lo que se reporta en el resto del mundo. A pesar que estas mutaciones resaltan lo inusual y singular de este cáncer, solo se han

observado en el 15% de la población evaluada, no pudiendo explicar hasta el momento la bimodalidad de edad y las características clínico patológicas de estos grupos (6).

3.7. Otras aproximaciones para evaluar el CHC en el Perú

En numerosos estudios se ha reportado que el cambio fenotípico de las células en el proceso cancerígeno no se debe únicamente a mutaciones en genes específicos, si no que este proceso se encuentra también ligado directamente a los niveles de expresión de determinados genes (8–11). Con respecto al CHC, se ha observado que los altos niveles de expresión del factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) y el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2) son responsables de acelerar la proliferación de los hepatocitos. La alteración en la expresión de TGF- α y de IGF-2 se refleja en la expresión de otros genes que se encuentra regulados positivamente por mecanismos epigenéticos durante el estado pre-neoplásico. Además, ligado a este proceso, se ha observado que en hepatocitos que proliferan repetidamente y de forma monoclonal la re-expresión del complejo enzimático de la telomerasa (8).

3.8. Vías de interés para evaluar en el CHC peruano

Se sabe que los cambios en el perfil de expresión pueden influir directamente en el desarrollo del proceso cancerígeno, en el presente trabajo se propone evaluar los niveles de expresión de diferentes genes que se encuentran involucrados en el desarrollo cancerígeno.

Principalmente se seleccionaron genes que se encuentran involucrados en procesos ligados al desarrollo de un CHC:

a. *Mecanismos de respuesta al estrés oxidativo.* Por el proceso de respiración celular, en condiciones normales, se generan constantemente radicales oxidantes; los cuales se encuentran bajo control. Pero durante un proceso tumoral, los altos niveles de proliferación aumentan la producción de estos radicales considerablemente; así como también los mecanismos de respuesta a este estrés (i.e. expresión de genes involucrados en este proceso). Uno de los principales afectados por la gran producción de radicales libres es el ADN, lo que como resultado incrementa la actividad de los mecanismos de reparación del mismo.

b. *Mecanismos de control del daño del ADN (reparación del ADN).* Durante la proliferación celular ocurre la replicación del ADN, este proceso puede originar diferentes tipos de daños en el ADN (i.e. cambio en las bases o nucleótidos que corresponden, etc.), y durante el proceso de carcinogénesis estos daños aumentan por la alta proliferación. Otro de los factores que afecta directamente a los mecanismos de reparación del ADN es la infección del virus

de la hepatitis B, ya que el virus tiende a controlar la maquinaria de reparación del ADN para su propio beneficio y continuar con su proceso de replicación (35).

c. *Metabolismo del arsénico.* El Perú es uno de los países de Sudamérica que presenta los niveles más altos de arsénico (As) en agua (50 – 200 µg/L), por factores naturales (e.g. geológico), por explotación minera o la refinación de metales por fundición (e.g. cobre). El límite recomendado de As por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 10 µg/L. Sin embargo, en el Perú el límite permisible es de 50 µg/L. Esto es un tema de salud crítico, ya que la mayor parte de la incorporación del As viene de los alimentos (50%) y si a esto sumamos el aporte del agua; las concentraciones internas aumentan considerablemente. Recientemente se ha encontrado As almacenado en cabellos y uñas de pacientes peruanos con CHC y personas sanas; sin embargo, en la orina de estas personas no se ha encontrado la presencia de este metal (información no reportada). Finalmente, en zonas endémicas de As en Latino América (e.g. Antofagasta - Chile y Córdoba – Argentina) se ha reportado una asociación de la exposición a altas concentraciones de As con altos niveles de morbilidad por cáncer (36), alto riesgo de mortalidad por cáncer de pulmón y vejiga (37–40), y desarrollo de cáncer de riñón, hígado y piel (39,41–44).

d. *Vía metabólica de hierro,* se ha encontrado la presencia de hierro (Fe^{+3}) en el tejido tumoral (CHC) de pacientes peruanos, en mayor proporción en pacientes < 44 años. Se sabe que el estado del hierro en el organismo está regulado por

un equilibrio entre la absorción y el almacenamiento. La ruptura de esta homeostasis genera el incremento de hierro en el citoplasma celular, lo cual ha sido asociado con el desarrollo de hemocromatosis hereditaria y CHC; además del Parkinson (45). Por estas razones también se ha decidido evaluar la expresión de genes involucrados en la homeostasis y metabolismo del hierro en pacientes peruanos con CHC.

e. *Genes homeóticos (HOX)*, se encuentran organizados en cuatro grupos (HOXA, HOXB, HOXC, HOXD) y generalmente expresados en el desarrollo temprano, para permitir la correcta formación del cuerpo, aunque también se ha reportado la expresión de algunos de ellos en órganos de personas adultas (46). En el hígado de personas adultas sanas se ha encontrado la expresión únicamente los grupos HOXA y HOXB (47). Se sabe, además, que la expresión de estos genes en diferentes órganos adultos les brinda un fenotipo específico, y si este perfil de expresión se ve alterado, se podría deber a una reorganización celular (e.g. desarrollo de cáncer) (48).

4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El CHC es la diecisieteava malignidad más común y la tercera causa de muerte por tumor a nivel mundial, se han reportado hasta 750000 muertes por año. Por varios años se ha subestimado la importancia del CHC y debido a esto su incidencia global se ha duplicado considerablemente durante los últimos 20 años. Cerca del 85% de casos ocurren en países en vías de desarrollo, así como el 64% de las muertes. En la última década uno de los mayores retos en salud pública es reducir el número de casos de CHC en estos países (20).

Recientemente, se ha reportado que el Perú es uno de los países con mayor número de casos de CHC en América del Sur, además cuenta con una población de pacientes con rasgos inusuales y que no se comparan con ninguna reportado a nivel mundial (2). El CHC es una enfermedad que usualmente afecta a individuos mayores de 40 años (45 - 70 años), pero en el Perú se ha encontrado que aproximadamente el 30% de los pacientes con CHC tiene alrededor de 25 años de edad, presentan infecciones virales (VHB) y no presentan cirrosis (80%).

Uno de los biomarcadores más utilizados para diagnóstico y seguimiento de pacientes con cáncer de hígado es la AFP en suero. Si los valores de AFP se encuentran mayor a 400 ng/ml, se sospecha de un daño en el hígado y se continúa con exámenes adicionales (e.g. tomografías) que corroboran la presencia de un tumor en el hígado. En el CHC peruano descrito se ha reportado que el promedio de la concentración de AFP en suero ha llegado hasta 330000 ng/ml.

Hasta el momento no se tiene claro cómo se desarrolla el CHC en la población peruana, y además se ha observado que en la literatura la manifestación clínica presente en el Perú es completamente diferente a lo que se observa en otros países latinoamericanos (Argentina, Brasil, Chile, Méjico, Puerto Rico y Venezuela) (28–31). La situación tal como se describe en el resto de América latina es semejante a lo que se observa en Europa, alta incidencia de VHC y pacientes entre los 60 y 70 años. Lo diferente de esta enfermedad se ha hecho evidente en la edad de un grupo de la población peruana con CHC, que tienen una media de 25 años (2,18). Esta situación evidencia que el CHC según la edad en el Perú tiene una distribución bimodal y no unimodal como se ha descrito hasta el momento (2). Estudios moleculares han corroborado lo inusual de esta enfermedad en este grupo de la población peruana con CHC (6).

Hasta el momento no se ha explorado la influencia de factores de riesgo ambientales (i.e. hierro y arsénico) relacionados al desarrollo del CHC. Es importante continuar con estudios a nivel genético-molecular que permitan dilucidar las bases y características de esta enfermedad. En un futuro estos estudios permitirán definir blancos terapéuticos o biomarcadores de pronóstico/diagnóstico más específicos, además de permitir el desarrollo de posibles tratamientos dirigidos y/o prevenir el desarrollo del CHC en la población peruana. Finalmente, estos estudios también contribuirían con el entendimiento del CHC a nivel mundial.

5. OBJETIVOS

5.1. Principal:

Determinar si el diferencial de expresión de los genes involucrados en los procesos de estrés oxidativo, reparación de ADN, genes HOXA-D y el metabolismo del arsénico y hierro en muestras de CHC y tejido de hígado no-tumoral (NT) permite diferenciar al desarrollo del CHC en personas jóvenes (< 33 años) y mayores (> 33 años).

5.2. Específicos:

- Determinar si es que existe una diferencia significativa entre los niveles de expresión de los genes entre el tejido CHC y NT en jóvenes (< 33 años) y mayores (> 33 años)
- Observar si otra variable diferente a la edad se encuentra ligada al perfil de expresión en el CHC peruano
- Determinar una firma molecular característica para jóvenes (< 33 años) y mayores (> 33 años)

6. METODOLOGÍA

6.1. Colección y procesamiento de muestra

Las muestras con las que se desarrolló el presente trabajo, forman parte de un conjunto de muestras evaluadas anteriormente a nivel genético (8). Este set proviene de un estudio Franco-peruano multidisciplinario dirigido por el Dr. Stéphane Bertani (*Institut de Recherche pour le Développement*), el Dr. Eloy Ruiz (Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas) y el Dr. Pascal Pineau (Instituto Pasteur). Todos los participantes enrolados accedieron de forma voluntaria a formar parte de este proyecto, firmaron un consentimiento informado y se les realizó una encuesta epidemiológica. Las muestras provienen de pacientes con cáncer de hígado primario (CHC), atendidos en el Departamento de Cirugía Abdominal del INEN por el Dr. Eloy Ruiz entre agosto 2006 y marzo 2011. Se captaron pacientes que fueron diagnosticados con cáncer de hígado y que habían sido programados para una resección hepática. Luego del procedimiento quirúrgico, el Dr. Ruiz se encargó de separar las muestras de tejido tumoral y no tumoral.

Los tejidos fueron colocados en nitrógeno líquido y trasladados al Banco de Tejidos Tumoraes del INEN, donde fueron criopreservados a menos 150 °C. Las muestras fueron enviadas (manteniendo la cadena de frío) a la Unidad de Organización Nuclear y Oncogénesis del Instituto Pasteur (Paris - Francia), donde se desarrollaron las siguientes etapas del trabajo de investigación (descritas a continuación). Los tejidos colectados fueron clasificados en tejido tumoral (CHC), tejido no tumoral (NT) y tejido tumoral de hígado no

correspondiente a CHC (tejido no-CHC).

Como parte del set de muestras a utilizar, la Unidad de Organización Nuclear y Oncogénesis del Instituto Pasteur proporcionara células referenciales de tejido de hígado tumoral (*ALEX*) y no tumoral (*FS-H44*). Estas fueron utilizadas en la validación de los cebadores para posteriormente ser utilizadas en la determinación del perfil de expresión de las muestras de pacientes.

Este proyecto multidisciplinario (código INEN 10-05) ha sido revisado y aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) mediante la carta N° 001-2012-CIE/INEN.

6.2. Extracción y purificación del ARN

Para la extracción y purificación del ARN se utilizó el Tri Reagent (MRC), y el protocolo sugerido por el proveedor con algunas modificaciones (49).

El tejido (50 mg) se cortó en pequeños fragmentos, que se colocaron en viales de 1.5 ml que contenían esperas de cerámica de 1.4 mm (Lysing Matrix Tubes – MP Biomedicals) y se le agregó 1 ml de TRI REAGENT. Los viales se colocaron en un homogenizador por 30s a 4°C (FastPrep-24 Homogenizer – MP Biomedicals), este proceso se repitió hasta completar el lisado total del tejido, y se dejó reposar a T° ambiente por 5 min. Se agregó 200 µl de cloroformo y se

agitó vigorosamente por 15 s. Se dejó reposar la mezcla durante 10 min a T° ambiente y se centrifugó a 12000 xg durante 15 min a 4°C. La fase superior (acuosa) se trasladó a un tubo de 1.5 ml.

A continuación, se le agregó 500 µl de isopropanol (100%) y se homogenizó. Esta mezcla se dejó reposando a temperatura ambiente durante 5 min, se centrifugó a 12000 xg por 8 min a 4°C y se descartó todo el sobrenadante por inversión. Se lavó el pellet con etanol al 75% utilizando el vórtex, y se centrifugó a 7500 xg durante 5 min a 4°C. El etanol fue eliminado y el pellet se secó a T° ambiente durante 5 min. Finalmente, el ARN fue resuspendido en agua libre de ARNasas (Ambion) y se almacenó a menos 80 °C hasta su uso.

6.3. Cuantificación y calidad del ARN

6.3.1. Electroforesis Capilar

Para la evaluación de la calidad del ARN se utilizó el Agilent Bioanalyzer. En este equipo la electroforesis capilar se lleva a cabo en una matriz de gel dentro de un set de micro-canales interconectados. La separación de los fragmentos de ácidos nucleicos se lleva a cabo en estos micro-canales (50).

Para la evaluación de muestras de ARN se utilizó el kit RNA 6000 Nano, que permite evaluar muestras entre 5 – 500 ng/µL. Las muestras y reactivos fueron cargados en el chip. Luego, para homogenizar el chip se colocó en un vórtex horizontal a 2400 rpm por 1 min, y finalmente se leyó en el Agilent Bioanalyzer. Los resultados se obtuvieron en forma de electroferogramas, donde se observa la

intensidad de fluorescencia versus el tiempo de migración. Todos los datos obtenidos fueron evaluados y anotados para cada una de las muestras (51). Además, la ventaja del Agilent Bioanalyzer es que brinda un índice de calidad, denominado el “número de integridad del ARN” (RIN). El RIN es el número asignado a la muestra de ARN basada en su perfil electroforético, tomando en cuenta el ratio de sus bandas ribosomales y además la presencia o ausencia de productos degradados. Lo más importante del RIN es que es totalmente independiente de la concentración de las muestras. Según lo recomendado para estudios de expresión se ha trabajado con un corte de RIN mayor a 5 (52).

6.3.2. Cuantificación fluorométrica,

La cuantificación del ARN se realizó utilizando el Qubit, el cual se basa en una lectura fluorométrica, el ARN es marcado con un fluoróforo proporcionado por el proveedor (Qubit® RNA HS kit) y a continuación se realizan las lecturas en el equipo. Se preparó la solución de trabajo diluyendo el reactivo Qubit® RNA HS Reagent 1:200 con el buffer Qubit® RNA HS. Con la solución de trabajo se diluyeron los 2 estándares proporcionados por el proveedor (estándar 1 y 2 - Qubit® RNA HS kit). A continuación, las muestras también se diluyeron 1:100 con la solución de trabajo y se dejaron reposar a T° ambiente por 2 min en oscuridad.

Los dos estándares se leyeron primero para la calibración del equipo y posteriormente se inició con la lectura de las muestras. La concentración original de la muestra se calculó en el equipo utilizando la opción “Calculate Stock

Concentration” e ingresando el volumen de la muestra (1 μ L).

6.4. Diseño de cebadores

Se diseñaron los cebadores para los genes que participan en el metabolismo del arsénico (Anexo - Tabla 1), metabolismo del hierro (Anexo - Tabla 2), respuesta al estrés oxidativo (Anexo - Tabla 3), reparación de ADN (Anexo - Tabla 4) y genes homeóticos (Anexo - Tabla 5), tomando en consideración aquellos involucrados en procesos cancerígenos.

Se utilizó como fuente de las secuencias génicas el *Buscador Genético de la Universidad Santa Cruz de California* (<https://genome.ucsc.edu>) y para el diseño de los cebadores se utilizó el programa en línea Primer3 (<http://primer3.ut.ee>). Para el diseño de los cebadores se tomó en cuenta que estos se ubicaran entre dos exones, que el porcentaje de GC estuviera alrededor de 50% (45 – 55%) y el tamaño de los cebadores este alrededor de 20bp (18 – 22 bp). La consideración en cuanto a la diferencia entre los dos cebadores con respecto al porcentaje de GC y al tamaño fue de no más de 5% y 2bp de diferencia, respectivamente. En total se diseñaron 250 pares cebadores para este trabajo, en promedio por gen se diseñó de 1 a 3 cebadores. Todos los cebadores pasaron por un proceso de validación, descrito en 6.5.3.

TABLA 1. LISTA DE CEBADORES DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DEL ARSÉNICO

Genes	Nombre	Forward	Reverse
<i>aqp7</i>	Aquaporin 7	GACAAAACATGGTTCAAGCATCC	CTATCACGGACCAGGAGACC
<i>aqp9</i>	Aquaporin 9	GACTTTTCACTGCCTTGGCA	CCAATGACAGCACCAACCAA
<i>as3mt</i>	Arsenite methyltransferase	TGAGAAGTTGGGAGAGGCTG	ACCCGATATGCCTCCTGAAG
<i>bach1</i>	Btb and cnc homology 1	CCTTGCCCATATGCTTGTGT	CGTTGTGCATTGAATGGCAG
<i>slc2a4</i>	Solute carrier family 2, member 4	TTCTCCAACCTGGACGAGCAA	GGACCGCAAATAGAAGGAAGAC
<i>mrp1</i>	Multidrug resistance protein 1	GCAAAGACAATCGGATCAAGC	AGCACCTTGTCTTGAATGC
<i>mrp2</i>	Multidrug resistance protein 2	CAATATCCTGCGCTTTCCCC	CAAGTCATCCCCTCCCAAGT
<i>mrp4</i>	Multidrug resistance protein 4	AGAGGGTGTGAGAGGCAATC	CGGTTGCGCTGTGATATCTC
<i>nrf2</i>	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	CGCAGACATTCCTGTTGTA	AGCAATGAAGACTGGGCTCT

TABLA 2. LISTA DE CEBADORES DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DEL HIERRO

Genes	Nombre	Forward	Reverse
<i>bmp1</i>	Bone morphogenetic protein 1	GTTCACCTATCGACCTTGCG	ACAGTTCTTGCCGATGGAGA
<i>bmp2</i>	Bone morphogenetic protein 2	GTCCCCGCGTGCTTCTTA	AGCAGCAACGCTAGAAGACA
<i>cp</i>	Ceruloplasmin	ACACAGATGCCTCCTTCAACA	TCACCCCAATCGGCTCAATA
<i>dmt1</i>	Divalente metal-ion transporter-1	AGCAGGTGGTTGAAGTCTGT	ATCCCCACTGCCCAAATGTA
<i>fpn</i>	Ferroportin	GCGGTCCTGATGCAAAAGAA	AGCAAAACACCCAGCCATTT
<i>fth1</i>	Ferritin heavy polipeptide	CATCAACCGCCAGATCAACC	CACATCATCGCGGTCAAAGT
<i>fil</i>	Ferritin light polypeptide	CGCTCTTCCAGGACATCA	AGAACCCAGGGCATGAAGAT
<i>heph</i>	Hephaestin	CACTTTCATGCAGAGAGCTTCC	CCTCAAAAGTCCCTGGGAACA
<i>hfe</i>	Hemochromatosis	TCTGAAAGACCTGTTGCTTTTC	GCCCATTTCCCAGCTCT
<i>hfe2</i>	Hemochromatosis Type2 (Juvenile)	GATCCCAACTTTACCGTGGC	CCACAGAACAAAGAGCCCAG

<i>slc11a1</i>	Solute Carrier Family11, Member 1	TGCCCATCCTCACGTTCA	AGAGGTGACGACCTTGTTC
<i>tf</i>	Transferrin	AAGGAAGCTTGCCTCCACAA	AAAAGTTGCCCGAGCAGTCA
<i>tfr1</i>	Transferrin Receptor 1	CCAGTTGGAGTGCTGGAGAC	AGCCTTTAAATGCAGGGACGAA
<i>tfr2</i>	Transferrin Receptor 2	AGAGAGACGAGCGACTGACA	CGACACGTACTGGGAAAGGAA

TABLA 3. LISTA DE CEBADORES DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA VÍA DE RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO

Genes	Nombre	Forward	Reverse
<i>akt1</i>	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogen Homolog 1	TTGTGTCAGCCCTGGACTAC	TCCTTGTCAGCATGAGGTT
<i>axin1</i>	Axin 1	GATGAGGACGATGGCAGAGA	CCTTCGCTGTACCGTCTACT
<i>brca1</i>	Breast Cancer 1	TGAGGACAAAGCAGCGGATA	TCATCCCTGGTTCCTTGAGG
<i>cdkn1 (p21)</i>	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1a	AAAGGCCCGCTCTACATCTT	GAACCTCTCATTCAACCGCC
<i>cox2</i>	Cytochrome C Oxidase Ii	AAGTCCCTGAGCATCTACGG	ACTGCTCATCACCCATTCA
<i>erk1 (mapk3)</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 3	GCTACACGCAGTTGCAGTACA	GTCTTGCGCACGTGGTCATA
<i>erk2 (mapk1)</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	ACAACACCTCAGCAATGACC	CCAGGCCAAAGTCACAGATC
<i>glul</i>	Glutamate-Ammonia Ligase	GTCAAGATTGCGGGGACTAA	CCCATGCTGATTCTTCACA
<i>gpx1</i>	Glutathione Peroxidase 1	TGAAATTCCTCTCCGCCCTT	TCTTGGCGTTCTCTACAGG
<i>gstm1</i>	Glutathione S-Transferase Mu 1	TGCCCATGATACTGGGGTAC	TTCTCATAGCTTGAGTCTGTGTA
<i>gstp1</i>	Glutathione S-Transferase Pi 1	GAAGCCTTTTGAGACCCTGC	CATGGATCAGCAGCAAGTCC
<i>gstt1</i>	Glutathione S-Transferase Theta 1	TGAGGTCATTCTGAAGGCCA	CCTTGTGGACTGCTGAGGAC
<i>hmf4a</i>	Hepatocyte Nuclear Factor 4, Alpha	TGCCTACCTCAAAGCCATCA	GCAGCCGCTTGATCTTCC
<i>hras</i>	Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogen Homolog	GGACGAATACGACCCCACTA	CACGTCTCCCCATCAATGAC
<i>keap1</i>	Kelch-Like ECH-Associated Protein 1	GTGGCGAATGATCACAGCAA	GCATAGATACAGTTGTGCAGGAC
<i>kras</i>	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogen Homolog	GGGAGGGCTTTCTTTGTGTA	ACTAGGACCATAGGTACATCTTCA

<i>map2k7</i> (<i>mek</i>)	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7	AGCTCAAGAAGCGGATGCA	GGTAGTACAGCGCCTTCACA
<i>mapk14</i> (<i>p38a</i>)	Mitogen-Activated Protein Kinase 14	GGCTCCTGAGATCATGCTGAA	ACAGCTCGGCCATTATGCA
<i>mapk8</i> (<i>jnk</i>)	Mitogen-Activated Protein Kinase 8	TCCTCAACACCCGTACATCA	CCCTTTCATCTAACTGCTTGCA
<i>mmp3</i>	Matrix Metallopeptidase 3	ACTAGCAAGGACCTCGTTTTCA	TCCAGCTCGTACCTCATTTC
<i>mos</i>	V-Mos Moloney Murine Sarcoma Viral Oncogen Homolog	CATTGTGCACTTGGACCTGAA	TCTCAGAGCAACCGAAGTCA
<i>myc</i>	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogen Homolog	CCTGGTGCTCCATGAGGA	CCTGCCTCTTTTCCACAGAAA
<i>mycl</i>	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Lung Carcinoma Derived Homolog	CAGGAACTACGCCTCCATCA	CGCTCACAGCTCTCTCCA
<i>mycn</i>	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma Derived Homolog	AGTACCTCCGGAGAGGACAC	GGAACGCCGCTTCTCCA
<i>nox1</i>	Nadph Oxidase 1	CACAACCTCACCTCCACAA	ACAGGTGTGCAATGATGTGAA
<i>nras</i>	Neuroblastoma Ras Viral (V-Ras) Oncogene Homolog	GCGAAGGCTTCTCTGTGTA	TCATCCGAGTCTTTTACTCGCTTAA
<i>nrf2</i>	Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2	CGCAGACATTCCCGTTTGTA	AGCAATGAAGACTGGGCTCT
<i>pdzk1ip1</i>	Pdzk1 Interacting Protein 1	CCTGGTGGAACAGATGGAA	CTCCTCGGGCACATTCTCATA
<i>pgam1</i> (<i>pgm</i>)	Phosphoglycerate Mutase 1	AACCTGCCGACTGGTATTCC	TTGCGCACCGTCTCTTCA
<i>prrt2</i> (<i>pkc</i>)	Proline-Rich Transmembrane Protein 2	CTGCGGCTGCTGCAAAA	ATAGCAGAGACAGCGGCAAA
<i>pten</i>	Phosphatase and Tensin Homolog	CCAGACATGACAGCCATCA	AGTCTTTCTGCAGGAAATCCC
<i>sco2</i>	Sco2 Cytochrome C Oxidase Assembly Protein	AGTGCAGCCTGTCTTCATCA	ACAGTCTTGGGTGGAAGTCC

<i>sirt3</i>	Sirtuin 3	GCTGCATGTGGTTGATTTC	CTCGGTCAAGCTGGCAAAA
<i>sod1</i>	Superoxide dismutase 1		
<i>srxn1</i>	Sulfiredoxin 1	GTACCTGGGAGCATCCACAC	TGTGTCTTCTGGGCTCTTGAA
<i>tgfb1</i>	Transforming Growth Factor. Beta 1	CGTCTGCTGAGGCTCAAGTTA	TCGCCAGGAATTGTTGCTGTA
<i>zfx2 (raf)</i>	Zinc Fingers and Homeoboxes 2	AGCTTTCTCCAGAGCCAGTT	CAAGGGATTGCTGGTGATG

TABLA 4. LISTA DE CEBADORES DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA VÍA DE REPARACIÓN DEL ADN

Genes	Nombre	Forward	Reverse
<i>alkbh2</i>	Alkb Homolog 2, Alpha-Ketoglurate.Dependent Dioxygenase	CCTGGTGAAAGGGGCTCAA	AACACAGCTGGCTCTTCTCC
<i>alkbh3</i>	Alkb Homolog 3, Alpha-Ketoglurate.Dependent Dioxygenase	AGCCACGAGTGATTGACAGA	TTCACGTCAACAAAGCCAGG
<i>apex1</i>	Apex Nuclease (Multifunctional DNA Repair Enzyme) 1	TCTTGAATGTGGATGGGCT	TGGTCTCTGAAGGCACAGT
<i>apex2</i>	Apex Nuclease (Multifunctional DNA Repair Enzyme) 2	ACCTGGAATGCTTTGAAGAGG	GAAGGGCCCTACATGAGAGG
<i>atm</i>	Atm Serine/Threonine Kinase	TGTTAAGGGCCGTGATGACC	CACCACTTCGCTGAGAGAGG
<i>blm</i>	Bloom Syndrome, Rec1 Helicase-Like	CTAGAGGCGATCAATGCTGC	CTCTTACCACCTCCAGTCGG
<i>brca1</i>	Breast Cancer 1		
<i>brca2</i>	Breast Cancer 2	CACCTCTGGAGCGGACTTAT	TGGCCTCTCTTTGGATCCAA
<i>brip1</i>	Brc1 Intercating Protein C-Terminal Helicase 1	TGAGGACAAAGCAGCGGATA	TCATCCCTGGTTCCTTGAGG
<i>chk2</i>	Checkpoint Kinase 2	GAATCCACAGCTCTACCCCA	GAGTTCACAACACAGCAGCA
<i>ccn1</i>	Cyclin E1	CGCAGTATCCCCAGCAAATC	AAGGCAGTCAACATCCAGGA
<i>ercc2 (tfiih/xpd)</i>	Excision Repair Cross-Complementation Group 2	GCCCATACTTCTTGCTCGATA	AATCTTGGGGTCCAGGAGGTA
<i>ercc4 (xpf)</i>	Excision Repair Cross-Complementation Group 4	CTTCTGGAATCTCTGAGAGCAA	GAGGTGCTGGAGTCAAGAAA

<i>ercc5</i> (<i>xpg</i>)	Excision Repair Cross-Complementation Group 5	GGTAGAGTCAAGGAGAGTGGT	TCACGTCAAAAGACATGCCG
<i>exo1</i>	Exonuclease 1	AGACCAAGAAGTGCAGAGCT	TACCAGGTCAGGCACAAACA
<i>kmt2c</i> (<i>ml3</i>)	Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2c	TGTGCCCGTTCTGAACCTAA	TGAGGTGCTGGTGCTGTTTA
<i>lig3</i>	Ligase Iii, Dna, Atp-Dependent	TCCAGGACTTCCTTCGGAAA	CAGCAGCAGCTTCACTGTTA
<i>mgmt</i>	O-6-Methylguanine-Dna Methyltransferase	CGAGGCTATCGAAGAGTTCCC	CACAACCTTCAGCAGCTTCC
<i>mlh1</i>	Mutl Homolog 1	AGAGGACCTACTTCCAGCAA	TCTTCCACCATTCCACATCA
<i>mlh3</i>	Mutl Homolog 3	TGGACAGTCAGTGGCAATGT	AAGCCAATGAACTTCGGAGA
<i>mpg</i>	N-Methylpurine Dna Glycosylase	GCCCATACCGCAGCATCTAT	CCTCGGAGTTCTGTGCCATT
<i>msh2</i>	Muts Homolog 2	GCAGCCTTCATGGATAAGAA	ACTTCTTGGCAAGTCGGTTA
<i>msh3</i>	Muts Homolog 3	TGCCATTGCCTATGCTACAC	GGCGGATAATGGGTGACAAA
<i>msh5</i>	Muts Homolog 5	AAGTGGCCAGTGGACTGAA	CAGCTTCTCTCCCCACTTACA
<i>msh6</i>	Muts Homolog 6	CCTCAGAGCCAGAAGAGGAA	GATCCTTGTGTCTTAGGCTGTAC
<i>mutyh</i>	Muty DNA Glycosylase	GGAGGAATTTACACCCGAG	CTGTTGGCCCTGATACACAC
<i>neil1</i>	Neil-Like Dna Glycosylase 1	TCCTGTACCGGCTGAAGATC	AGGTCTGGATTCTGCAGCTT
<i>neil3</i>	Neil-Like Dna Glycosylase 3	CTGCAGTAAACACAACCGCC	GCTTGCCATGGTTGCAGAAT
<i>nth1</i>	Nth-Like Dna Glycosylase 1	CTGTGTCAGGCATTGCAGTG	GCCCACCAAGAGTCCATTGA
<i>nudt1</i>	UDIX (Nucleoside Diphosphate Linked Moiety X)- Type Motif 1	GTGGAGAGCGACGAAATGC	TGGAAACCAGTAGCTGTCTGT
<i>nudt15</i>	UDIX (Nucleoside Diphosphate Linked Moiety X)- Type Motif 15	GGAAGAGGAAAGGCTCGGTT	TCACAACCTGAGGCAAAGTGA
<i>nudt5</i>	UDIX (Nucleoside Diphosphate Linked Moiety X)-TYPE MOTIF 5	GACCCAGGCTTGTCAAACTG	GAGCATCAAGTCTCTGCAGC
<i>oggl</i>	8-Oxoguanine DNA Glycosylase	TGTTACCCTGGCTCAACTGT	GCGATGTTGTTGTTGGAGGA
<i>cdkn1</i> (<i>p21</i>)	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor	AAAGGCCCGCTCTACATCTT	GAACCTCTCATTCAACCGCC

	1a		
<i>pms1</i>	Pms1 Homolog 1, Mismatch Repair System Component	GGAGAAGCCTTGGGGTCAA	CAGCAGCCGTTCTTGTGTAA
<i>pms2p3</i>	Pms1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component Pseudogene 3	AGGACTATGGAGTGGATCTCA	CTTCAGTTAGGTCGGCAAAC
<i>polb</i>	Polymerase (DNA Directed), Beta	CCCATCCCAGCTTCACTTCA	CCTTTTGTAAGTCTCCACAACC
<i>pold1</i>	Polymerase (DNA Directed), Delta 1, Catalytic Subunit	GCTACGAGAAGGAGGAGGAC	TGAGGTACGGAAGGTGGAAG
<i>ptip (paxipp1)</i>	Pax Interacting (With Transcription-Activation Domain) Protein 1	GGAGAAGCTCGGGAAGTCTT	GGCAGGCAGTGATTCCAAAA
<i>rad50</i>	Rad50 Homolog, Double Strand Break Repair Protein	TACACGATCCCAAGGTTGCT	ACACCATAGATCTTTGCACAGC
<i>rad51</i>	Rad51 Recombinase	GGGGTGGAGGTGAAGGAAAG	CAGGACATCACTGCCAGAGA
<i>rev1</i>	Rev1, Polymerase (Dna Directed)	GGCAGGTCTGCACTTGTGTGA	ACAGCTCTGATGTCTGGGAGAA
<i>rev3l</i>	Rev3-Like, Polymerase (Dna Directed), Zeta, Catalytic Subunit	TGGAACGTCAACAGGAGCAA	TGGGATGTGTGATCAAAGCA
<i>tdg</i>	Thymine Dna Glycosylase	TTGACCTACAGCTTGCCCAA	TTCTCCGTAAGCACCACCAT
<i>tp53</i>	Tumor Protein P53	TTGGCTCTGACTGTACCACC	AAACACGCACCTCAAAGCTG
<i>ung</i>	Uracil Dna Glycosylase	TTGTTTTCTGCTCTGGGGC	TACATGGTGCCGCTTCCTAT
<i>xpc</i>	Xeroderma Pigmentosum, Complementatio n Group C	GGACACGTGGCTGAAGAAAG	TCATTTTCTTCCCGCAGCTG
<i>xrcc1</i>	X-Ray Repair Complementing Defective Repair in Chinese Hamster Cells 1	ATTTCTTCCAGGGCAAGCAC	TCCCATTCCTGTGCTGTGAT

TABLA 5. LISTA DE CEBADORES DE LOS GENES HOMEÓTICOS Y OTROS GENES O RNAS NO-CODIFICANTE QUE CONTROLAN SU EXPRESIÓN

Genes	Nombre	Forward	Reverse
<i>h19</i>	H19, Imprinted Maternally Expressed Transcript (Non-Protein Coding))	TGCTGCACTTTACAACCACTG	ATGGTGTCTTTGATGTTGGGC
<i>hotair</i>	Hox Transcript Antisense Rna	CCTGGCAGAGAAAAGGCTGAA	ACCAGGTCGGTACTGGCTTA
<i>hottip</i>	Hoxa Distal Transcript Antisense Rna	GGGTCCCTCCTCACCAAA	TTCTGAGTCCCTGTGCACTA
<i>hoxa1</i>	Homeobox A1	ATCTTCTCCAGCGCAGACTT	CAGGTAGCCGTACTCTCCAA
<i>hoxa 2</i>	Homeobox A2	GCCAAGAAAACCGCACTTCT	GCCATCGGCGATTCCAG
<i>hoxa 3</i>	Homeobox A3	TTCCAATTCAACCGTACTCT	AGATCTTGATCTGGCGCTCA
<i>hoxa 4</i>	Homeobox A4	TCAATCGATACCTGACCCGG	CCACTTCATCTCCGGTTCT
<i>hoxa 5</i>	Homeobox A5	CAACCCAGATCTACCCCTG	AACGGTTGAAGTGGAACTCC
<i>hoxa 6</i>	Homeobox A6	CGGTTTACCCTTGGATGCAG	TTCTCCAGCTCCAGTGTCTG
<i>hoxa 7</i>	Homeobox A7	TGAGGCCAATTTCCGCATCTA	CGTCTGGTAGCGCGTGTGA
<i>hoxa 9</i>	Homeobox A9	GCCGGCCTTATGGCATTAAA	AGGGACAAAGTGTGAGTGTCA
<i>hoxa 10</i>	Homeobox A10	AGCACACCACAATTCTCCCT	TATTCGGCTTACCCAGTCC
<i>hoxa 11</i>	Homeobox A11	ACTCTCTAAGACTCCAGCG	CCTGTGGGGCTATCTCCATG
<i>hoxa 13</i>	Homeobox A13	TCGGATGCCAGCTCCTATAG	CGCTCAGAGAGATTGTCGT
<i>hoxb1</i>	Homeobox B1	GACCTTCGACTGGATGAAGGTTA	TCAGCTGCCTTGTGGTGAA
<i>hoxb 2</i>	Homeobox B2	GCACGGCTTACACCAACAC	GGCCGGCACAGGTAATTATTA
<i>hoxb 3</i>	Homeobox B3	CTCCCTCTATGGCCTCAACC	GGTGAGAGGAGAGGTCTGTG
<i>hoxb 4</i>	Homeobox B4	CGAGTCAGGGGTCGGAATAA	TGGTCGCTGGGTAGGTAATC
<i>hoxb 5</i>	Homeobox B5	GTATACCCGCTACCAGACCC	CTTCTTCCACTTCATGCGCC
<i>hoxb 6</i>	Homeobox B6	AGAAAAGCATCCCTGAGCCT	CGTTGTCCTTCTCTGGGTCT
<i>hoxb 7</i>	Homeobox B7	ACCGACACTAAAACGTCCCT	TGGAAGCAAACGCACAAGAA
<i>hoxb 8</i>	Homeobox B8	GACAGACCTACAGCCGCTAC	ACTTCATCTCCGGTCTGG
<i>hoxb 9</i>	Homeobox B9	GTGCACCACTTGACAGACTG	ACGGAAGGTGGAGGGATTTT
<i>hoxb 13</i>	Homeobox B13	CCACCAGTCCCTTTTGGA	CAACTGCCCTTGCTGTAC
<i>hoxc4</i>	Homeobox C4	TCCTCTCCCTCCCACTGTTA	AAGCCAGACCATCACACCTT
<i>hoxc5</i>	Homeobox C5	AGATTTACCCGTGGATGACCAA	AGTCTGGTAGCGCGTGTA
<i>hoxc6</i>	Homeobox C6	CCTGGATGCAGGAATGAA	CGCGTTAGGTAGCGATTGAA
<i>hoxc8</i>	Homeobox C8	ATCCTCCGCCAACACTAACA	GTGGGGTCTCATCCATGGAA
<i>hoxc9</i>	Homeobox C9	GACTCGTCATCTCTCACGA	CGGAAAATCGTACAGTCCG
<i>hoxc10</i>	Homeobox C10	CGTTCTTCTTGTCTGCATT	ATGGAGAGGGTTTGGTGGAG
<i>hoxc11</i>	Homeobox C11	CGGCTTCTACTCTCAGTCA	CAGTAGGCGTTGTCGAAGAAA
<i>hoxc12</i>	Homeobox C12	AGCTTGGTATCGCCGTTGAA	TAGGGCTTGCCTTCTTCC
<i>hoxc13</i>	Homeobox C13	CGGCTAGCAAGTTCATCACC	CAGGTGGAGTGGAGATGAGG

<i>hoxd1</i>	Homeobox D1	GCACGTTTCGAGTGGATGAAA	GTCAGTTGCTTGGTGCTGAA
<i>hoxd3</i>	Homeobox D3	AAGAGTCTCGACAGAACTCCAA	GTGTATGCCGTGCGTACC
<i>hoxd4</i>	Homeobox D4	GTGGTCTACCCCTGGATGAA	GGTCCCCACCGGTGTA
<i>hoxd8</i>	Homeobox D8	AAATGTTTCCGTGGATGAGACC	GCGACTGTAGGTTTGTCTTCC
<i>hoxd9</i>	Homeobox D9	GGACGCCTCAAAATGCTTCC	GTCGCCCTCATGGCCTATAA
<i>hoxd10</i>	Homeobox D10	GTCCCGAAGTGCAGGAGAA	AATCCAGCGTTTGGTGCTTA
<i>hoxd11</i>	Homeobox D11	TCACTGACCGGCAAGTCAAA	CTGCAGACGGTCTCTGTTC
<i>hoxd12</i>	Homeobox D12	AAGCGGAAACCTACACGAA	GCGTTTCTGCCTGTGATGAA
<i>hoxd13</i>	Homeobox D13	GGTGTACTGCACCAAGGAC	GCACATGTCCGGCTGATTA
<i>lnRNA-heih</i>	Hepatocellular Carcinoma Up-Regulated Ezh2-Associated Long Non-Coding Rna	CCTCTTGTGCCCTTTCTT	ATGGCTTCTCGCATCCTAT
<i>lnRNA-hulc</i>	Hepatocellular Carcinoma Up-Regulated Long Non-Coding Rna	ATCTGCAAGCCAGGAAGAGTC	CTTGCTTGATGCTTTGGTCTGT
<i>malat1</i>	Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript (Non-Protein Coding)	CTGTTCTGATCCCGCTGCTATTA	TCCAAGCATTGGGGAACACA
<i>meg3</i>	Maternally Expressed 3 (Non-Protein Coding)	CCGACCCAAGTCTTCTTCC	CCTCCCACGTAGGCATCC
<i>prox1</i>	Prospero Homeobox 1	GAGTGCGGCGATCTTCAA	TGATTGGGTGACAATCCTTCC
<i>rps24</i>	Ribosomal Protein S24	CGAATCGTGGTTCTCTTTCTC	TAGTGCGGATAGTTACGGTGTC

6.5. Evaluación de Calidad del cDNA y de los cebodares

6.5.1. Transcripción reversa

Para la síntesis del ADN complementario (cDNA) se realizó la transcripción reversa del ARN total extraído utilizando el kit *Fluidigm Reverse Transcription Master Mix* (Fluidigm). Se utilizaron 200 ng de ARN total proveniente de tres tipos de muestras: tejido tumoral, no-tumoral, no-CHC (tejido calibrador) y células referenciales (e.g. *ALEX* y *FS-H44*), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Brevemente, se utilizaron 5 μ l de volumen final para la reacción por muestra, el mix de la reacción se conformó por 1 μ L del Reverse Transcription Master Mix (Fluidigm), 3 μ L de agua libre de ARNasas (Ambion), y 1 μ L de la muestra de ARN (200 ng). El mix se colocó a 25°C por 5 min, luego a 42°C por 30 min y finalmente a 85°C por 5 min y se mantuvo a 4°C, en un termociclador (Biorad T100), hasta su posterior almacenamiento a -20°C.

6.5.2. Evaluación de la calidad del cDNA por PCR en tiempo real

Para evaluar la calidad del cDNA se realizó un PCR en tiempo real (Real Time-PCR) utilizando cebadores del gen *gapdh* (gen constitutivo). Se consideró que el cDNA se encontraba en buenas condiciones cuando se observó una amplificación (CT) del gen, y un pico único en la curva Melting (T_m).

Se utilizó un volumen final de 10 μ L para cada muestra y se utilizó para la reacción el kit SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad). Los componentes de la reacción son 2 μ L de cADN, 5 μ L de Tp Sso Fast (Biorad), 1 μ L de cebadores a 5 μ M y 2 μ L de agua libre de ARNasas. Las reacciones se colocaron en un

termociclador (Biorad T100) a 95°C por 30 s (1 ciclo), luego por 40 ciclos a 95°C por 5 s y 60°C por 30 s, y finalmente un ciclo de 65 a 95°C por 3 s con un incremento de temperatura de 0.5°C.

Los datos sobre el ciclo umbral (threshold cycle o CT) fueron determinados utilizando las herramientas del equipo. El CT fue definido como el número de ciclo al que la fluorescencia supere el ciclo umbral fijado.

6.5.3. Validación de los cebadores

Se evaluó su funcionamiento y eficiencia en el cDNA de dos líneas celulares, ALEX (tejido tumoral de hígado) y FS-H44 (tejido no tumoral de hígado) utilizando PCR en tiempo real (qPCR). El primer requisito era de que se observara un solo pico en la curva de Tm. Mientras que la segunda condición era, que al realizar una curva estándar con los cDNA antes mencionados, la eficiencia se encontrara entre 90 y 110%. Los cebadores que se descartaron en cada una de las etapas fueron rediseñados hasta obtener los óptimos.

Para evaluar el funcionamiento de los cebadores se realizó un qPCR en estas dos muestras de cDNA de líneas celulares, por duplicado; el mix y el programa utilizado fue el mismo descrito anteriormente.

6.6. PCR en Tiempo Real en micro-fluidos

Este tipo de PCR en tiempo real por micro-fluidos se realizó utilizando la plataforma Biomark de Fluidigm. Se evaluó la expresión de los genes de las cinco vías seleccionadas.

6.6.1. Pre-Amplificación,

Luego de la evaluación de la calidad del cDNA y de la verificación de los cebadores en células referenciales. Se inició con el proceso de preparación para la evaluación de la expresión. Se realizó una pre-amplificación del cDNA de las muestras a evaluar, según lo recomendado por el proveedor (Pre Amp MasterMix Fluidigm). Brevemente, se preparó un mix de todos los cebadores a utilizar por corrida (96 pares/corrida) a una concentración de 100 μ M, de cada mix (sentido y reverso) de cebadores se tomó 1 μ L y se completó a un volumen final de 200 μ L con un buffer de suspensión de ADN (10 mM Tris, pH 8.0 y 0.1 mM EDTA). Se alicuotó 3.75 μ L de este mix para cada una de las muestras a evaluar, y se completó con 1.25 μ L de muestra para obtener un volumen final de 5 μ L. Finalmente, se colocó a 95°C por 2 minutos y 10 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 4 minutos, y se mantuvo a 4°C.

6.6.2. Tratamiento con Exonucleasa I

A cada una de las muestras se le agregó 2 μ L de Exonucleasa I (New England BioLabs) y se incubó a 37°C por 30 min, 80°C por 15 s y se mantuvo a 4°C. Luego se diluyó el producto con 18 μ L de TE Buffer (10mM Tri-HCl, 1.0 mM EDTA) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.6.3. Expresión génica,

Se utilizó el kit EvaGreen (Biorad) y se realizó siguiendo el protocolo *Fast Gene Expression Analysis Using EvaGreen® on BioMark HD System*, según lo sugerido por el proveedor. De los productos obtenidos en la *Pre-amplificación*, se tomaron 3.6 µL, se les agregó 4 µL de SsoFast EvaGreen Supermix (2 X) y 0.4 µL de DNA BindingDye Sample Loading Reagent (20X), a esta mezcla se le denominó “Sample-Mix”. A continuación, se preparó el “Assay-Mix”, donde se mezcló 0.6 µL de cada par de cebador a 100 µM (independientemente) con 2.4 µL de Buffer de suspensión de ADN (1X) y 3 µL de Assay Loading Reagent (2X). Finalmente se cargaron 5 µL de cada Assay-Mix y de cada Sample-Mix en el chip (96.96 Dynamic Array IFC - Fluidigm), y se colocó en el Controlador de Fluido Integrado (IFC-controller) para la distribución de las muestras y ensayos dentro del chip. Luego el chip fue colocado en el equipo Biomark para realizar el ensayo de expresión. El programa utilizado fue el siguiente:

Tabla 6. Programa para evaluación de expresión génica en la plataforma biomark de fluidigm

Segmento	Tipo	T (°C)	Duración (seg)	Ramp Rate (°C/s)
1	Thermal Mix	70	2400	2
		60	30	2
2	Hot Start	95	60	2
3	PCR (30cycles)	96	5	2
		60	20	2
4	Melting Curve	60	3	1
		60-95	-	1°C/3s

Se cargaron 96 muestras y 96 diferentes pares de cebadores por chip (96.96 Dynamic Array Chip for Gene Expression). Se utilizaron un total de 2 chips, utilizando las mismas muestras y un total de 192 diferentes pares de cebadores (genes).

6.7. Análisis estadísticos

Se normalizaron los datos mediante el método $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ utilizando genes constitutivos (*hbms*, *trim44* y *lmf2*) reportados previamente (6), y el tejido calibrador (no-CHC), lo que nos brindará los valores de expresión relativa de los genes evaluados.

Se determinó si los datos tienen una distribución normal, mediante el test de Shapiro-Wilks. La comparación de los niveles de expresión entre tejidos (tumoral y no-tumoral) se realizó utilizando el test T-Student y la comparación entre los grupos de edades (<33 y >33 años) y tejidos (tumoral y no-tumoral) se realizó utilizando un ANOVA y el test Tukey (RStudio). Además, se realizó un análisis multifactorial (FactoMineR – <http://factominer.free.fr/>) para determinar si es que hay otras variables o factores (e.g. infección por el VHB) que puedan explicar las diferencias de los niveles de expresión de los genes. La variable que guarde más correlación con el factor edad será también analizada utilizando el test de ANOVA y Tukey, y sub-agrupando los datos según el factor edad y tipo de tejido. Los genes con diferencial de expresión más fuerte ($p < 0.0001$), sub-agrupados por las diferentes variables, se seleccionaron y se calculó el ratio de expresión (CHC/FNT). Finalmente se realizó un análisis de agrupación (clustering), con el

método de “agrupamiento jerárquico” (FactoMineR), para corroborar la selección previa y evidenciar si es que este diferencial de expresión puede caracterizar las dos poblaciones etarias.

7. RESULTADOS

7.1. Generales

Se evaluaron un total de 92 muestras, 46 tejidos tumorales (CHC), 46 no-tumorales (NT) y cuatro calibradores. Tomando como punto de corte la media de la edad (33 años) del grupo de pacientes evaluados, las muestras se subdividieron en 48 muestras pareadas (24 CHC y 24 NT) de pacientes jóvenes (< 33 años) y 44 muestras pareadas (22 CHC y 22 NT) de pacientes mayores (> 33 años).

Se utilizaron un total de cuatro genes constitutivos (*hbms*, *lmf2*, *rpl41* y *trim44*), pero únicamente tres (*hbms*, *lmf2* y *trim44*) fueron seleccionados por su expresión constante en los dos tipos de tejidos (CHC y NT) (6). Se calculó una expresión relativa, mediante el método $2^{(-\Delta\Delta CT)}$, utilizando la media geométrica de la expresión de los tres genes y la media geométrica de la expresión de los tejidos calibradores. Con estos datos se llevaron a cabo los análisis estadísticos.

Estos datos se evaluaron principalmente según la variable edad, considerado como único factor determinante del diferencial de expresión de los genes evaluados. Durante la encuesta que se le realizó a cada paciente se obtuvo la información de otras variables o factores, i.e. sexo, infección de VHB, datos demográficos, etc. Para determinar si es que alguna de estas variables se encuentra relacionada con la

variable edad se realizó un Análisis de Factor Múltiple (MFA-FactoMineR).

Este tipo de análisis permite saber cómo las variables suplementarias se distribuyen en relación a las variables principales, y cómo estas últimas se correlacionan entre sí. Todas las variables obtenidas en las encuestas se utilizaron en este análisis como “variables principales” y los datos de expresión como “variables suplementarias”. Se observó que la variable más relacionada (más cercana) a la variable Edad era la detección de VHB en tejido por PCR anidado (nPCR.VHB). Mientras que los otros grupos de variables, *Nacimiento* (región nacimiento y ubicación nacimiento), *Residencia* (región residencia y ubicación residencia), *Datos Clínicos* (histología, multinodular, recurrencia, metástasis y muerte), *Sexo*, *Altitud*, *detección de VHB en sangre por AgHBs* (AgHBs.VHB) y *Tumor* (tamaño de tumor, tipo de resección, etc.) se encontraban menos ligados a la *Edad* (nuestra principal variable de interés) (Figura 1). Por esta razón, todos los análisis se llevaron a cabo en base a la variable Edad (< 33 y > 33 años) y la infección por VHB (VHB+ y VHB-).

Al sub-agrupar los pacientes VHB- en base al factor edad, nos encontramos con 7 pacientes < 33 años y 2 > 33 años. Por ser grupos tan reducidos y diferentes no se realizaron los test estadísticos en este grupo. Además, el grupo más pequeño sólo está conformado por 2 pacientes y para que los resultados de los análisis estadísticos sean confiables se requiere un grupo mínimo de 3.

7.2. Expresión de genes que participan en el metabolismo del Arsénico

Un total de nueve genes involucrados en el metabolismo del arsénico (Tabla 1) fueron analizados. Se observó una diferencia significativa en la expresión de la mayoría de los genes entre los tejidos CHC y NT. Los genes *bach1*, *slc2a4*, *mrp1*, *mrp4* y *nrf2* se encontraron sobre-expresados en el tejido CHC, mientras que los genes *aqp7* y *aqp9* estaban sobre-expresados en el tejido NT (Figura 2 y en anexos Figura 1S).

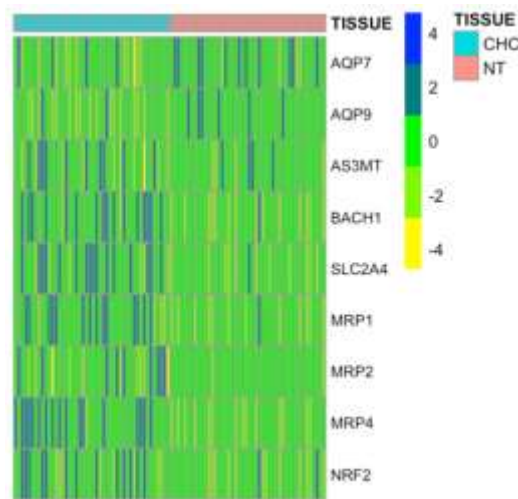


Figura 2. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del arsénico en el tejido CHC y NT. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

Agrupando los datos según la variable edad (< 33 y >33 años), se observó que *aqp9* se encuentra sobre-expresado únicamente en el tejido NT de pacientes < 33 años, mientras que *bach1*, *mrp1* y *mrp4* en el tejido CHC de ambos grupos etarios. Finalmente, *as3mt* se encuentra sobre-expresado en el tejido CHC de pacientes < 33 años, en comparación con su expresión en el tejido CHC de

pacientes > 33 años (Figura 3 y en anexos Figura 2S).

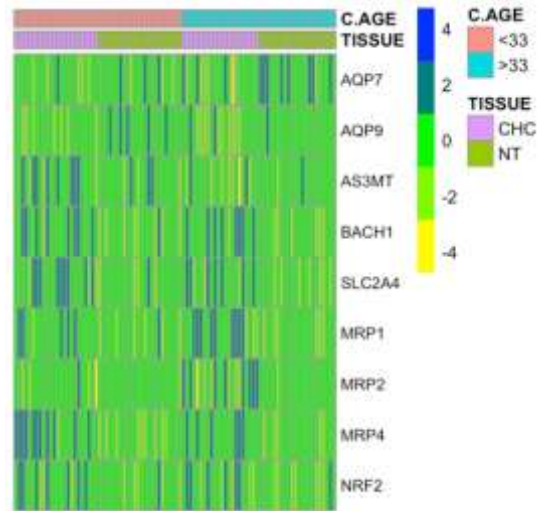


Figura 3. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del arsénico en el tejido CHC y NT sub-agrupados por la Edad. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

Al sub-dividir en base a la variable VHB, se observó que *bach1*, *slc2a4*, *mrp1*, *mrp4* y *nrf2* estaban sobre-expresados en el tejido CHC de pacientes infectados con VHB (VHB+), mientras que en el tejido NT de estos pacientes se observó la sobre-expresión de *aqp9* y *as3mt*. En pacientes no-infectados con el VHB (VHB-), únicamente *mrp4* se encontraba sobre-expresado en el tejido CHC; y en el tejido NT no se encontró ningún gen sobre-expresado (Figura 4 y en anexos Figura 3S).

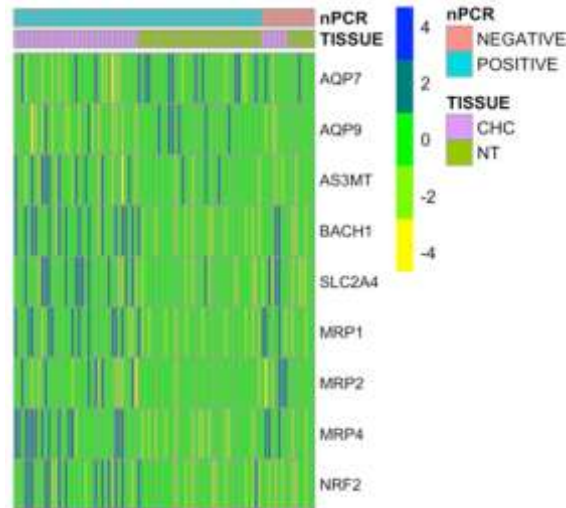


Figura 4. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del arsénico en el tejido CHC y NT sub-agrupados VHB+ y VHB-. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

Además, los genes *bach1*, *mrp1* y *mrp4* se encuentran sobre-expresados en el tejido CHC de pacientes < 33 y > 33 años VHB+, mientras que la expresión de *aqp9* es mayor en el tejido NT < 33 años de pacientes VHB+ (Figura 5 y en anexos Figura 4S).

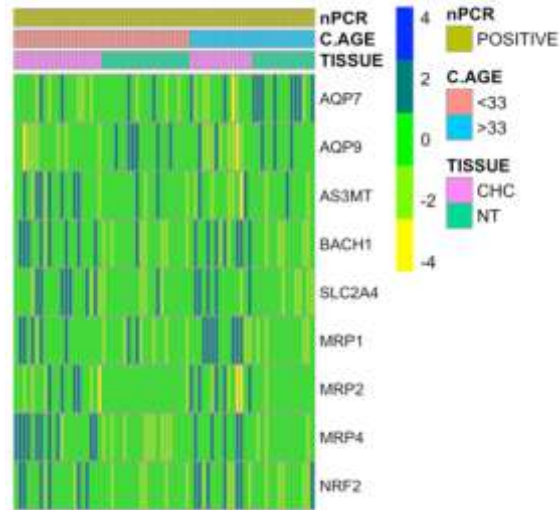


Figura 5. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del arsénico en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

7.3. Expresión de genes que forman parte de la vía metabólica del Hierro

Se evaluaron 14 genes que participan en el metabolismo del hierro (Tabla 2). Se encontraron diferencias significativas al comparar los datos de expresión de en el tejido CHC y NT. En el tejido CHC se encontraron sobre-expresados los genes *bmp1/2*, *dmt1*, *fth1*, *ftl*, *hfe* y *tfr2*; y en el tejido NT los genes *cp*, *tf* y *tfr2* (Figura 6 y en anexos Figura 5S).

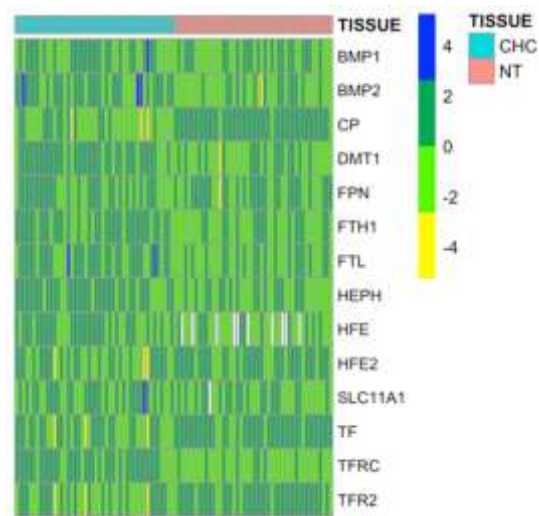


Figura 6. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del hierro en el tejido CHC y NT. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

Al subdividir en base a la edad, los genes *heph* y *hfe* se encuentran sobre-expresados únicamente en el tejido CHC de pacientes < 33 años; mientras que en el tejido NT únicamente *tfr2* se encontraba sobre-expresado de. En el grupo de pacientes > 33 años, los genes *bmp2* y *tf* están sobre-expresados únicamente en el tejido CHC y NT, respectivamente. Además, se ha observado que, en ambos grupos etarios, los genes *dmt1*, *fth1* y *tfr2* se encuentran sobre-expresados en el

tejido CHC; y el gen *cp* se encuentre sobre-expresado en el tejido NT. Cabe resaltar que *bmp2* se encuentra sobre-expresado en el tejido CHC de los pacientes > 33 años en comparación a la expresión encontrada en el tejido CHC de pacientes < 33 años (Figura 7 y en anexos Figura 6S).

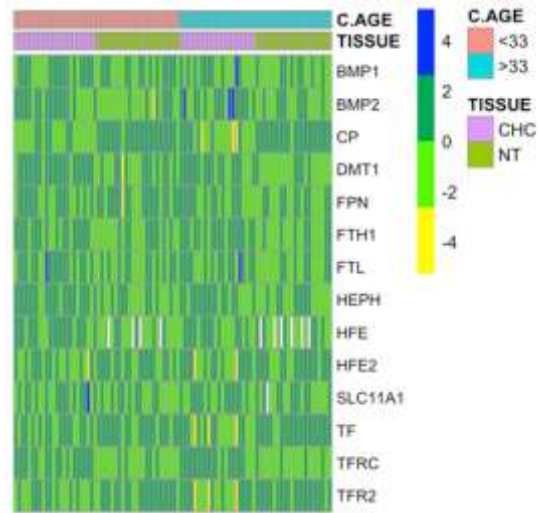


Figura 7. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del hierro en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

En relación a los pacientes VHB+ y VHB-, se encontró que en el tejido CHC de pacientes VHB+ se encontraban sobre-expresados *bmp1/2*, *dmt1*, *fth1*, *ftl*, *heph*, *hfe* y *tfrc*, mientras que en pacientes VHB- se encontró sobre-expresados a *bmp2* y *hfe*. La expresión de los genes *cp*, *tf* y *tfr2* fue mayor en el tejido NT de pacientes VHB+ y en pacientes VHB- no se observó ningún diferencial de expresión (Figura 8 y en anexos Figura 7S).

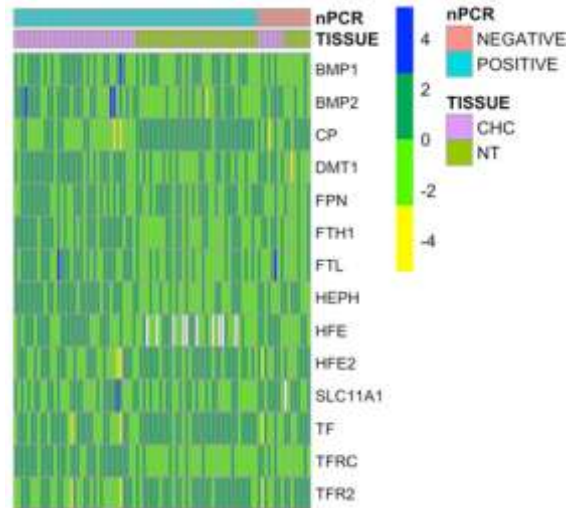


Figura 8. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del hierro en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

En el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ de ambos grupos etarios, se observó la sobre-expresión *dmt1*, *fth1*, *tfr2*; y de *tf* y *cp*; respectivamente. Finalmente, el gen *heph* se encontró sobre-expresado en el tejido CHC, así como *tfr2* en el tejido NT de pacientes < 33 años. En el grupo de pacientes > 33 años VHB+, *bmp2* se encontró sobre-expresado en el tejido CHC (Figura 9 y en anexos Figura 8S).

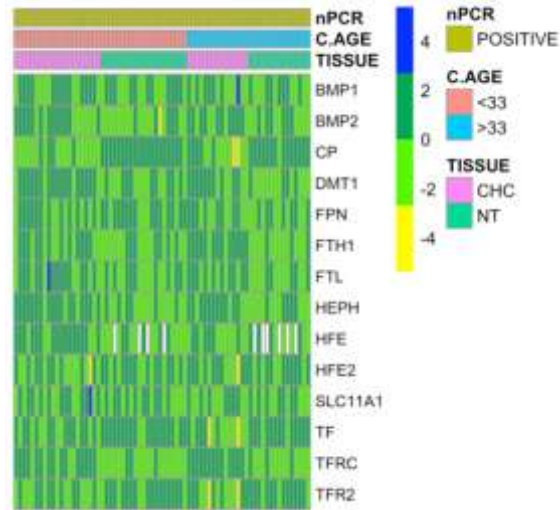


Figura 9. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del hierro en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

7.4. Expresión de genes que forman parte de los mecanismos de respuesta al estrés oxidativo

Un total de 42 genes involucrados en la respuesta y regulación del estrés oxidativo también fueron evaluados (Tabla 1). Estos se agrupan en las vías NRF2, P38, JNK, ERK1/2, TP53 y otros. Estas vías interactúan constantemente, por lo que algunos se encontraran en más de un grupo.

En el tejido CHC se encuentran sobre-expresadas las vías NRF2 (*nrf2*, *keap1* y *brca1*), P38 (*k-ras*, *h-ras*, *n-ras*, *myc* y *mycn*, *mapk14*), JNK (*k-ras*, *h-ras*, *n-ras*, *gstp1*, *mapk8*), ERK1/2 (*k-ras*, *h-ras*, *n-ras*, *erk1/2*, *zhx2*, *pkc*, *map2k7*), TP53 (*mapk14*, *mapk8* y *map2k7*, *tp53*, *sco2*, *pten*, *txn*, *cdkn1*, *pgam1* y *glul*), y otros (*axin1*, *hnf4a*, *tgfb1* y *srxn1*). Mientras que en el tejido NT se encontró únicamente sobre-expresado al gen *sod1*. (Figura 10 y en anexos Figura 9S.1 – 9S.6).

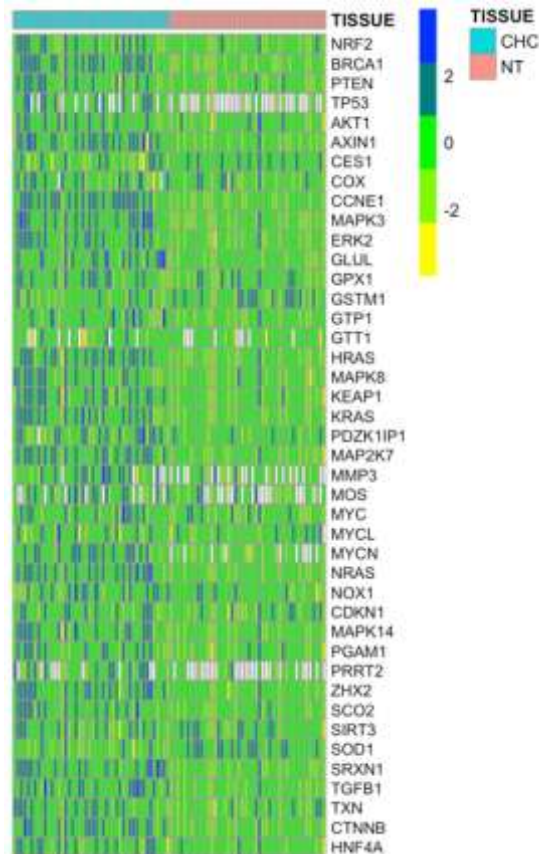


Figura 10. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de respuesta al estrés oxidativo en el tejido CHC y NT. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

Los datos de expresión de los genes fueron también agrupados por la variable edad. Únicamente en el tejido CHC de pacientes < 33 años estaban sobre-expresados los genes *sod1*, *p38α*, *tp53*, *sco2*, *txn*, *myn*, *jnk*, *mek*, *pkc*, *pgam1* y *pten*; mientras que en pacientes > 33 años *nox1*, *glul* y *axin1* se encontraron sobre-expresado. Además, los genes *brca1*, *erk1*, *erk2*, *keap1*, *kras*, *nras*, *hras* y *mek* se encontraron sobre-expresados en el tejido CHC de ambos grupos etarios. La expresión de *brca1* es mayor en el tejido CHC de pacientes < 33 años en

comparación a la expresión que se observa en pacientes > 33 años (Figura 11 y en anexos Figura 10S.1 – 10S.6).

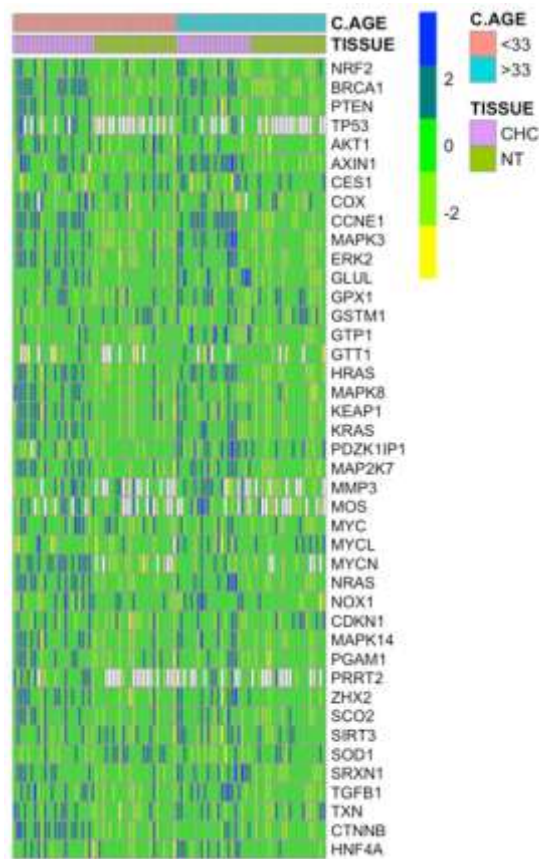


Figura 11. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de respuesta al estrés oxidativo en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

Al agrupar los datos de acuerdo a la infección por VHB, se observó que la vía NRF2 en el tejido CHC de pacientes VHB+ los genes *nrf2*, *keap1* y *brca1* se encontraban sobre-expresados, así como *sod1* en el tejido NT. Únicamente en el tejido CHC de pacientes VHB- se encontró la sobre-expresión del gen *brca1*, y en el tejido NT no se observó ninguna diferencia significativa. En las vías P38, JNK y ERK1/2 se observó que todos los genes evaluados se encontraban sobre-

expresados en el tejido CHC de pacientes VHB+, con excepción de *mycl* (vía P38), el cuál no mostró una diferencia significativa y *h-ras* (vía p38, JNK y ERK1/2), que se encuentra sobre-expresado en el tejido CHC de pacientes VHB-. Finalmente, en la vía p53, los datos de expresión de los genes *cox* y *akt1* no mostraron una diferencia significativa, mientras que el resto de genes evaluados mostraron una sobre-expresión en el tejido CHC de pacientes VHB+. Los genes *axin1*, *hnf4*, *tgfb1*, *gstp* y *srxn1* también se encuentran sobre-expresados en el tejido CHC de pacientes VHB+ (Figura 12 y en anexos Figura 11S.1 – 11S.6).

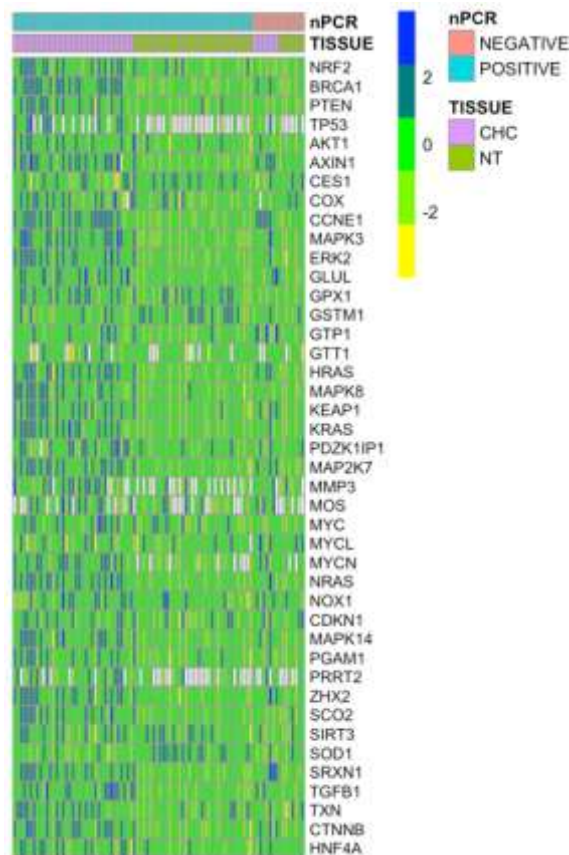


Figura 12. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de respuesta al estrés oxidativo en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

Los genes *p38α*, *tp53*, *mycn*, *jnk*, *txn*, *pgam1*, *pten* se encuentran únicamente sobre-expresados en el tejido CHC de pacientes VHB+ < 33 años; y en los > 33 años, *axin1* y *hnf4a* se encuentran sobre-expresados. Mientras que sólo en el tejido NT de pacientes < 33 años VHB+ el gen *sod1* se encuentra también sobre-expresado. No obstante, en pacientes VHB+ de ambos grupos etarios se observó la sobre-expresión de los genes *keap1*, *brca1*, *kras*, *nras*, *hras*, *erk1*, *erk2*, *zhx2*, *mek*, *sco2*, *glul* y *srxn1* en el tejido CHC (Figura 13 y en anexos Figura 12S.1 – 12S.6).

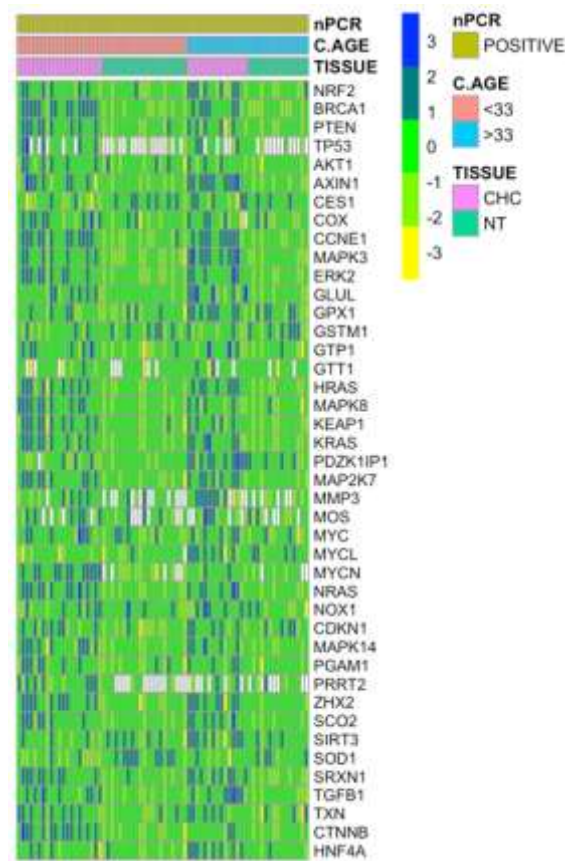


Figura 13. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de respuesta al estrés oxidativo en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-grupados por Edad. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

7.5. Expresión de genes que forman parte de los mecanismos de reparación del ADN

Al comparar la expresión en los tejidos CHC y NT se ha observado que los genes involucrados en los puntos de control del ciclo celular que controlan la detención de la fase G1 y el retraso de la fase S del ciclo celular, se encuentran todos sobre-expresados en el tejido CHC (Figura 14 y en anexos Figura 13S.1). El gen *mgmt*, que interviene en la reparación directa del ADN se encontró también sobre-expresado en el tejido CHC (Figura 14 y en anexos Figura 13S.2).

Se han evaluado también los mecanismos de reparación por escisión de base (BER), escisión de nucleótidos (NER) y reparación por no-emparejamiento (MMR), todos estos pertenecen a los mecanismos de reparación de hebra simple del ADN. Cuando ocurre el daño de una sola hebra, los genes *alkbh2* y *alkbh3* se encuentran expresados participando en la reparación del ADN, en la presente evaluación se observó que únicamente *alkbh2* se encuentra sobre-expresado en el tejido CHC. La expresión de todos los genes en los mecanismos de reparación evaluados (29 genes) era mayor en el tejido CHC en comparación con lo encontrado en el tejido NT (Figura 14 y en anexos Figura 13S.3 – 13S.5), con excepción de NEIL1 (BER), en el que no se encontró una diferencia significativa entre la expresión en el tejido CHC y NT (Figura 14 y en anexos Figura 13S.3). En los genes que participan en la prevención del MMR, se observó que *nudt1*, *nudt5* y *nudt15* se encontraban sobre-expresados en el tejido CHC (Figura 14 y en anexos Figura 13S.5).

En la reparación de la ruptura de doble hebra del ADN, se evaluaron la reparación por recombinación homóloga (HR) y por unión de terminaciones no-homologas (NHJ). En ambas se observó que la expresión de los genes evaluados fue mayor en el tejido CHC (Figura 14 y en anexos Figura 13S.6).

Finalmente, en la reparación por la síntesis trans-lesión del ADN, todos los genes evaluados se observan sobre-expresados en el tejido CHC (Figura 14 y en anexos Figura 13S.7). El ratio de expresión de los genes involucrados en la reparación de ADN en el tejido CHC tiene una media de 3.19, y va desde 0.8 hasta 36.5.

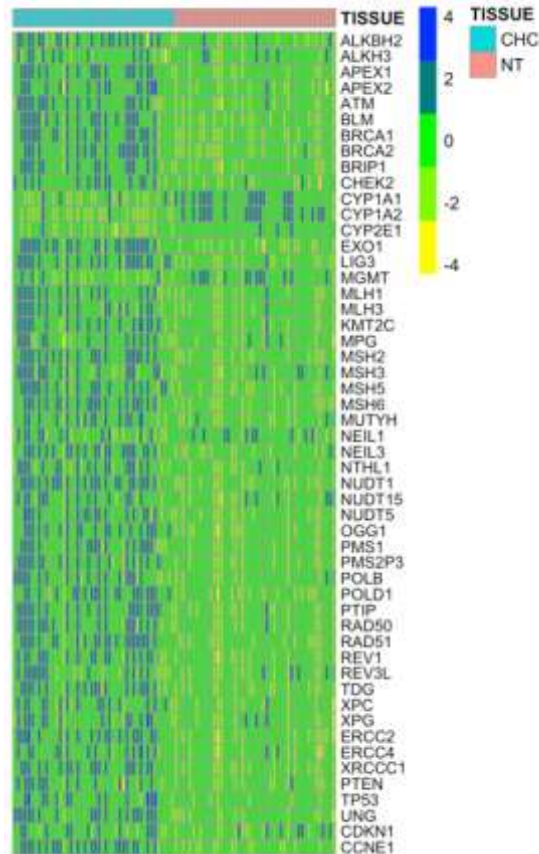


Figura 14. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de reparación del ADN en el tejido CHC y NT. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

Los datos de expresión de los genes involucrados en los mecanismos de reparación del ADN, también fueron agrupados según la edad. En cuanto a la detención de la fase G1 del ciclo celular, se observó que *p53* se encontraba sobre-expresado únicamente en el tejido CHC de pacientes < 33 años. En la evaluación de la expresión de los genes involucrados en el retraso de la fase S del ciclo celular, la expresión del gen *chk2* es mayor únicamente en el tejido CHC de pacientes < 33 años. Además, *atm* y *ccne1*, que participan en ambos puntos de control del ciclo celular, se encontraban sobre-expresados en el tejido CHC de

ambos grupos etarios (Figura 15 y en anexos Figura 14S.1). No se observó una diferencia significativa en la expresión de *mgmt* entre los grupos CHC y FNT de pacientes < 33 y > 33 años (Figura 15 y en anexos Figura 14S.2).

Al agrupar los datos de expresión de los genes *alkbh2* y *alkbh3* de acuerdo a la edad, se observó que el gen *alkbh2* se encuentra sobre-expresado en el tejido CHC de ambos grupos (Figura 15 y en anexos Figura 14S.3). En BER se observó que únicamente en el tejido CHC de los pacientes < 33 años la expresión de *neil3*, *apex1* y *polb* fue mayor; mientras que en el tejido CHC de pacientes > 33 años se encontraron sobre-expresados los genes *nthl1*, *mutyh*, *apex2*. Además, en el tejido CHC de ambos grupos etarios *ogg1*, *ung*, *tdg*, *pold1*, *xrcc1* y *lig3* se encontraron sobre-expresados. Al comparar la expresión entre los tejidos CHC de los pacientes < 33 y > 33 años, se observó que la expresión de *tdg*, *apex1* y *xrcc1*, fue mayor en el tejido CHC de los pacientes < 33 años (Figura 15 y en anexos Figura 14S.3). En NER, se encontró que únicamente *xpg* se encontraba sobre-expresado en el tejido CHC de pacientes < 33 años, y que la expresión de *ercc2*, *ercc4*, *pold1* y *xrcc1*, fue mayor en el tejido CHC de ambos grupos etarios (Figura 15 y en anexos Figura 14S.4). En MMR se observó que únicamente en el tejido CHC de pacientes < 33 años los genes *mlh3*, *pms1*, *nudt5* y *nudt15* se encontraban sobre-expresados, en el tejido CHC de ambos grupos etarios se observó la sobre-expresión de los genes *msh2*, *msh5*, *msh6*, *mlh1*, *pms2p3*, *exo1*, *pold1* y *nudt1* (Figura 15 y en anexos Figura 14S.5).

En los mecanismos de reparación de la ruptura de doble hebra, se observó que *blm* y *rad51* estaban sobre-expresados únicamente en el tejido CHC de pacientes < 33 años, mientras que el resto de genes evaluados se encontraban sobre-expresados en el tejido CHC de ambos grupos.

Finalmente, en el mecanismo de reparación por síntesis trans-lesión, todos los genes se encontraban sobre-expresados únicamente en el tejido CHC de pacientes < 33 años (Figura 15 y en anexos Figura 14S.6 – 14S.7).

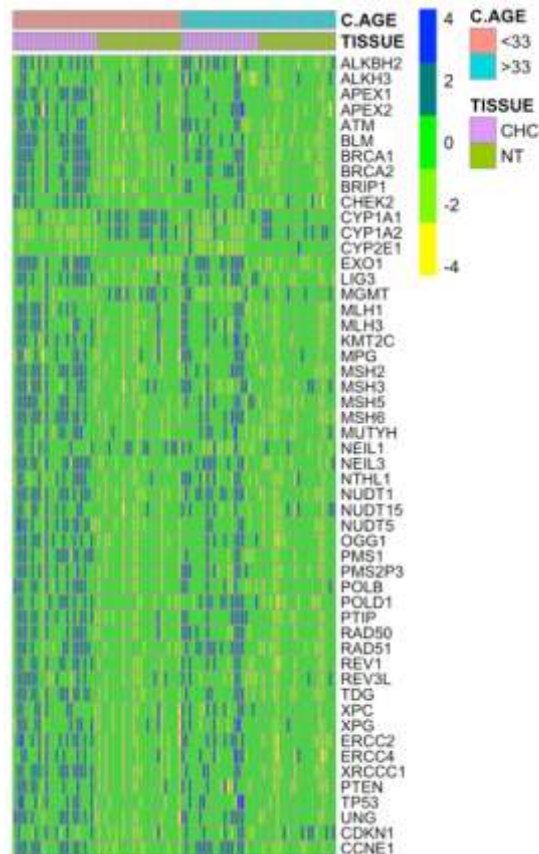


Figura 15. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de reparación del ADN en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

Los genes *atm*, *tp53* y *cdkn1*, son parte de los puntos de control en el ciclo celular y se encuentran sobre-expresados en el tejido CHC de pacientes VHB+. La expresión de los genes *chek2*, *brca1* y *ccne1*, pero la expresión de estos genes es mayor en tejido CHC de ambos grupos (VHB+ y VHB-) (Figura 16 y en anexos Figura 15S.1). En el mecanismo de reparación directa, *mgmt* se encuentra sobre-expresado en el tejido NT de pacientes VHB+ (Figura 16 y en anexos Figura 15S.2). Dentro de los mecanismos de reparación de una sola hebra, la expresión de *alkbh2* es mayor en el tejido CHC de pacientes VHB+. La expresión de los genes *neil3*, *nthl1*, *oggl*, *ung*, *tdg*, *mpg*, *mutyh*, *apex1*, *apex2*, *polb*, *pold1*, *xrcc1* y *lig3* (BER) es mayor en el tejido CHC de pacientes VHB+, mientras que en el tejido CHC de pacientes VHB- los genes sobre-expresados son *oggl*, *tdg*, *apex1*, *pold1*, *xrcc1* y *lig3* (Figura 16 y en anexos Figura 15S.3). De los genes involucrados en NER, se encontraron sobre-expresados *ercc4*, *xpc* y *xpg* en el tejido CHC VHB+, a diferencia de *ercc2*, *pold1* y *xrcc1*, que su expresión es mayor en tejido CHC de ambos grupos (Figura 16 y en anexos Figura 15S.4). El último mecanismo evaluado de reparación de una sola hebra es el de MMR, en donde los genes *msh3*, *mlh1*, *mlh3*, *pms1*, *nudt5* y *nudt15* se encuentran únicamente sobre-expresados en tejido CHC de pacientes VHB+ y los genes *msh2*, *msh5*, *msh6*, *pms2l3*, *exo1*, *pold1*, *nudt1* se encuentran sobre-expresados en el tejido CHC de pacientes VHB+ y VHB- (Figura 16 y en anexos Figura 15S.5).

En cuanto a los mecanismos de reparación de doble hebra, en el tejido CHC de pacientes VHB+ se observó la sobre-expresión de *blm*, *kmt2c*, *brip1*, *rad50*, *rad51*, *brca1*, *brca2* y *ptip*, mientras que en el tejido CHC de pacientes VHB- los

genes con sobre-expresión fueron *blm*, *brip1*, *brca1*, *brca2* y *ptip*. En la reparación por síntesis trans-lesión del ADN, el gen *rev3l* se encuentra sobre-expresado únicamente en tejido CHC de pacientes VHB+, mientras que la expresión de *rev1* está sobre-expresado en el tejido CHC de pacientes VHB+ y VHB- (Figura 16 y en anexos Figura 15S.6 – 15S.7).

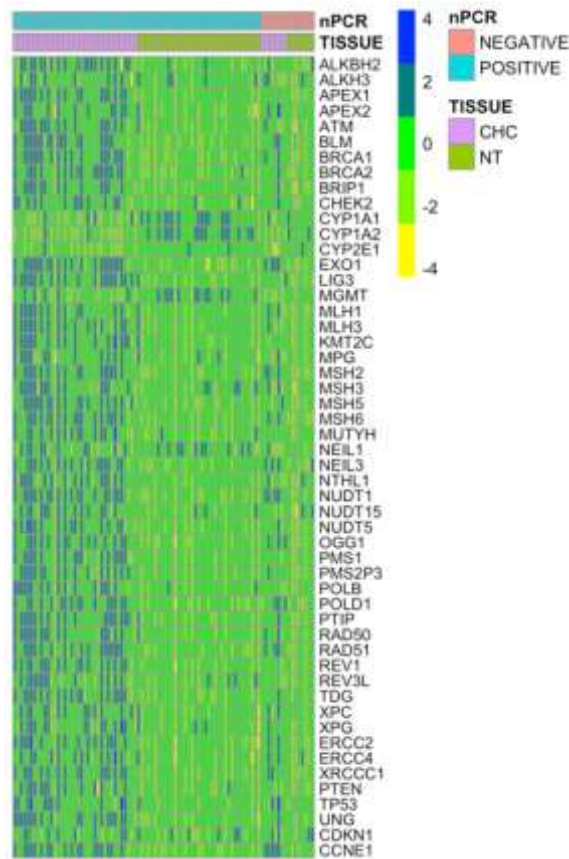


Figura 16. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de reparación del ADN en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

En la evaluación de los datos de expresión de los mecanismos de reparación de ADN de pacientes VHB+ sub-agrupados por edad, se observó que *atm*, *ccne1*, *alkbh2*, *ogg1*, *ung*, *apex2*, *pold1*, *lig3*, *ercc2*, *ercc4*, *msh2*, *msh5*, *msh6*, *mlh1*,

pms2p3, *nudt1*, *kmt2c*, *brip1* y *ptip* se encontraban sobre-expresados en el tejido CHC VHB+ de ambos grupos etarios. Mientras que únicamente en el tejido CHC VHB+ de pacientes < 33 años se encontró la sobre-expresión de *chek2*, *neil3*, *tdg*, *apex1*, *polb*, *xrcc1*, *xpg*, *mlh3*, *pms1*, *exo1*, *nudt5*, *nudt15*, *blm*, *rad50*, *rad51*, *brca2*, *rev1* y *rev3l* era mayor. Además, sólo en el tejido CHC de pacientes > 33 años los genes *nthl1* y *mtuyh* se encontraban sobre-expresados (Figura 17 y en anexos Figura 16S.1 – 16S.7).

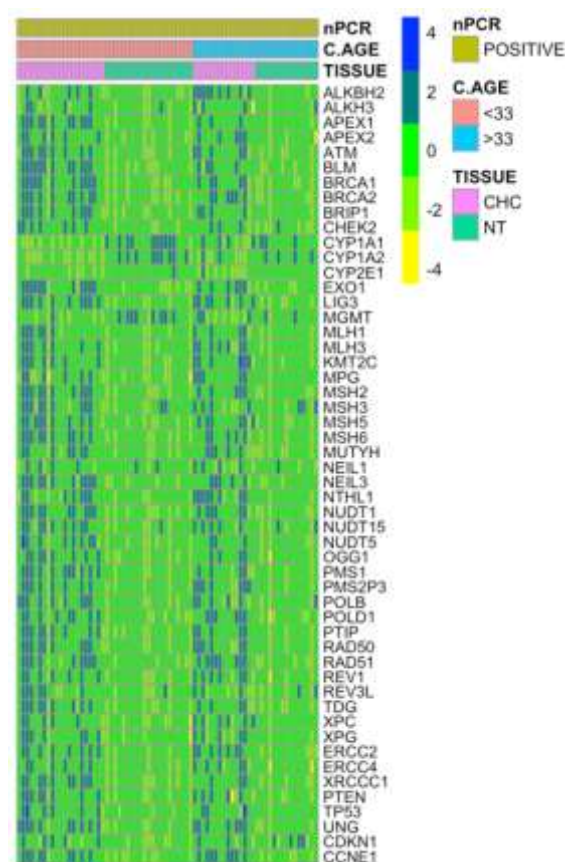


Figura 17. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de reparación del ADN en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

7.6. Expresión de genes homeóticos (*HOX*) y de algunos genes que controlan su expresión

Los 39 genes *HOX* evaluados se pueden agrupar en: *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* y *HOXD*. La mayoría de genes *HOX* evaluados (24) se encontraban sobre-expresados en el tejido CHC, mientras que en los datos de expresión de *hoxa5* y *hoxd12* no se observó una diferencia significativa (Figura 18 y en anexos Figura 17S.1 – 17S.4). Además, no se observó expresión de los genes *hoxa2*, *hoxa7*, *hoxb1*, *hoxb13*, *hoxc5*, *hoxc6*, *hoxc12*, *hoxd1*, *hoxd3*, *hoxd4*, *hoxd8*, *hoxd10* y *hoxd13* en ninguno de los tejidos evaluados (CHC y NT).

Con respecto a los genes o ARNs no-codificante que controlan la expresión de los genes *HOX* (9), se evaluó la expresión de un total de 9 genes, 2 ARN largos no-codificantes (*heih* y *hulc*), 3 ARN que no codifican proteínas (*h19*, *malat1* y *meg3*), 2 ARN anti-sentido (*hotair* y *hottip*) y 2 genes codificantes (*prox1* y *rps24*). No se encontró expresión de los ARN anti-sentido en el tejido CHC y NT. En el tejido CHC se encontraron sobre-expresados *hulc*, *heih*, *malat1*, *meg3*, *rps24*, *prox1*, mientras que en los datos de expresión de *h19* no se observó una diferencia significativa entre el tejido CHC y NT (Figura 18 y en anexos Figura 17S.5).

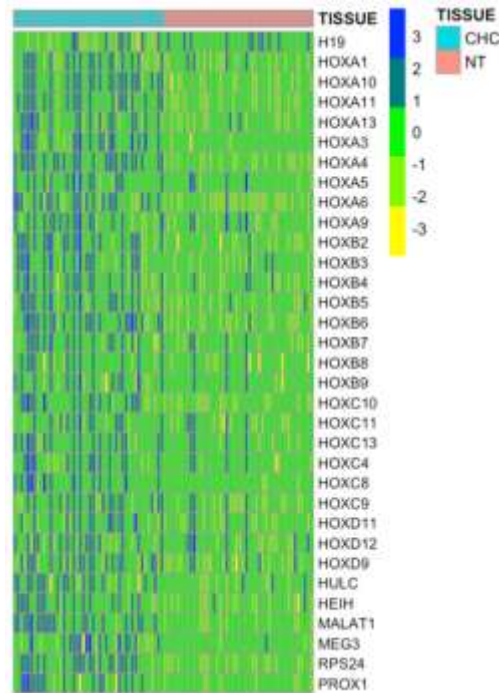


Figura 18. Comparación de la expresión de genes HOX y genes o RNAs no-codificante que controlan su expresión en el tejido CHC y NT. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

Los datos de expresión de los genes *HOX* y de aquellos que controlan su expresión también fue evaluada agrupando la información según la edad. Únicamente en el tejido CHC de pacientes < 33 años se encontraron sobre-expresados los genes *hoxa4*, *hoxa13*, *hoxc4*, *hoxc8*, *hoxc10*, *hoxc13*, *hulc*, *meg3*, *rps24* y *prox1*; mientras que en el tejido CHC de pacientes > 33 años la expresión de los genes *hoxa3*, *hoxa6*, *hoxb3*, *hoxb5*, *hoxb7*, *hoxb9* y *hoxc9* fue mayor. También se observó la sobre-expresión de *hoxa3*, *hoxa10*, *hoxa11*, *hoxb2*, *hoxb6*, *malat1* y *heih* en los tejidos CHC de ambos grupos etarios. Además, al comparar los datos de expresión entre el CHC de pacientes < 33 y > 33 años, se observó que la expresión de *hoxa4*, *hoxb6*, *meg3*, *rps24* y *prox1* era mayor en el tejido CHC de

pacientes < 33 años.

En el grupo *HOXD* no se encontró ninguna diferencia significativa entre los genes evaluados (Figura 19 y en anexos Figura 18S.1 – 18S.5).

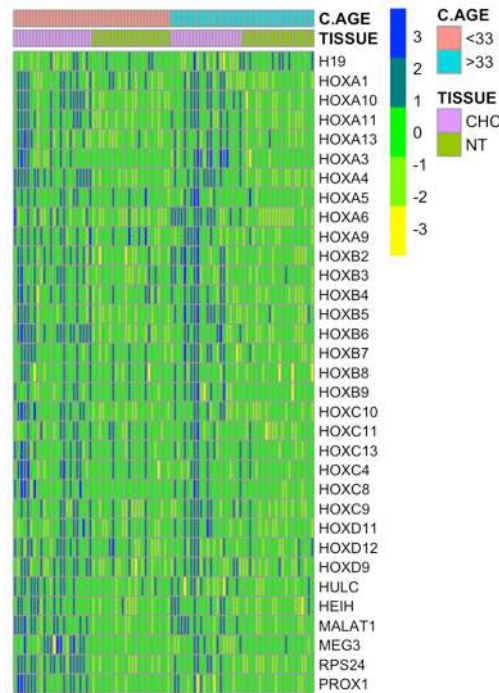


Figura 19. Comparación de la expresión de genes HOX y genes o RNAs no-codificante que controlan su expresión en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

Los genes *hoxa4*, *hoxa11*, *hoxb2*, *hoxb3*, *hoxb4*, *hoxb5*, *hoxb6*, *hoxb7*, *hoxc8*, *hoxc10*, *hoxc13* se encuentran sobre-expresados en el tejido CHC de pacientes VHB+, mientras que la expresión de los genes *hoxa1*, *hoxa3*, *hoxa6*, *hoxa10*, *hoxa13* y *hoxc4* es mayor en el tejido CHC de ambos grupos (VHB+ y VHB-). Además, el gen *hoxc9* se encuentra sobre-expresado únicamente en el tejido CHC de pacientes VHB- y en los datos expresión del grupo *HOXD* no se encontró

diferencia significativa. Dentro de la evaluación de los genes o RNAs que controlan la expresión del grupo *HOX*, la mayoría se encontró sobre-expresado en el tejido CHC de pacientes VHB+, con excepción del gen *h19*, el cuál no presentó una diferencia significativa (Figura 20 y en anexos Figura 19S.1 – 19S.5).

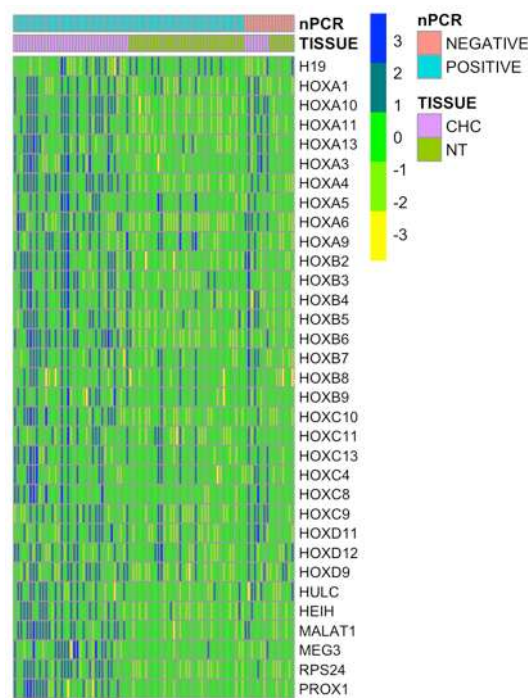


Figura 20. Comparación de la expresión de genes HOX y genes o RNAs no-codificante que controlan su expresión en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

En los genes HOX se observó que en pacientes < 33 años los genes *hoxa11*, *hoxb6*, *hoxc10*, *hoxc13*, *hulc*, *heih*, *meg3* y *prox1* se encuentran sobre-expresados únicamente en el tejido CHC de pacientes VHB+, mientras que sólo en pacientes > 33 años se observan sobre-expresados los genes *hoxa3*, *hoxa6* y *hoxb3*.

Finalmente, en el tejido CHC VHB+ de ambos grupos etarios se encontró la sobre-expresión de *hoxa4*, *hoxa10*, *hoxb2*, *malat1* y *rps24* (Figura 21 y en anexos Figura 20S.1 – 20S.5).

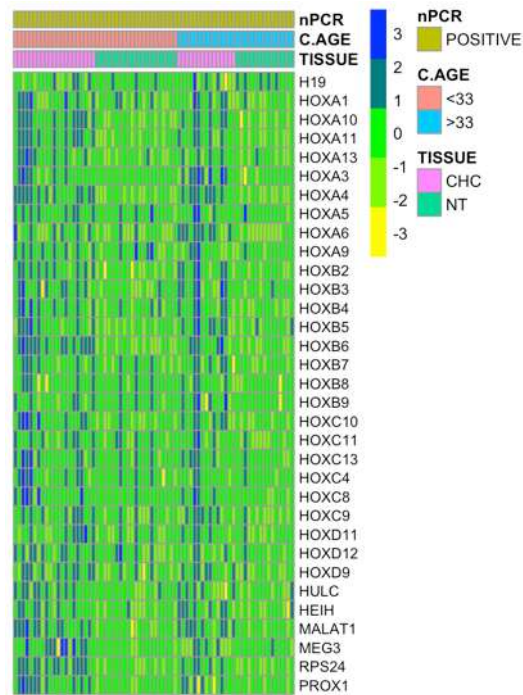


Figura 21. Comparación de la expresión de genes HOX y genes o RNAs no-codificante que controlan su expresión en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Agrupamiento supervisado de los valores de expresión por paciente y por gen.

7.7. Agrupamiento jerárquico

Para corroborar y completar la evaluación de la data se realizó un agrupamiento mediante el método de agrupamiento jerárquico, esta evaluación se llevó a cabo en base al análisis MFA. Este análisis da como resultado un gráfico de inercia, el cual nos permite saber la cantidad de grupos o clústeres sugeridos. Según este gráfico de 1 a 2 grupos se observa una gran inercia, al igual que de 2 a 3 grupos; mientras que si pasamos de 3 a 4 grupos la inercia es mínima, por esta razón se elige 3 como el número máxima de grupos (Figura 22 – superior derecha).

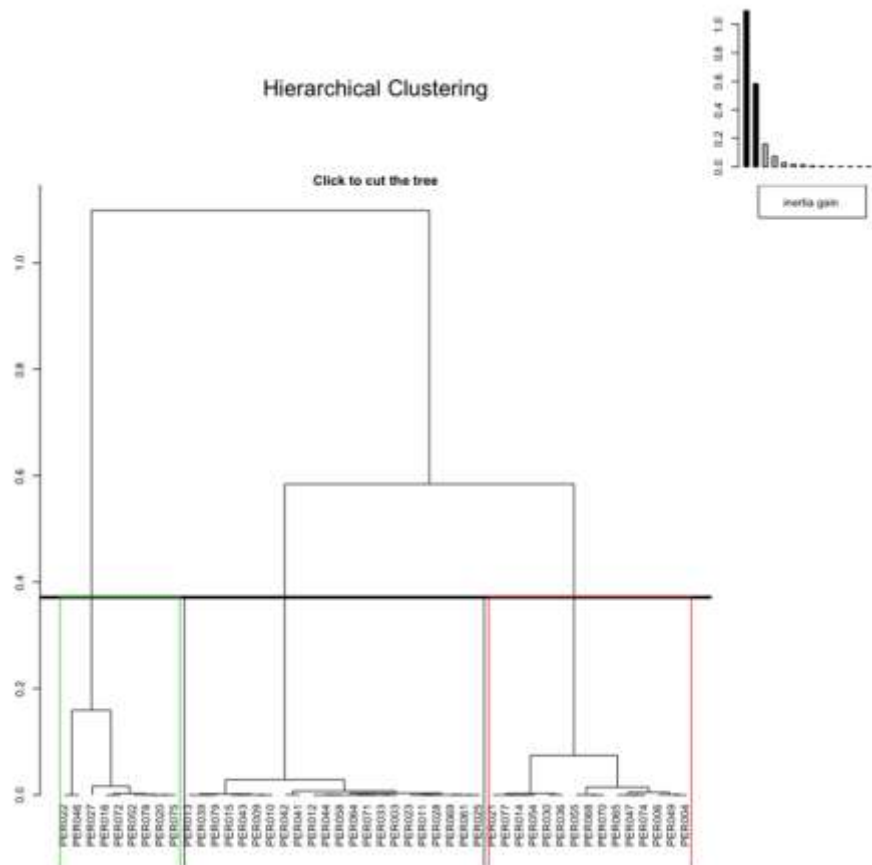


Figura 22. Agrupamiento jerárquico y grafico de inercia. Pacientes agrupados en 3 grupos, Grupo 1 (negro), Grupo 2 (rojo) y Grupo 3 (verde)

El análisis de agrupamiento también nos brinda información de cómo se han conformado los grupos y que individuos se encuentran en estos (Figura 22), así como también un gráfico en el cuál se puede observar la disposición de los tres grupos en el análisis de MFA (Figura 23). Además, se ha determinado que existen variables cualitativas y cuantitativas que caracterizan a cada uno de los grupos.

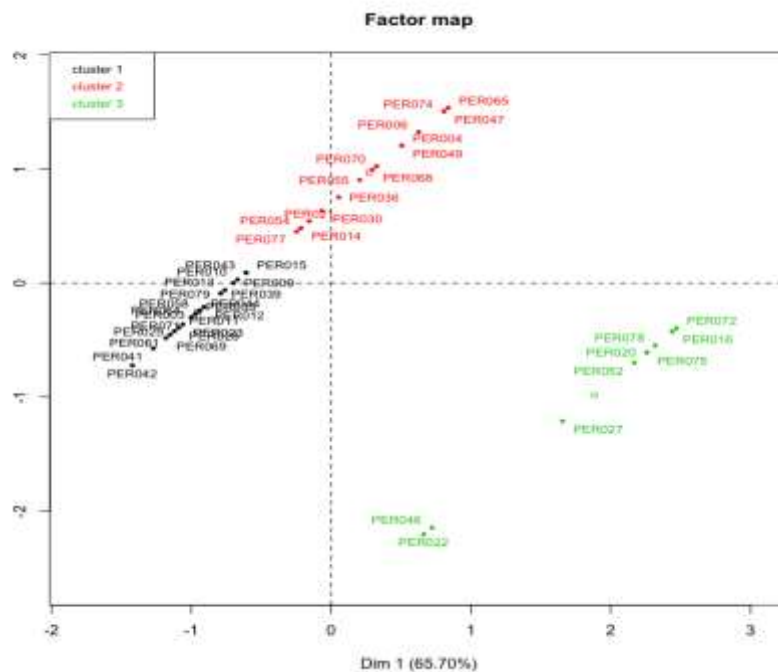


Figura 23. Distribución de pacientes según los grupos conformados por el agrupamiento jerárquico. El grupo 1 tiene una media de 21.45 años y todos los pacientes son VHB+, grupo 2 media de 62.2 años VHB+ y finalmente el grupo 3 media 56.6 años VHB-.

Las variables cualitativas o categóricas nPCR.VHB, muerte y AgHBs, se encuentran ligadas al grupo 1 (clúster 1); así como las variables cuantitativas edad, expresión en tejido CHC de *rps24*, *rev3l*, *PMS1*, *prox1*, *pten*, *tdg*, *meg3*, *xrcc1*, *mapk8 (jnk)*, *apex1*, *hoxb6*, *cox*, *mycl*; y la expresión en tejido NT de

pdzk1ip1 y de *cdkn1* (*p21*). En el grupo 2 (clúster 2) las variables cualitativas ligadas son nPCR.VHB y muerte, mientras que como variables cuantitativas tenemos la expresión de *bmp2*, *pdzk1ip1* y GLUL en el tejido CHC; y de *aqp7* en el tejido NT. Finalmente, las variables nPCR.VHB y AgHBs se encuentran vinculadas al grupo 3 (clúster 3); al igual que el TAMAÑO-TUMOR; la expresión de *gstp1*, *mycl*, *srxn1*, *pten*, *atm* y *nrf2* en el tejido CHC; y la expresión de los genes *hoxa3*, *cox*, *slc11a1*, *aqp9* y *mgmt* en el tejido NT (Tabla 5S y 6S).

Finalmente, lo importante a recalcar es que en este agrupamiento se observó que dentro del grupo 1 se encontraban, mayoritariamente, los pacientes < 33 años VHB+ (media = 21.45 años), en el grupo 2 los pacientes > 33 años (media = 62.2 años) VHB+ y en el grupo 3 todos los pacientes VHB- (media = 56.6 años)

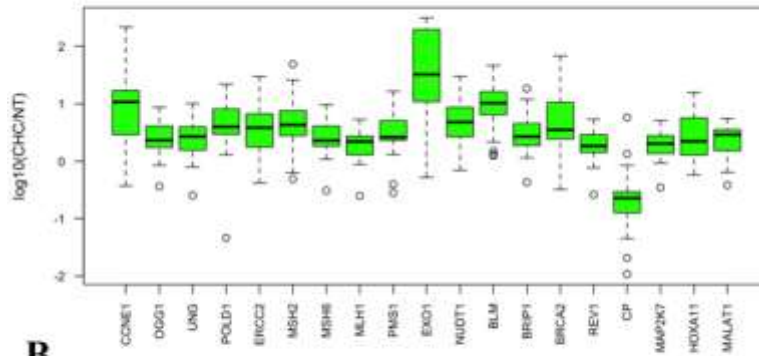
7.8. Selección de genes específicos para cada grupo

La selección de los genes más representativos de las diferentes vías, se hizo en base a un $p < 0.0001$ al comparar el tipo de tejido, el tipo de tejido sub-agrupado por la Edad y finalmente la comparación del tipo de tejido en base a la variable infección VHB + Edad. Finalmente, se compararon los sets de genes agrupados según la Edad y según VHB + Edad, y se seleccionaron solo aquellos que eran únicos para cada caso (Tabla 1S -4S).

De la lista de genes característicos para pacientes < 33 años se descartaron *tdg*, *apex1*, *xrcc1*, *mapk8*, *hoxb6* y *rps24*; así como *srxn1* se retiró de la lista de genes únicos para pacientes > 33 años infectados con VHB se retiró. Los genes en común que se encontraron en cada lista se descartaron ya que no están ligados únicamente al factor edad y/o a la infección por VHB.

Los genes representativos de la población con CHC < 33 años son *cp*, *ogg1*, *ung*, *pold1*, *ccne1*, *blm*, *brip1*, *brca2*, *msh2*, *msh6*, *mlh1*, *pms1*, *exo1*, *nudt1*, *ercc2*, *rev1*, *map2k7*, *hoxa11* y *malat1*; y de la población con CHC VHB+ < 33 años son *ptip* y *hras*. Mientras que para los pacientes > 33 años tenemos *mapk3* y *axin1* y en los > 33 año VHB + solo *srxn1*. Finalmente, se determinó el ratio de expresión, para los genes únicos en pacientes con CHC < 33 y > 33 años (Figura 24) y de pacientes con CHC VHB+ < 33 y > 33 años (Figura 25).

A Ratio de expresión de genes expresados diferencialmente en pacientes < 33 años



B

Ratio de expresión de genes expresados diferencialmente en pacientes > 33 años

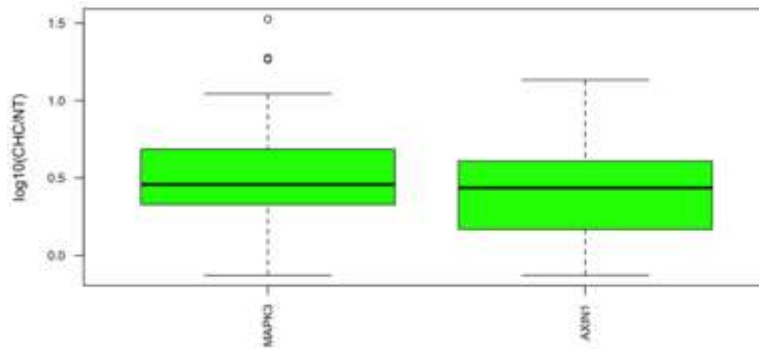
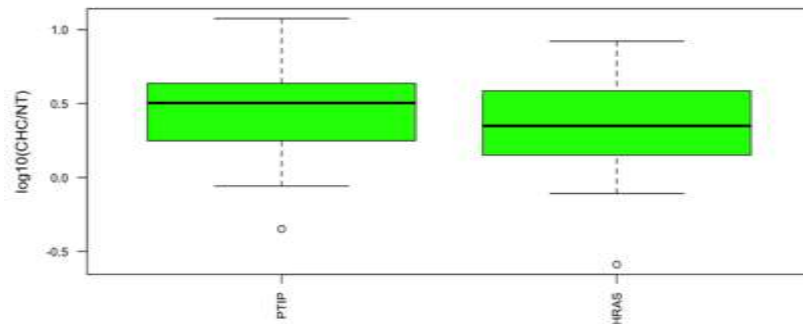


Figura 24. Ratio de expresión de genes específicos para A) jóvenes (< 33 años) y B) mayores (> 33 años). El ratio de expresión fue calculado dividiendo los valores de expresión del tejido tumoral (CHC) entre el tejido no-tumoral (NT). En la figura se grafica el log10 del ratio.

A Ratio de expresión de genes expresados diferencialmente en pacientes < 33 años VHB+



B

Ratio de expresión de genes expresados diferencialmente en pacientes > 33 años VHB+

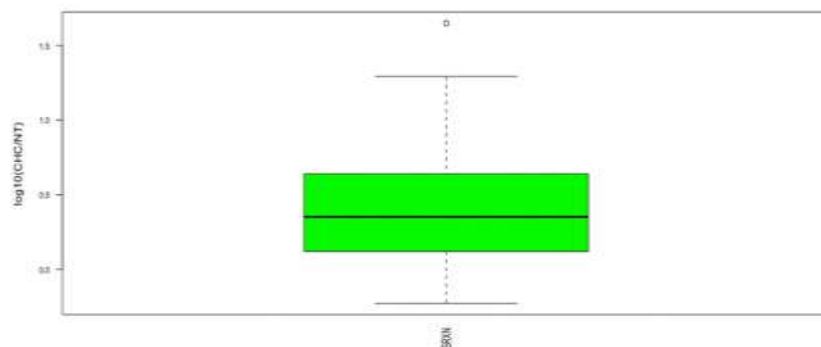


Figura 25. Ratio de expresión de genes específicos para A) jóvenes VHB+ (< 33 años) y B) mayores VHB+ (> 33 años). El ratio de expresión fue calculado dividiendo los valores de expresión del tejido tumoral (CHC) entre el tejido no-tumoral (NT). En la figura se grafica el log₁₀ del ratio.

8. DISCUSIÓN

La evaluación de la expresión de genes de las vías de metabolismo del arsénico, hierro, respuesta al estrés oxidativo, reparación del ADN y genes HOXA-D en pacientes con CHC, ha permitido observar que solo el nivel de expresión de algunos genes se encontraba ligado directamente al factor edad. Esta evaluación también nos ha permitido encontrar la existencia de una variable diferente a la edad, que estaría ejerciendo influencia en el perfil de expresión observado, la infección por el VHB.

Un total de 20 genes diferencialmente expresados, con un $p < 0.0001$, ligados únicamente a paciente < 33 fueron encontrados; mientras que para pacientes > 33 años sólo dos. Para el grupo de pacientes < 33 años y >33 años infectados con el VHB, se encontraron dos y un gen, respectivamente. La discusión se centrará en los genes ligados únicamente a los pacientes < 33 años, por ser la población de interés en este estudio y además tener la lista más representativa en contraste a los otros grupos.

De los 20 genes que se encuentran en la lista de pacientes con CHC < 33 años, la vía más representada es el de reparación de ADN (16 genes), mientras que los restantes 4 se subdividen en metabolismo del hierro (1 gen), estrés oxidativo (1 gen) y genes HOX (2 genes); y el ratio de expresión de estos genes de reparación en promedio va de 1 a 100.

Los genes que se encuentran en la vía de reparación del ADN pueden ser agrupados de acuerdo al mecanismo de reparación del cual forman parte, así tenemos que los mecanismos representados por esta lista son los puntos de control en el ciclo celular (1 gen: *ccne1*), reparación por escisión de bases (3 genes: *ogg1*, *ung* y *pold1*), por escisión de nucleótidos (2 genes: *pold1* y *ercc2*), por el no-emparejamiento (6 genes: *msh2*, *msh6*, *mlh1*, *pms1*, *exo1* y *nudt1*), de ruptura de doble hebra (3 genes: *blm*, *brip1* y *brca2*) y por trans-lesión (1 gen: *rev1*).

Se ha reportado que la infección del VHB inhibe los mecanismos de reparación de ruptura de doble hebra e induce la apoptosis en hepatocitos, facilitando de esta manera el proceso de hepatocarcino-génesis (53). Como podemos observar en los resultados obtenidos, únicamente tres genes de 6 evaluados (*blm*, *brip1* y *brca2*) que forman parte de esta vía de reparación se encuentran diferencialmente expresados en el tejido tumoral (CHC) de pacientes < 33 años. Teniendo en cuenta que el 90% de estos pacientes se encuentran infectados por el VHB y que si bien esta lista corresponde a los pacientes con CHC < 33 años, no podemos descartar que la falta de una diferencia significativa en el nivel de expresión de los otros tres genes pueda ser el resultado de la infección por el VHB. *blm* no depende de la cascada de señalización que dirige todo el proceso de reparación de doble hebra (54,55), se activa como respuesta directa al daño del ADN, por lo que su expresión no sería inhibida en el tejido tumoral, y más bien sería un marcador de que el daño del ADN en las células cancerígenas (CHC) es inminente.

Además, *blm*, *brip1* y *brca2* están ligados a otros procesos celulares. Los genes *blm* y *brip1* participan en la regulación de la expresión, *blm* mediante la fosforilación de proteínas con actividad serina/treonina quinasa (56) y *brip1* mediante la fosforilación de la proteína TP53 (57–62). *brca2* se encuentra involucrado en procesos de regulación epigenética, específicamente en la acetilación de histonas (H3 y H4) (63). Entonces se podría decir que la sobre-expresión de estos genes en el tejido CHC de pacientes < 33 años podría no ser necesariamente un efecto único de la infección del VHB, sino más bien un resultante de la transformación tumoral de los hepatocitos, pues se sabe que los procesos de control proteómico, genético y epigenético se encuentran alterados en células cancerígenas.

Como resultante de la cascada de señalización de los puntos de control del ciclo celular se inhibe la expresión del gen *ccne1*, lo que permite la detención de la fase G1 y el retraso de la fase S para la reparación del ADN o para el inicio del proceso de apoptosis. En el caso de la detención de la fase G1, *atm* promueve la defosforilación de *p53* (activación) y este a su vez activa a *p21*, quien inhibe la expresión de *ccne1*, y lo que resulta en la detención de la fase G. El retraso de la fase S es resultado de la activación de *atm* por el daño al ADN, el cuál activa *chek2* y este indirectamente inhibe la expresión de *ccne1* (55,64). En este trabajo se ha encontrado que *ccne1* se encuentra sobre-expresado en pacientes < 33 años con CHC, dando indicios de que este sistema de control de daño del ADN no estaría activo en este tejido, lo que le brinda a la célula cancerígena un mecanismo

de evasión de la apoptosis. Además, la expresión *ccne1* también se encuentra ligado a procesos de control proteómico (fosforilación) (65).

Los mecanismos más representativos en esta lista son los de reparación de hebra simple, los cuales son reparación por escisión de bases (*oggl*, *ung* y *pold1*), reparación por escisión de nucleótidos (*pold1* y *ercc2*) y reparación del no emparejamiento del ADN (*msh2*, *msh6*, *mlh1*, *pms1*, *exo1* y *nudt1*) (54,55) . Se ha reportado que la infección del VHB puede modular los mecanismos de reparación de hebra simple, utilizando esta maquinaria para poder replicarse y continuar infectando otros hepatocitos (66). A pesar de que la sobre-expresión de estos genes ha sido observada únicamente en el tejido CHC de pacientes < 33 años, como se ha mencionado anteriormente, no se puede descartar que esto sea un resultante de la infección del VHB; ya que el 90% de estos pacientes están infectados por este virus. Según la base de datos de vías celulares conocida como Reactome (<http://www.reactome.org/>), hasta el momento no se ha reportado que *oggl*, *ung*, *pold1*, *ercc2*, *msh2*, *msh6*, *mlh1*, *pms1*, *exo1* y *nudt1* participen en procesos diferentes que el de la reparación del ADN.

A pesar de que no es uno de los grupos más representativos, en el metabolismo del hierro el único gen que se ha encontrado sobre-expresado en el tejido CHC de pacientes < 33 años, *cp*, uno de los genes más importantes en este metabolismo. La *cp* es un gen que expresa una proteína que tiene actividad ferroxidasa y que participa en la peroxidación del hierro⁺² acoplado a su transportador (transferrina) a hierro⁺³. La peroxidación del hierro es un paso importante previo al

almacenamiento de este metal en los hepatocitos (67). Estos hallazgos se correlacionan con lo encontrado por nuestro grupo, altas concentraciones de hierro en el tejido de pacientes con CHC < 33 años (datos aun no reportados). Además, se ha reportado que en personas infectadas con el virus de hepatitis C, los hepatocitos captan y almacenan una mayor cantidad de hierro (68); brindando indicios de la posible participación activa del VHB en este proceso.

Según Andrews *et al* (2007) el equilibrio entre los niveles de expresión de los genes que participan en la captación, almacenamiento y movilización del hierro, es muy importante para mantener una adecuada homeostasis (69). El estado del hierro en el organismo está regulado por su absorción y almacenamiento, ya que hasta el momento no se conoce un mecanismo de excreción de hierro. Sin embargo, la ruptura de este proceso de homeostasis, genera el incremento de hierro en el citoplasma celular y se ha asociado con algunas enfermedades (i.e. hemocromatosis hereditaria, CHC y Parkinson) (45). Cuando se encuentran altas concentraciones de hierro en el organismo, los hepatocitos disminuyen la captación de hierro, incrementen la producción de ferritina (encargada del almacenamiento) y disminuyen la liberación de hierro, mientras que cuando se observa una deficiencia de hierro en los hepatocitos ocurre todo lo contrario (45,69).

Se ha descrito en humanos que la acumulación de hierro en el hígado genera hemocromatosis, lo que desencadena un proceso cirrótico, que culmina en el desarrollo de CHC (68). Pero hasta el momento únicamente en modelos animales

se ha demostrado que el desarrollo de CHC por alto contenido de hierro no siempre está ligado a la hemocromatosis, sino que también puede desencadenarse directamente por el alto contenido de hierro en el citoplasma de los hepatocitos (70). Este estudio fue realizado en ratas, y demostraron que luego de 20 meses de altas ingestas de hierro, se observan alteraciones hepáticas focalizadas. A los 28 meses estas alteraciones focalizadas aumentaron considerablemente y el foco había cambiado de características, convirtiéndose de indistinguibles a nódulos pre-neoplásicos. Finalmente estos nódulos se convirtieron en nódulos neoplásicos con un patrón expansivo (71).

A pesar de que muchos de los genes seleccionados por su expresión diferencial ($p < 0.0001$) únicamente en pacientes < 33 años parece ser que esta sobre-expresión es resultante de la infección del VHB. En la lista de genes con diferencial de expresión únicamente en pacientes < 33 años infectados con el VHB, solo se encontraron dos genes, *hras* y *ptip*. El gen *ptip* juega un rol crítico en el mantenimiento de la estabilidad del genoma y la condensación de la cromatina durante la mitosis (72), mientras que *hras* está involucrado principalmente en vías de transducción. Los defectos en el gen *hras* han sido ligados a numerosos cánceres, e.g. cáncer de vejiga, cáncer de tiroides, etc. Cabe resaltar, que no se ha podido realizar un análisis completo del grupo de pacientes VHB-, por el bajo número de individuos presentes en este grupo. Finalmente, con excepción de los genes que participan en la reparación de hebra simple del ADN, la mayoría se encuentra formando parte de procesos de regulación genética y epigenética.

9. CONCLUSIONES

El grupo de genes específicamente sobre-expresados en pacientes < 33 años podría ser utilizada como marcadores que permita diferenciar a esta población (< 33 años) con características clínico-patológicas específicas (VHB, tumores grandes, etc.). Se ha encontrado que adicionalmente a la edad, la infección por VHB estaría influenciando el perfil de expresión encontrado.

Este trabajo nos brinda nuevos indicios sobre la posible importancia de los mecanismos de reparación del ADN en el desarrollo del CHC en pacientes peruanos < 33.

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar nuevamente la expresión de los genes seleccionados, utilizando un nuevo set de pacientes. Para el nuevo grupo de pacientes se debe tomar en consideración equilibrar mejor los grupos etarios (< 33 y > 33 años) y de pacientes infectados con el VHB (VHB+/-).

Se deben realizar mayores estudios para entender la relación entre los mecanismos de reparación del ADN y la infección con el VHB, y como esta relación puede influenciar en el desarrollo del CHC en esta población (< 33 años). Además, también se recomienda hacer una evaluación a nivel epigenético para ver si los mecanismos de control de la expresión de los genes en los diferentes grupos (etario y VHB+/-) se ven afectados, ya que podría encontrarse a este nivel la regulación de los diferenciales de expresión observados.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2014;136(5):E359-86.
2. Bertani S, Pineau P, Loli S, Moura J, Zimic M, Deharo E, et al. An Atypical Age-Specific Pattern of Hepatocellular Carcinoma in Peru: A Threat for Andean Populations. *PLoS One*. 2013;8(6).
3. Hamilton SR, Aaltonen L a. Tumours of the Liver and Intrahepatic Bile Ducts. *Pathol Genet Tumours Dig Syst*. 2000;158–202.
4. Schuppan D, Afdhal N. Liver Cirrhosis. *Lancet*. 2008;8(371(9615)):838–51.
5. Ruiz E. Tratamiento Quirurgico del Hepatocarcinoma. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 1998. p. Volumen 18, Suplemento N°1.
6. Marchio A, Bertani S, Rojas Rojas T, Doimi F, Terris B, Deharo E, et al. A Peculiar Mutation Spectrum Emerging from Young Peruvian Patients with Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2014;9:e114912.
7. Cabezas C. Hepatitis viral B y delta en el Perú: Epidemiología y bases para su control. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2007;24(4):378–97.
8. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2002;31(4):339–46.
9. Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans.

- Cell. 2004;119(5):591–602.
10. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad I Ben, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2012;44(6):694–8.
 11. Tanase A-M, Marchio A, Dumitrascu T, Dima S, Herlea V, Oprisan G, et al. Mutation spectrum of hepatocellular carcinoma from eastern-European patients betrays the impact of a complex exposome. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2014;1–8.
 12. What Is Cancer? - National Cancer Institute. Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
 13. Somers E. International Agency for Research on Cancer. *C Can Med Assoc J.* 2003;133(9):845–6.
 14. United Nations. World Population Prospects The 2000 Revision Highlights. *Popul (English Ed.* 2001:1–22.
 15. Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori. IARC Monogr Evaluation of carcinogenics. 1994;61.
 16. Human Papillomaviruses. IARC Monogr Evaluation of carcinogenics. 1995;64.
 17. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J cancer.* 1999;80(6):827–41.
 18. Ruiz E, Sanchez J, Celis J, Payet E, Berrospi F, Chavez I, et al. Resultados a corto y largo plazo de la Resección Hepática por Hepatocarcinoma.

- Análisis de 232 Resecciones Consecutivas. *Rev Gastroenterol Perú*. 2007;27:223–35.
19. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2011;365(12):1118–27.
 20. Bender E. Developing world: Global warning. *Nature*. 2014; 509(7502):S64-5.
 21. Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;29(8):449–58.
 22. Von Meltzer M, Vásquez S, Sun J, Wendt UC, May A, Gerlich WH, et al. A new clade of hepatitis B virus subgenotype F1 from Peru with unusual properties. *Virus Genes*. 2008;37:225–30.
 23. Van Thiel DH, Ramadori G. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Cancer*. 2011;42:191–4.
 24. Gillespie JR, Uversky VN. Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overview. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1480(1–2):41–56.
 25. Di Bisceglie AM. Issues in screening and surveillance for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S104-7.
 26. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005;42(5):1208–36.
 27. Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J. Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. *Semin Liver Dis*. 2010;30(1):61–74.
 28. Mondragón-Sánchez R, Garduño-López AL, Hernández-Castillo E,

- Gómez-Gómez E, Ruiz-Molina JM. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in Mexico. *Hepatogastroenterology*. 2005;52(64):1159–62.
29. Leão-Filho GC, Lopes EPA, Ferraz AAB, Moura I, Pernambuco JR, Reis C, et al. Hepatitis G virus infection in patients with hepatocellular carcinoma in Recife, Brazil. *Jpn J Clin Oncol*. 2007;37(8):632–6.
30. Roman S, Panduro A, Aguilar-Gutierrez Y, Maldonado M, Vazquez-Vandyck M, Martinez-Lopez E, et al. A low steady HBsAg seroprevalence is associated with a low incidence of HBV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in Mexico: a systematic review. *Hepatol Int*. 2009;3(2):343–55.
31. Fassio E, Díaz S, Santa C, Reig ME, Martínez Artola Y, Alves de Mattos A, et al. Etiology of hepatocellular carcinoma in Latin America: a prospective, multicenter, international study. *Ann Hepatol*. 2010;9(1):63–9.
32. Plan Esperanza. Peru; 2012.
33. George CM, Sima L, Arias MHJ, Mihalic J, Cabrera LZ, Danz D, et al. Arsenic exposure in drinking water: an unrecognized health threat in Peru. *Bull World Health Organ*. 2014;92(8):565–72.
34. Epidemiología DG De, Epidemiología RN De. *Boletín Epidemiológico*. 2012;
35. Hiotis SP, Rahbari NN, Villanueva G a, Klegar E, Luan W, Wang Q, et al. Hepatitis B vs. hepatitis C infection on viral hepatitis-associated hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:64.
36. Garcia-Esquinas E, Pollán M, Umans J, Goessler J, Guallar E, Howard B,

- et al. Arsenic Exposure and Cancer Mortality in a US-based Prospective Cohort: the Strong Heart Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;11.
37. Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Fuchs A, Bergoglio R, Tello EE, Nicolli H, et al. Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina. *Epidemiology.* 1996;7(2):117–24.
38. Smith AH, Marshall G, Yuan Y, Ferreccio C, Liaw J, von Ehrenstein O, et al. Increased mortality from lung cancer and bronchiectasis in young adults after exposure to arsenic in utero and in early childhood. *Environ Health Perspect.* 2006;114(8):1293–6.
39. Marshall G, Ferreccio C, Yuan Y, Bates MN, Steinmaus C, Selvin S, et al. Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(12):920–8.
40. Bates MN, Rey OA, Biggs ML, Hopenhayn C, Moore LE, Kalman D, et al. Case-control study of bladder cancer and exposure to arsenic in Argentina. *Am J Epidemiol.* 2004;159(4):381–9.
41. Bundschuh J, Litter MI, Parvez F, Román-Ross G, Nicolli HB, Jean J-S, et al. One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Sci Total Environ.* Elsevier B.V.; 2012;429:2–35.
42. Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Smith AH. Lung and kidney cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Córdoba, Argentina. *Int J Epidemiol.* 1998;27(4):561–9.
43. Yuan Y, Marshall G, Ferreccio C, Steinmaus C, Liaw J, Bates M, et al.

- Kidney cancer mortality: fifty-year latency patterns related to arsenic exposure. *Epidemiology*. 2010;21(1):103–8.
44. Ferreccio C, González C, Milosavjlevic V, Marshall G, Sancha AM, Smith AH. Lung cancer and arsenic concentrations in drinking water in Chile. *Epidemiology*. 2000;11(6):673–9.
 45. Nadadur SS, Srirama K, Mudipalli A. Iron transport & homeostasis mechanisms: their role in health & disease. *Indian J Med Res*. 2008;128(4):533–44.
 46. Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2010;10(5):361–71.
 47. Takahashi Y, Hamada J, Murakawa K, Takada M, Tada M, Nogami I, et al. Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. *Exp Cell Res*. 2004;293(1):144–53.
 48. Mortlock DP, Innis JW. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nat Genet*. 1997;15(2):179–80.
 49. Molecular Research Center I. TRI REAGENT® - RNA / DNA / PROTEIN ISOLATION REAGENT. 2014. p. 6–11.
 50. Agilent-Technologies. Agilent 2100 Bioanalyzer 2100 Expert User's Guide. *Agil Technol*. 2005;1–366.
 51. Lightfoot S. Quantitation comparison of total RNA using the Agilent 2100 bioanalyzer , ribo- green analysis and UV spectrometry Application. 2002.
 52. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-

- PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2):126–39.
53. Chung Y-L. Defective DNA damage response and repair in liver cells expressing hepatitis B virus surface antigen. *FASEB J.* 2013;27(6):2316–27.
 54. Dietlein F, Thelen L, Reinhardt HC. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. *Trends Genet.* Elsevier Ltd; 2014;30(8):326–39.
 55. DNA Damage Response: R&D Systems. *R&D Systems 2003 Catalog.* 2003.
 56. Bayart E, Grigorieva O, Leibovitch S, Onclercq-Delic R, Amor-Gu eret M. A major role for mitotic CDC2 kinase inactivation in the establishment of the mitotic DNA damage checkpoint. *Cancer Res.* 2004;64(24):8954–9.
 57. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science.* 1998;281(5383):1674–7.
 58. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science.* 1998;281(5383):1677–9.
 59. Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, et al. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet.* 1998;20(4):398–400.
 60. Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(24):13777–82.
61. Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* 2000;14(3):278–88.
 62. Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science.* 2000;287(5459):1824–7.
 63. Siddique H, Zou JP, Rao VN, Reddy ES. The BRCA2 is a histone acetyltransferase. *Oncogene.* 1998;16(17):2283–5.
 64. Zhou BS, Elledge SJ. Checkpoints in perspective. *Nature.* 2000;408:433–9.
 65. Singer JD, Gurian-West M, Clurman B, Roberts JM. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev.* 1999;13(18):2375–87.
 66. Zhao F, Hou N-B, Song T, He X, Zheng Z-R, Ma Q-J, et al. Cellular DNA repair cofactors affecting hepatitis B virus infection and replication. *World J Gastroenterol.* 2008;14(32):5059–65.
 67. Mukhopadhyay CK, Attieh ZK, Fox PL. Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science.* 1998 Jan 30 [cited 2016 May 25];279(5351):714–7.
 68. Kew MC. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2009;286(1):38–43.
 69. Andrews NC, Schmidt PJ. *Iron Homeostasis.* 2007;
 70. Miyanishi K, Hoki T, Tanaka S, Kato J. Prevention of hepatocellular carcinoma: Focusing on antioxidant therapy. *World J Hepatol.*

2015;7(3):593–9.

71. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, Manzini P, et al. Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(6):1251–8.
72. Issaeva I, Zonis Y, Rozovskaia T, Orlovsky K, Croce CM, Nakamura T, et al. Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth. *Mol Cell Biol.* 2007;27(5):1889–903.

12. ANEXOS

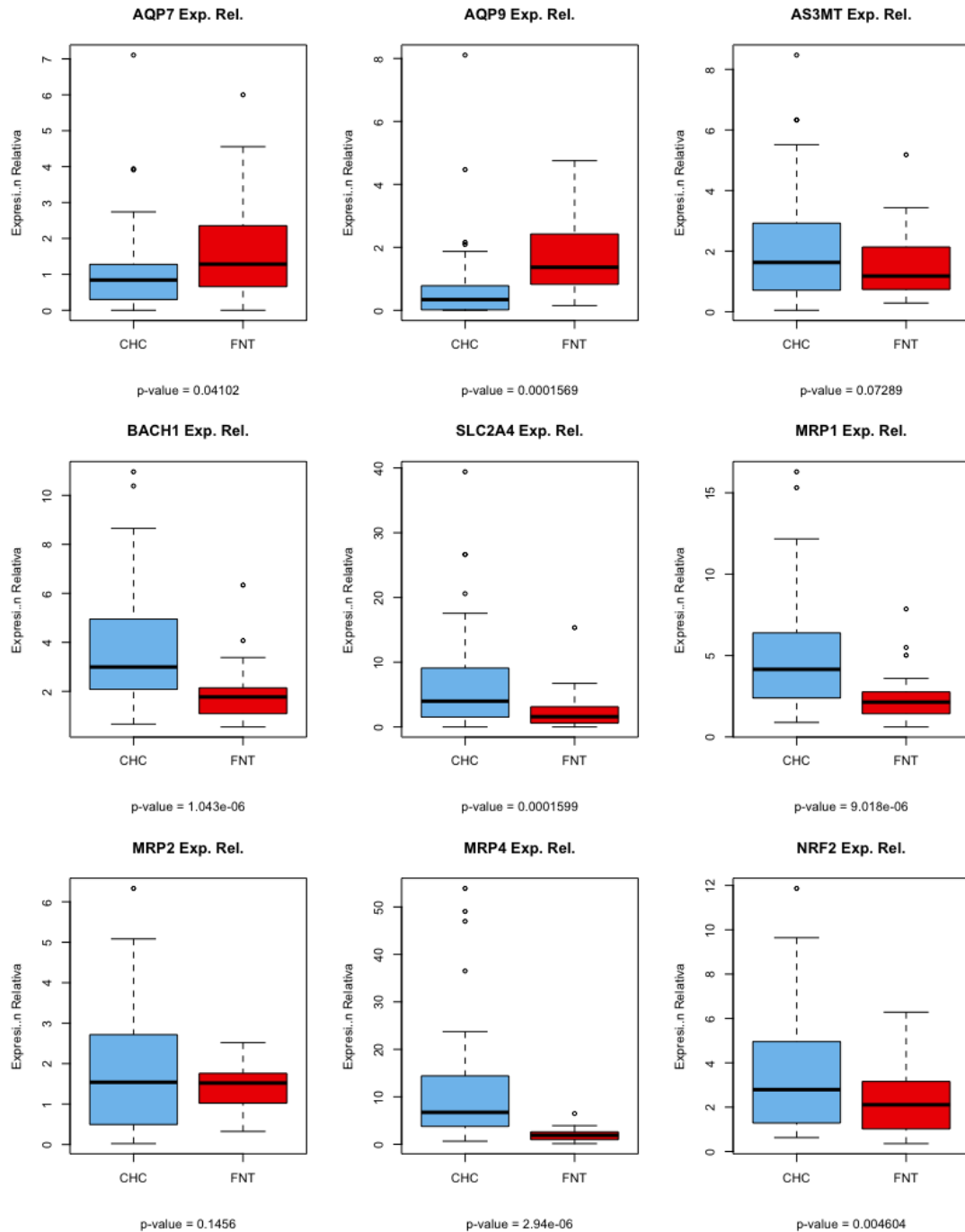


Figura 1S. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del arsénico en el tejido CHC y NT. Se evaluaron genes que participan en el intercambio de arsénico y derivados (i.e. AQP7/9, SLC2A4 y MRP1/2/4), el gen que codifica la proteína encargada de la metilación del arsénico III (AS3MT) y genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo causado por los altos niveles de arsénico (i.e. NRF2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

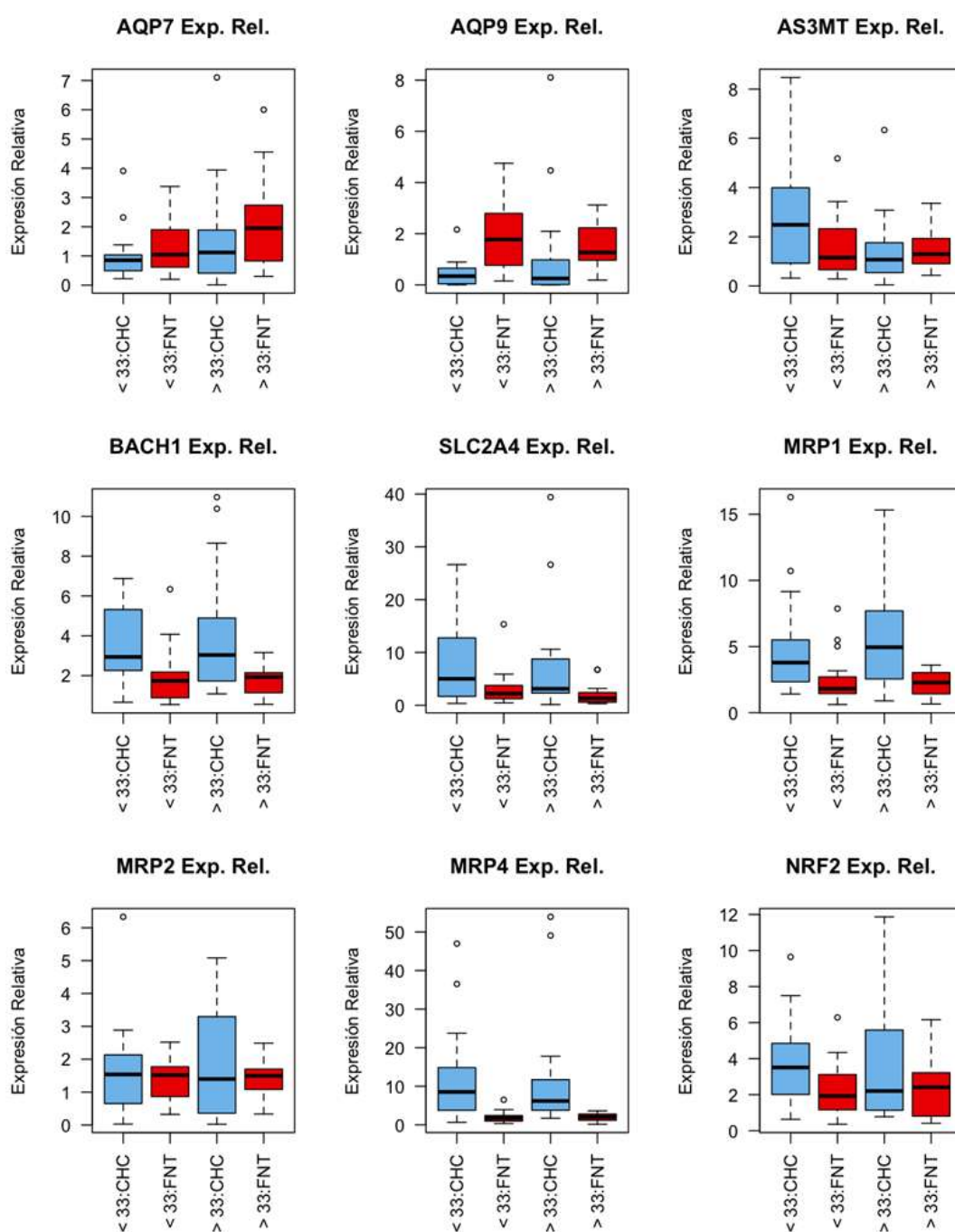


Figura 2S. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del arsénico en el tejido CHC y NT sub-agrupados por la Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en el intercambio de arsénico y derivados (i.e. AQP7/9, SLC2A4 y MRP1/2/4), el gen que codifica la proteína encargada de la metilación del arsénico III (AS3MT) y genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo causado por los altos niveles de arsénico (i.e. NRF2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT), sub-agrupados según la edad.

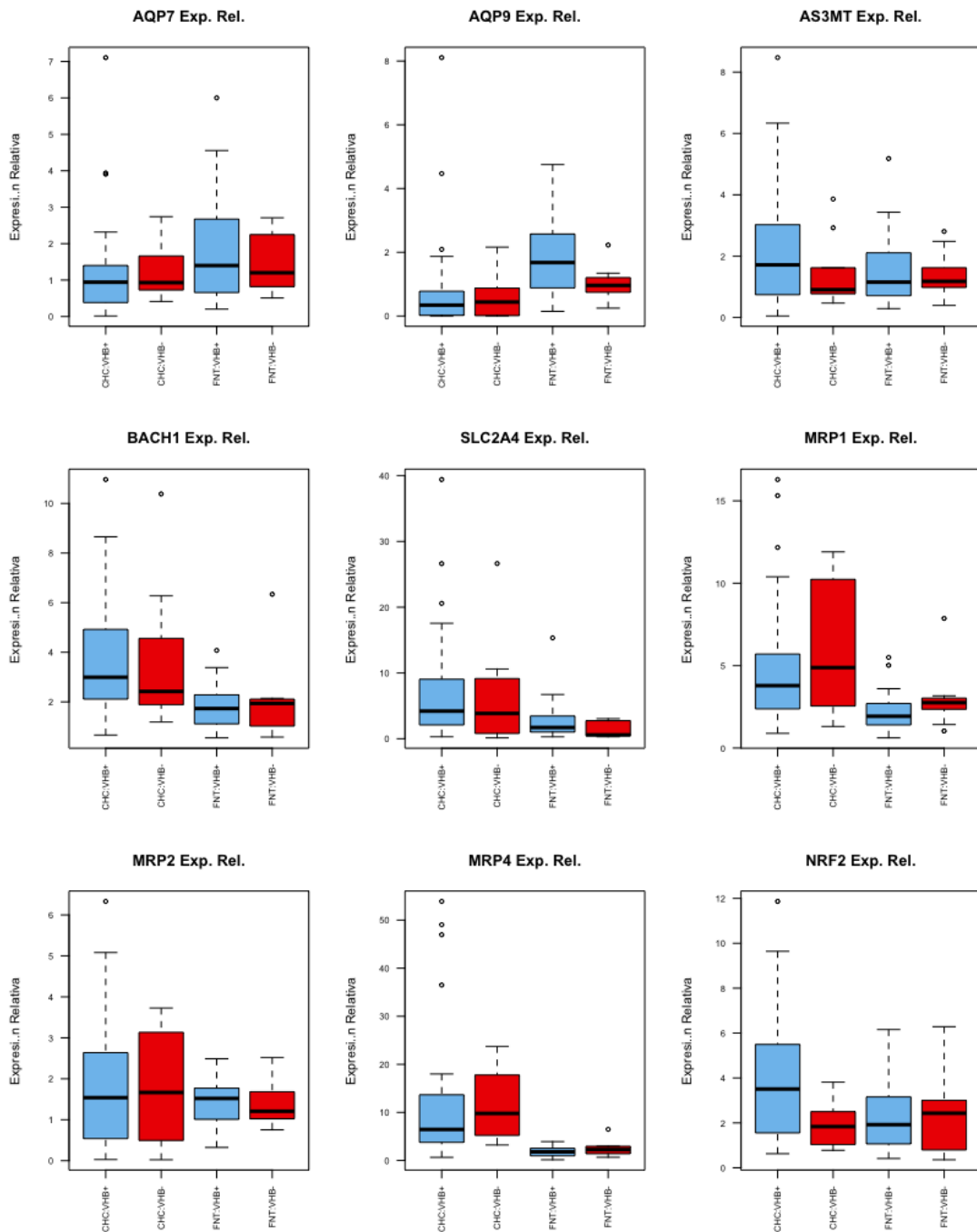


Figura 3S. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del arsénico en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se evaluaron genes que participan en el intercambio de arsénico y derivados (i.e. AQP7/9, SLC2A4 y MRP1/2/4), el gen que codifica la proteína encargada de la metilación del arsénico III (AS3MT) y genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo causado por los altos niveles de arsénico (i.e. NRF2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT), sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

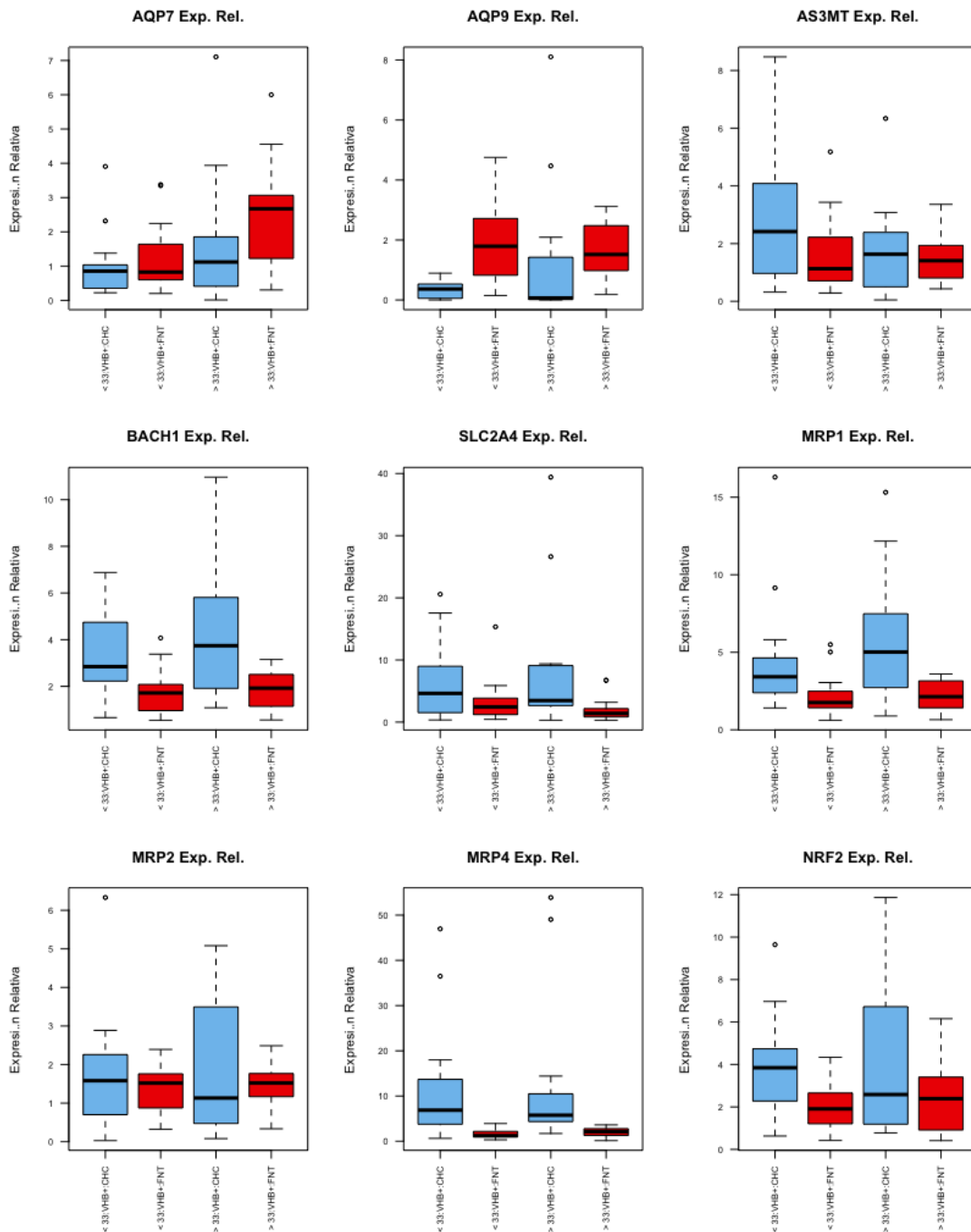


Figura 4S. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del arsénico en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se han evaluado genes que participan en el intercambio de arsénico y derivados (i.e. AQP7/9, SLC2A4 y MRP1/2/4), el gen que codifica la proteína encargada de la metilación del arsénico III (AS3MT) y genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo causado por los altos niveles de arsénico (i.e. NRF2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT)), sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y por Edad.

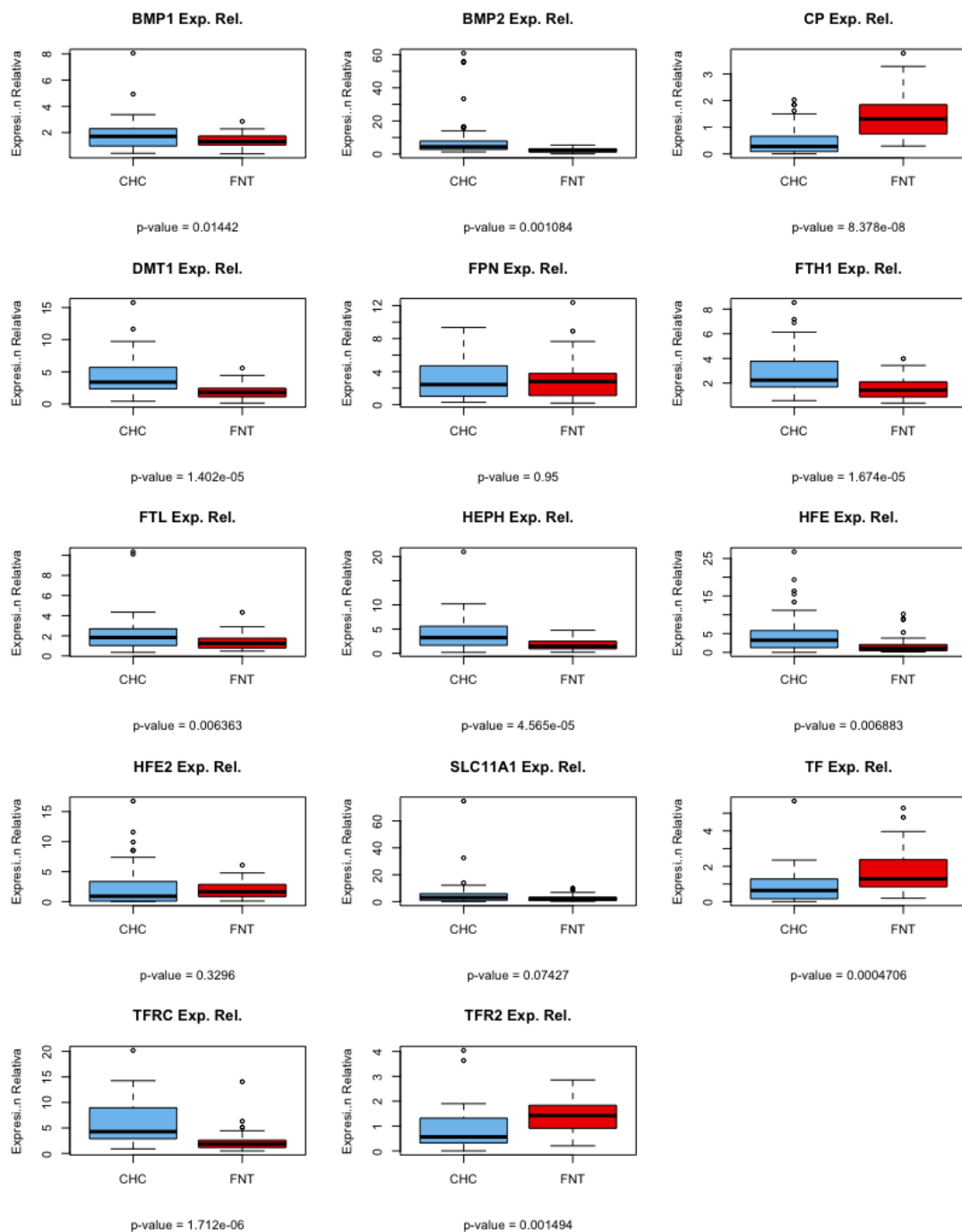


Figura 5S. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del hierro en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la incorporación (i.e. TFR1/2, HFE y DMT1) y en la eliminación de hierro (i.e. HEPH, FPN, CP y SLS11A1), de ciertas ferroxidasas (i.e. HEPH, CP), genes que codifican proteínas que almacenan hierro (i.e. FTH1 y FTL), transportadores de hierro (TF) y genes controladores de la captación de hierro (i.e. BMP1/2 Y HFE2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

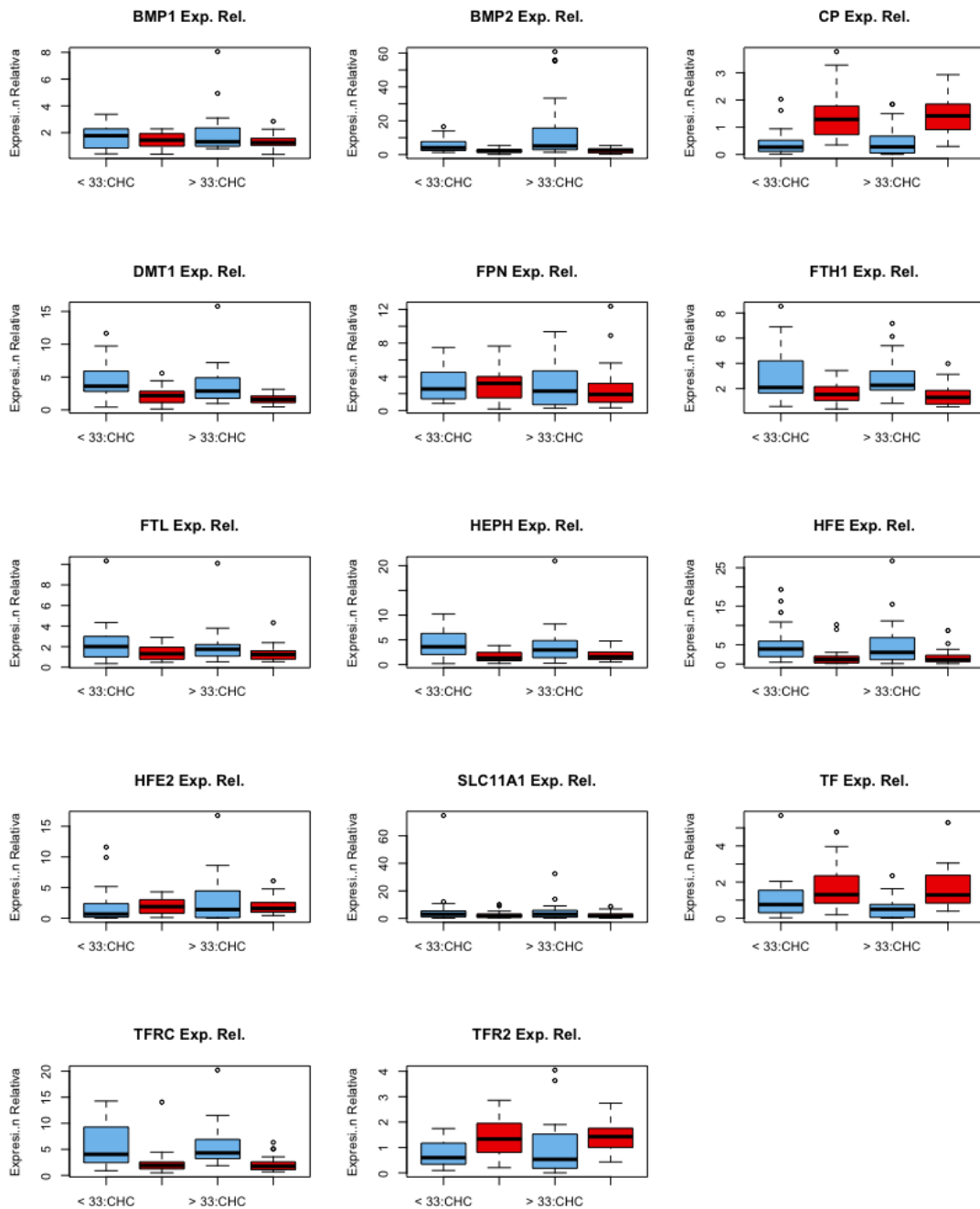


Figura 6S. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del hierro en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se han evaluados genes que participan en la incorporación (i.e. TFR1/2, HFE y DMT1) y en la eliminación de hierro (i.e. HEPH, FPN, CP y SLS11A1), de ciertas ferroxidasas (i.e. HEPH, CP), genes que codifican proteínas que almacenan hierro (i.e. FTH1 y FTL), transportadores de hierro (TF) y genes controladores de la captación de hierro (i.e. BMP1/2 Y HFE2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la edad.

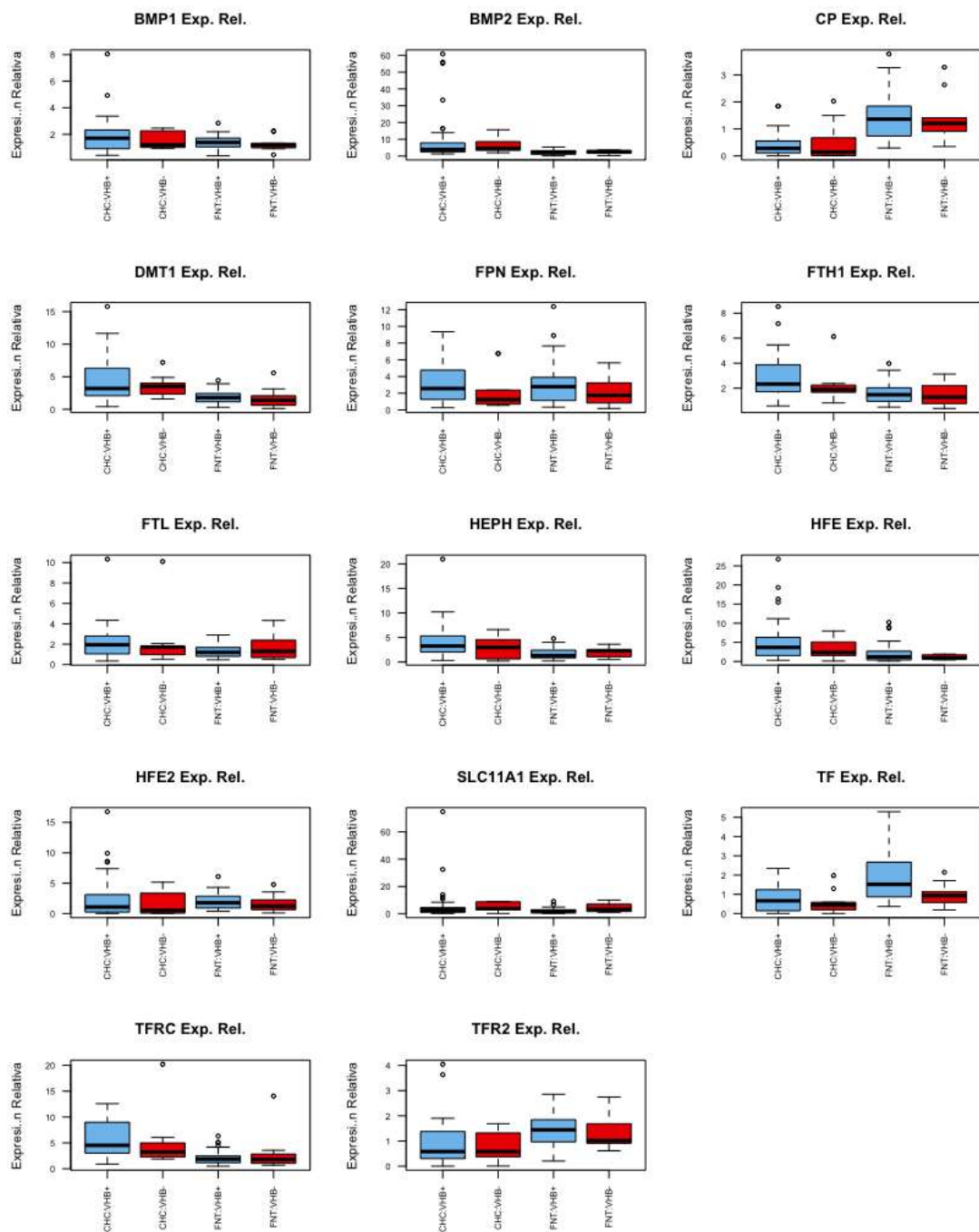


Figura 7S. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del hierro en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado genes que participan en la incorporación (i.e. TFR1/2, HFE y DMT1) y en la eliminación de hierro (i.e. HEPH, FPN, CP y SLS11A1), de ciertas ferroxidasas (i.e. HEPH, CP), genes que codifican proteínas que almacenan hierro (i.e. FTH1 y FTL), transportadores de hierro (TF) y genes controladores de la captación de hierro (i.e. BMP1/2 Y HFE2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

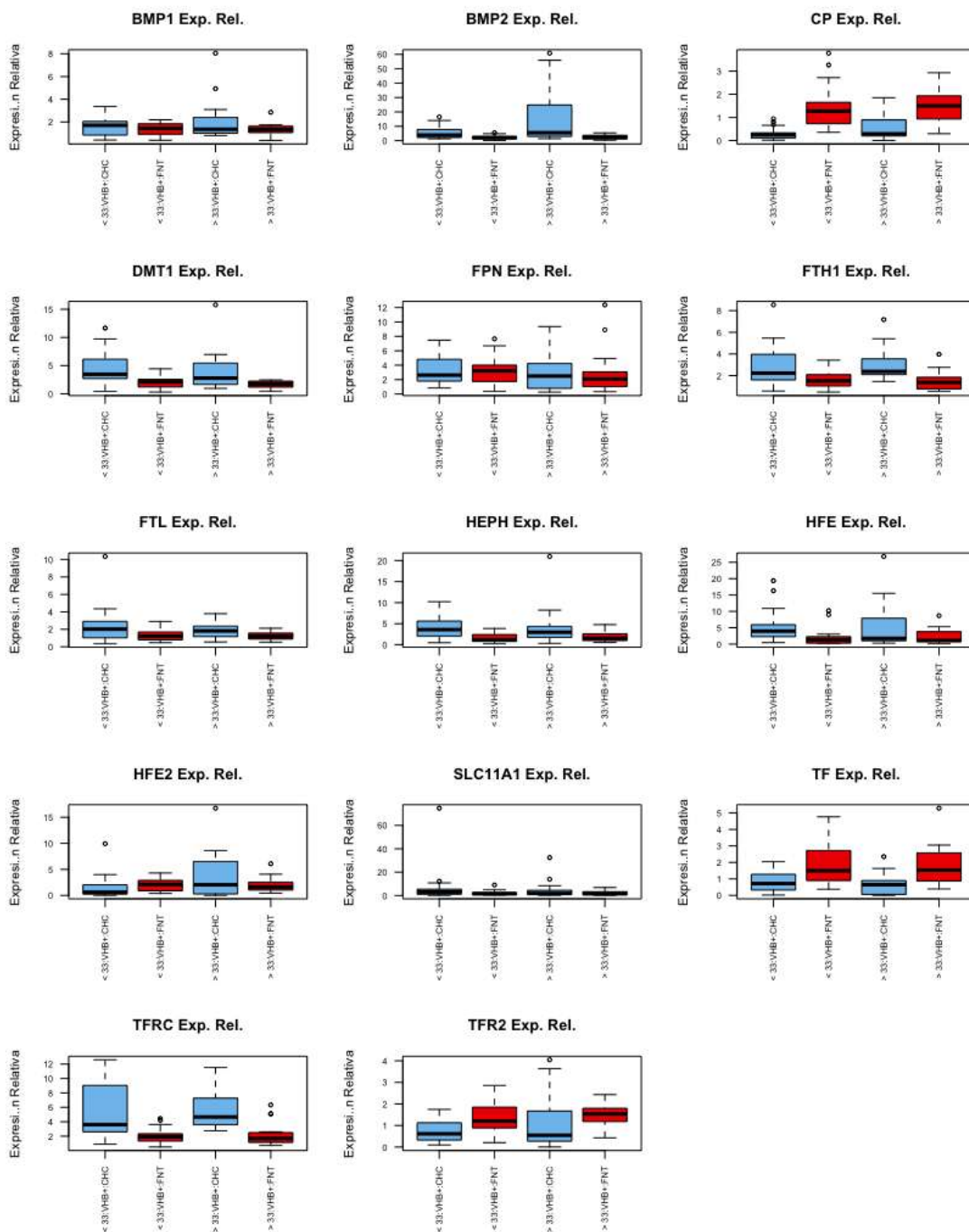


Figura 8S. Comparación de la expresión de genes que intervienen en el metabolismo del hierro en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado genes que participan en la incorporación (i.e. TFR1/2, HFE y DMT1) y en la eliminación de hierro (i.e. HEPH, FPN, CP y SLS11A1), de ciertas ferroxidasas (i.e. HEPH, CP), genes que codifican proteínas que almacenan hierro (i.e. FTH1 y FTL), transportadores de hierro (TF) y genes controladores de la captación de hierro (i.e. BMP1/2 Y HFE2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y por Edad.

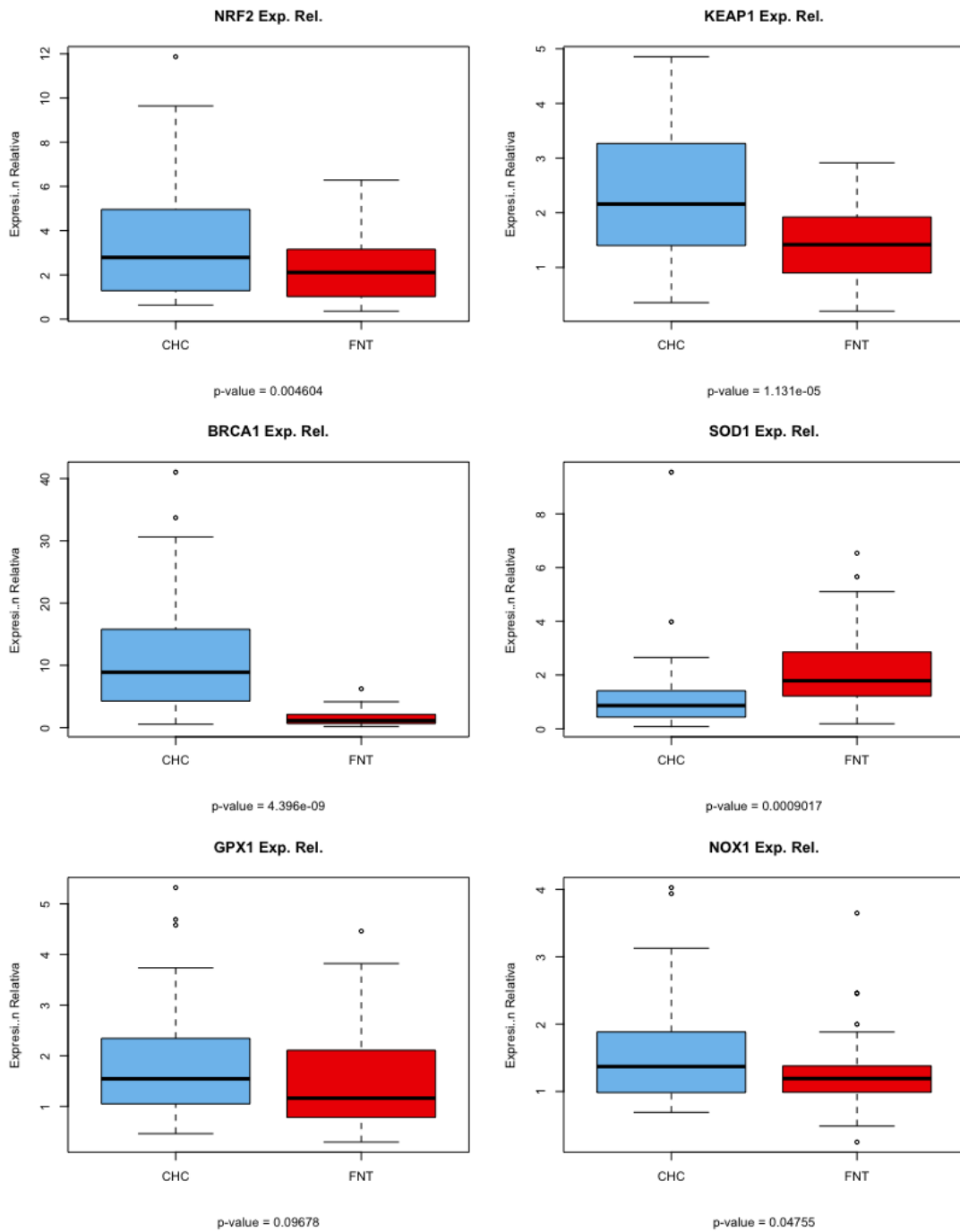


Figura 9S.1 Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía NRF2 – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes (i.e. SOD1, GPX1) cómo respuesta a la activación de la vía, así cómo activadores (i.e. BRCA1) y represores (KEAP1); además del gen que codifica la proteína efectora de esta vía (NRF2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

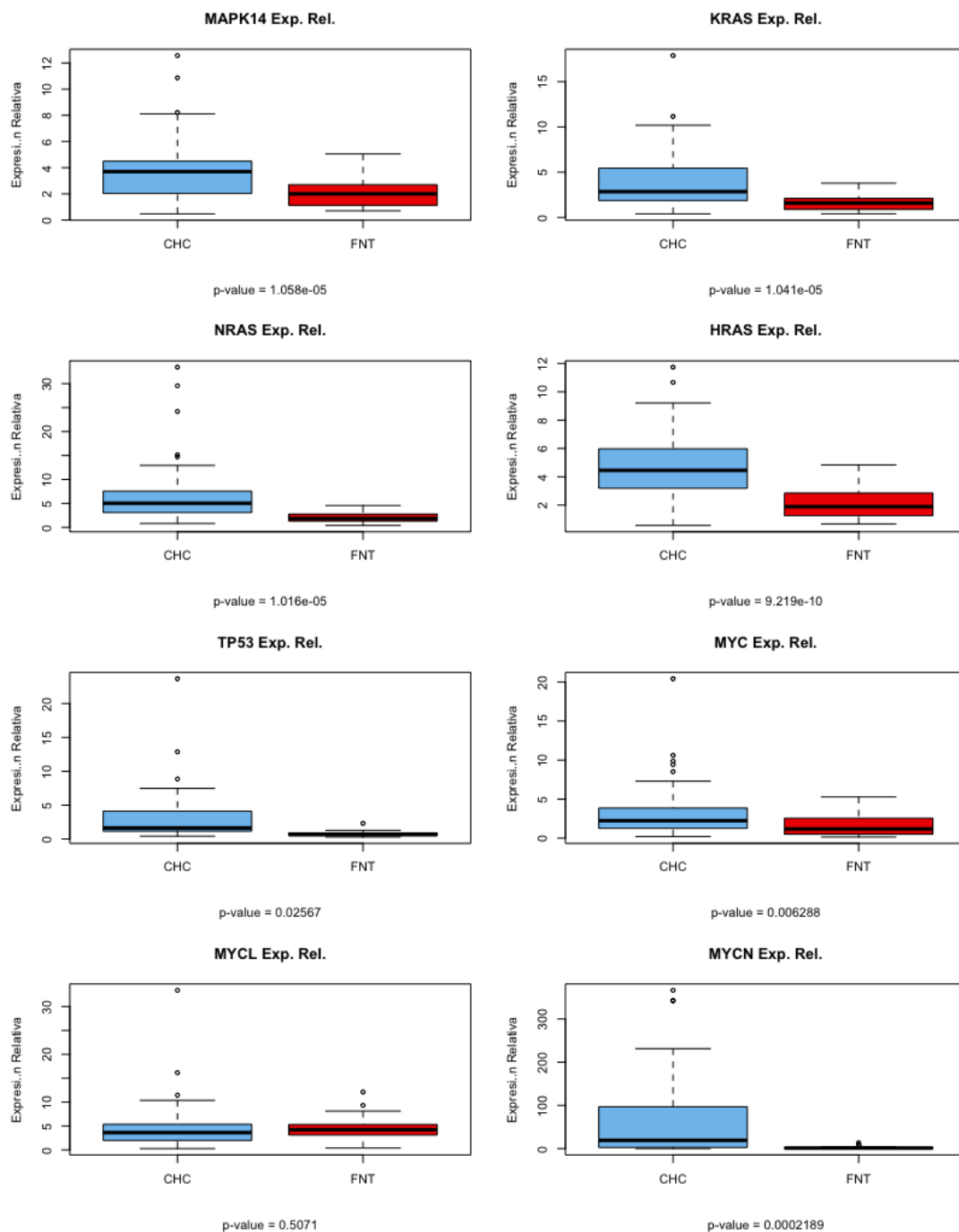


Figura 9S.2 Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía p38 α – respuesta al estrés oxidativo – del tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (p38 α) y algunos de los genes que son transcritos como resultado de la activación de esta vía (i.e. MYC, MYCN, MYCL y TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

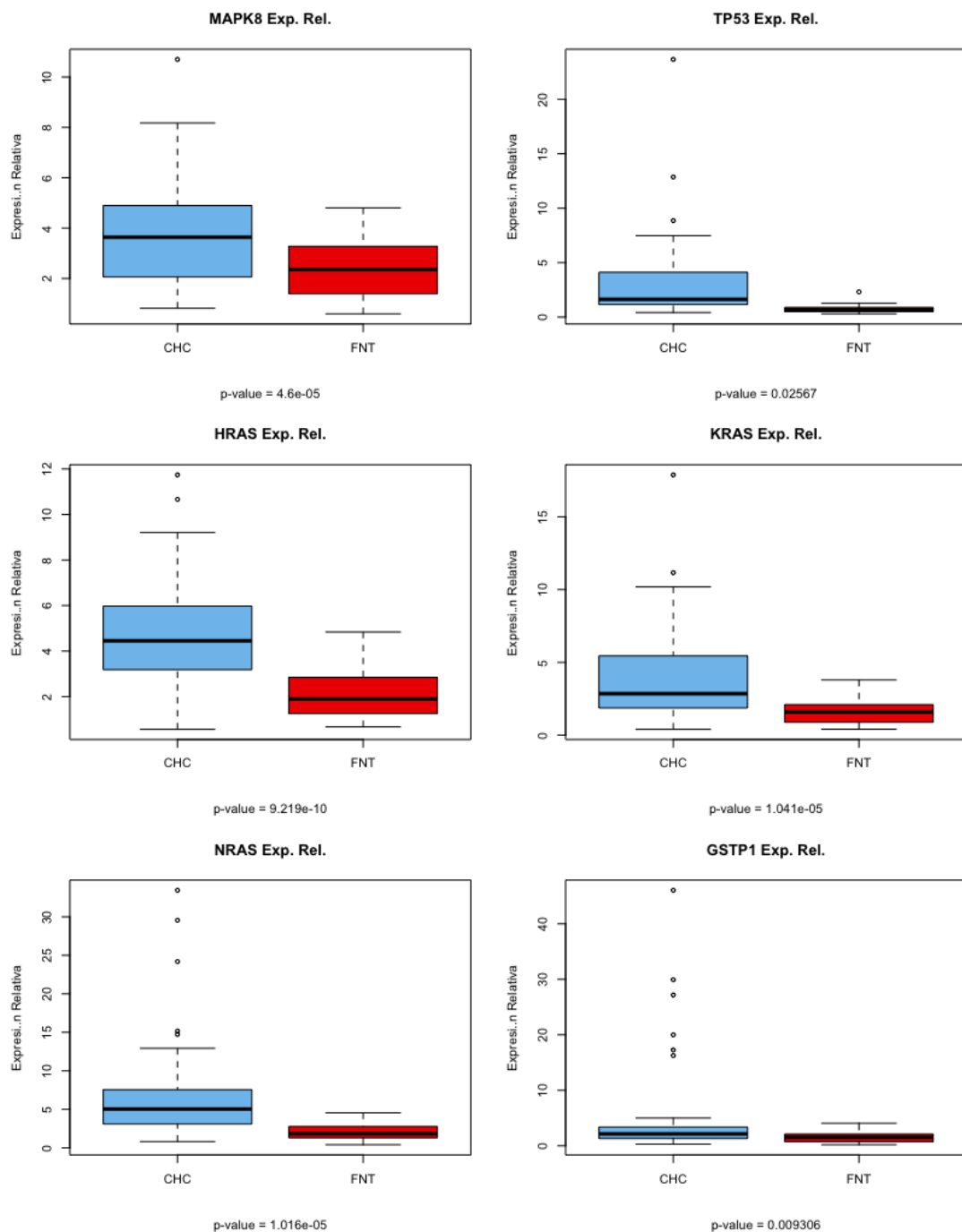


Figura 9S.3. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía JNK – respuesta al estrés oxidativo – del tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (MAPK8) y algunos de los genes que son transcritos como resultado de la activación de esta vía (i.e. TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

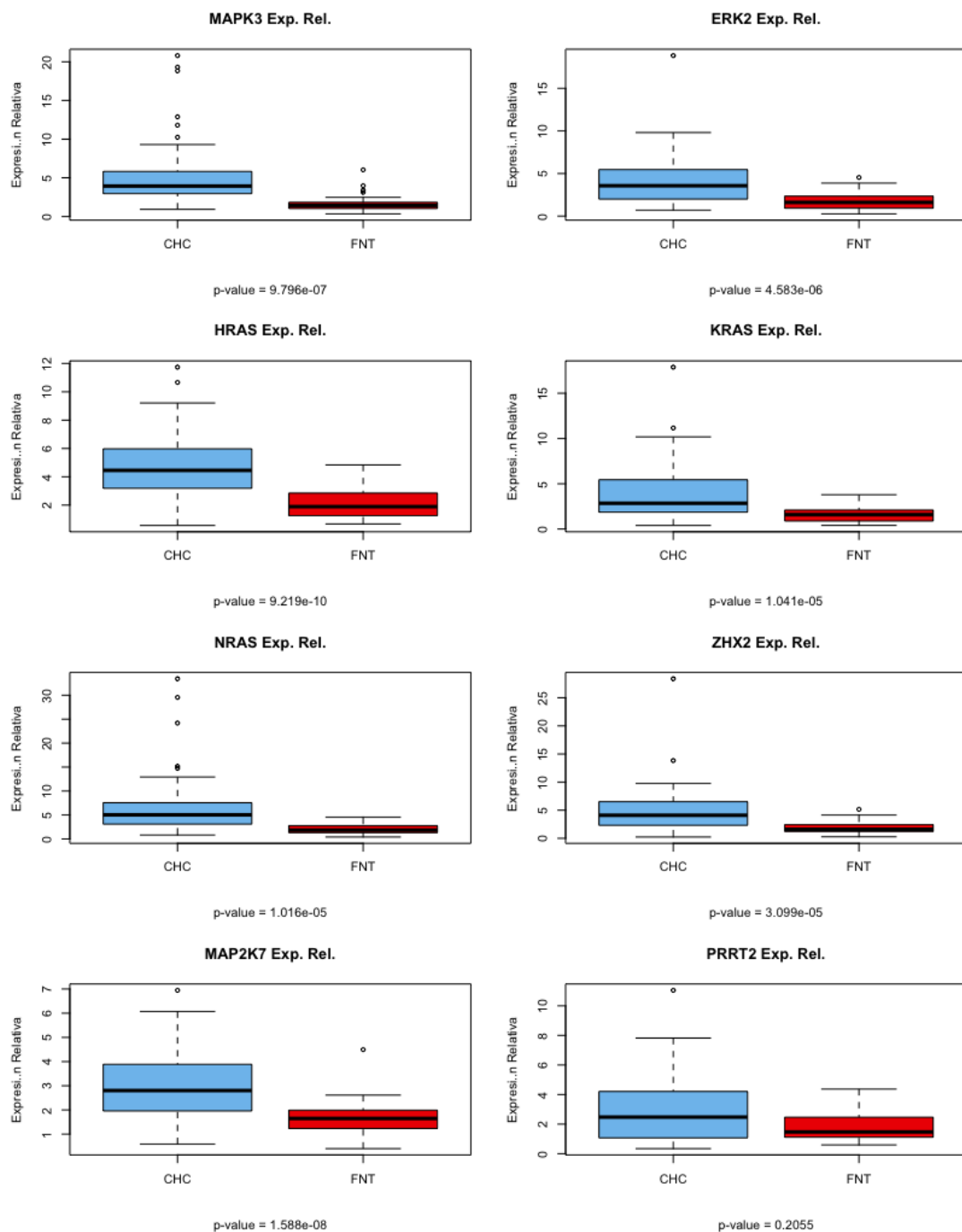


Figura 9S.4. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía ERK1/2 – respuesta al estrés oxidativo – del tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS, MAP2K7, PRRT2, RAF), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (MAPK3/ERK2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

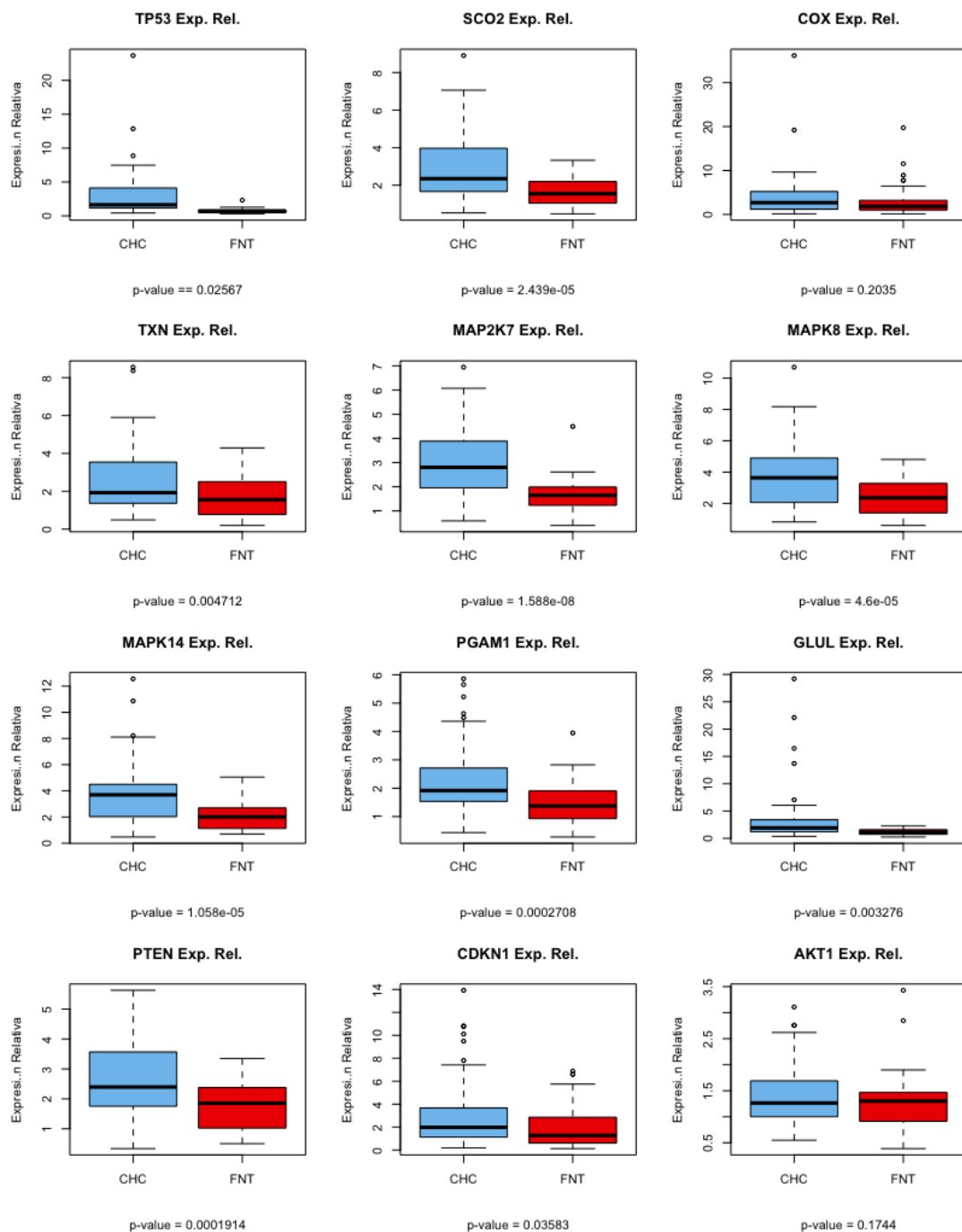


Figura 9S.5. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía p53 – respuesta al estrés oxidativo – del tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que son activados como resultado de la activación de la proteína efectora de esta vía (TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

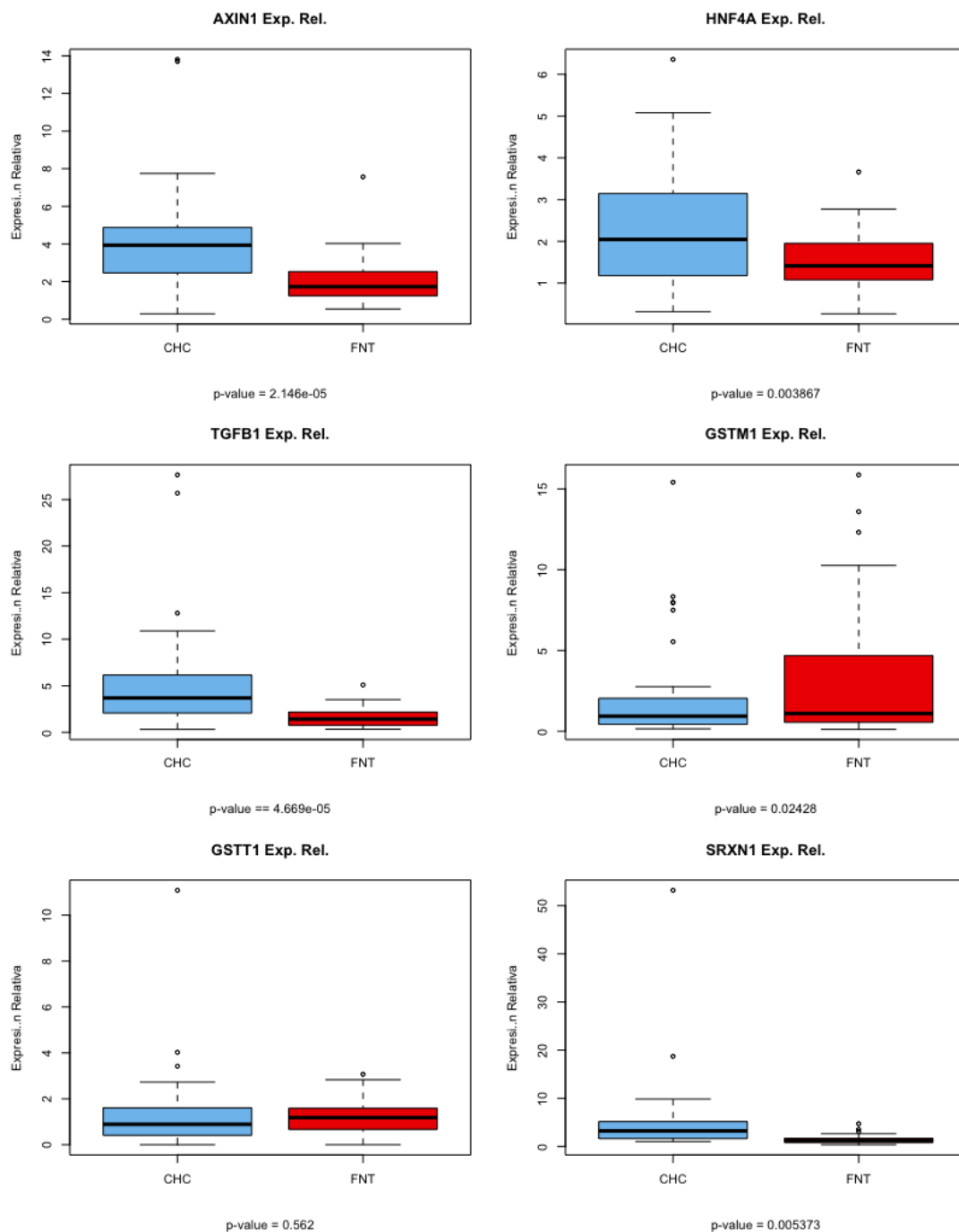


Figura 9S.6. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de respuesta al estrés oxidativo en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que regulan la activación de diferentes genes en el hígado (i.e. HNF4A) y genes que codifican proteínas antioxidantes (i.e. SRXN1, GSTM1, GSTT1) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

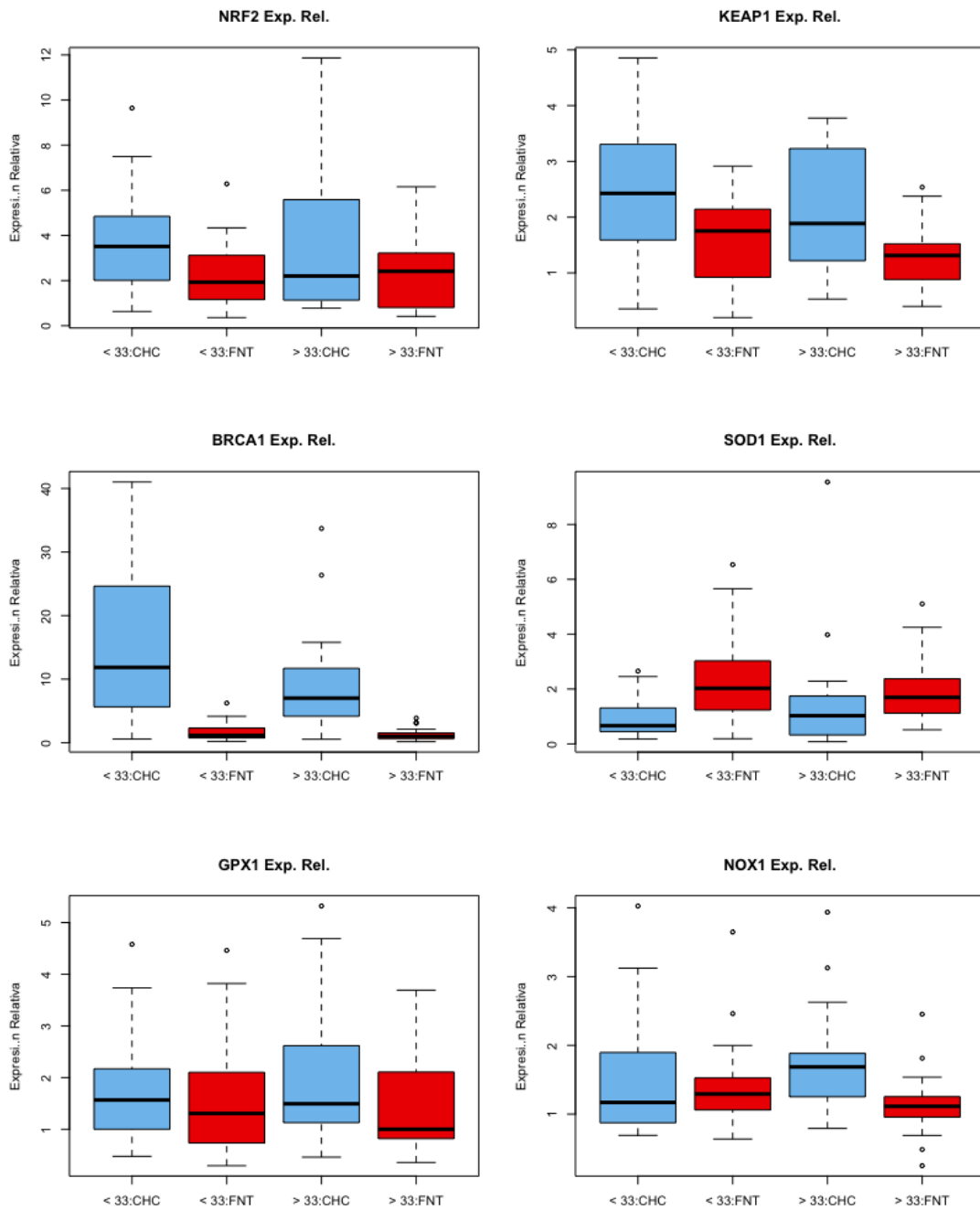


Figura 10S.1. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía NRF2 – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes (i.e. SOD1, GPX1) cómo respuesta a la activación de la vía, así como activadores (i.e. BRCA1) y represores (KEAP1); además del gen que codifica la proteína efectora de esta vía (NRF2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

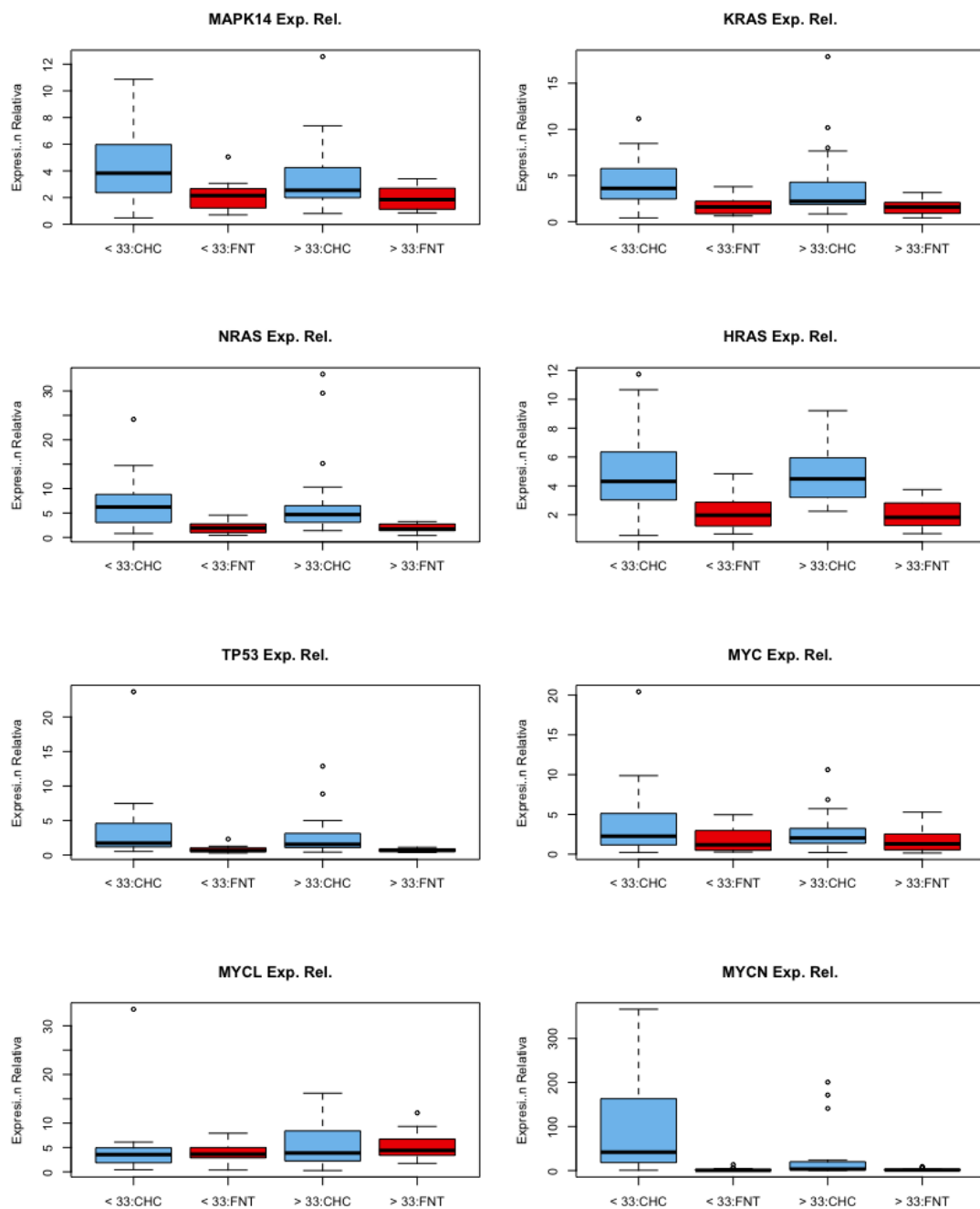


Figura 10S .2. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía p38 α – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (p38 α) y algunos de los genes que son transcritos como resultado de la activación de esta vía (i.e. MYC, MYCN, MYCL y TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

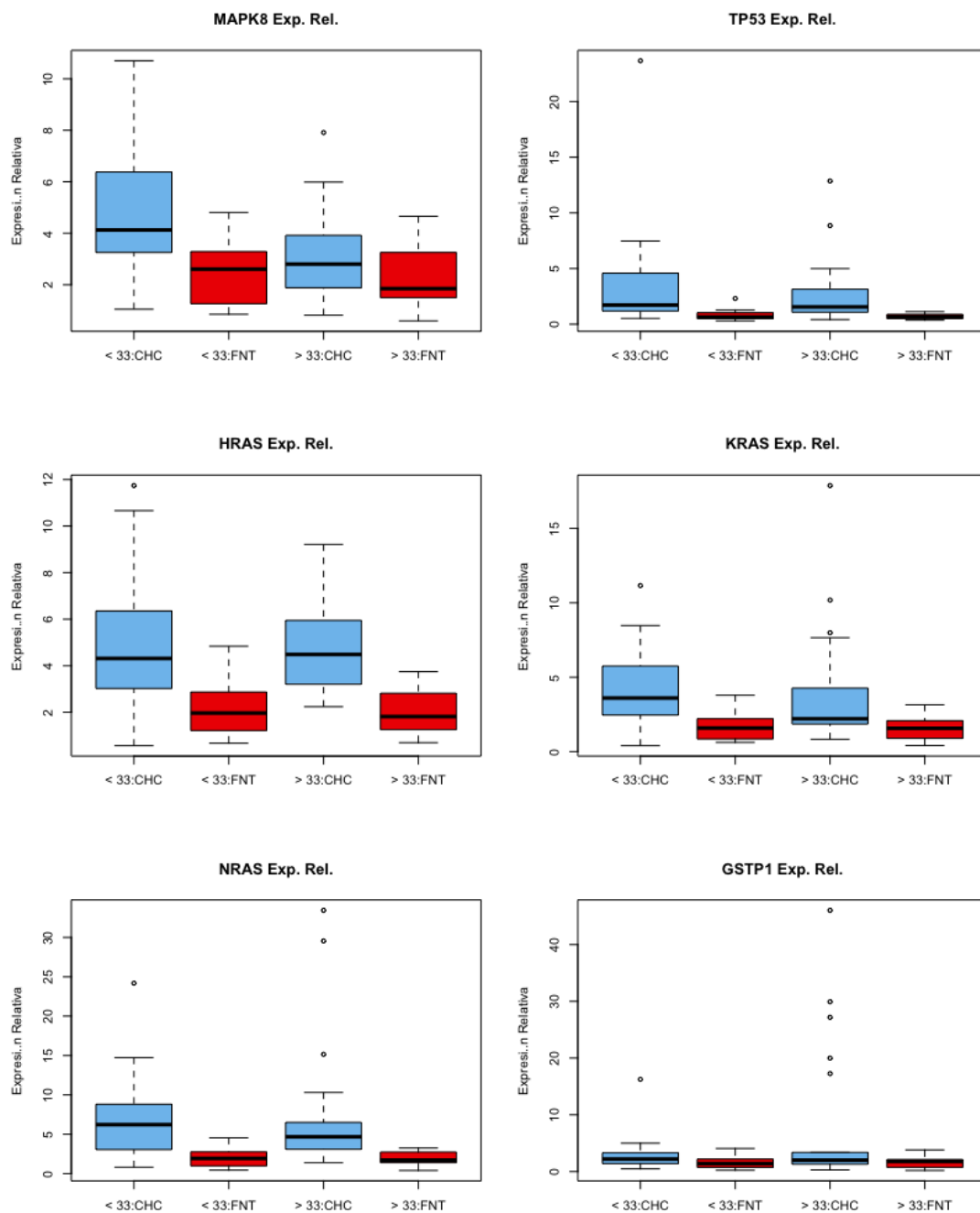


Figura 10S .3. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía JNK – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (JNK/MAPK8) y algunos de los genes que son transcritos como resultado de la activación de esta vía (i.e. TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

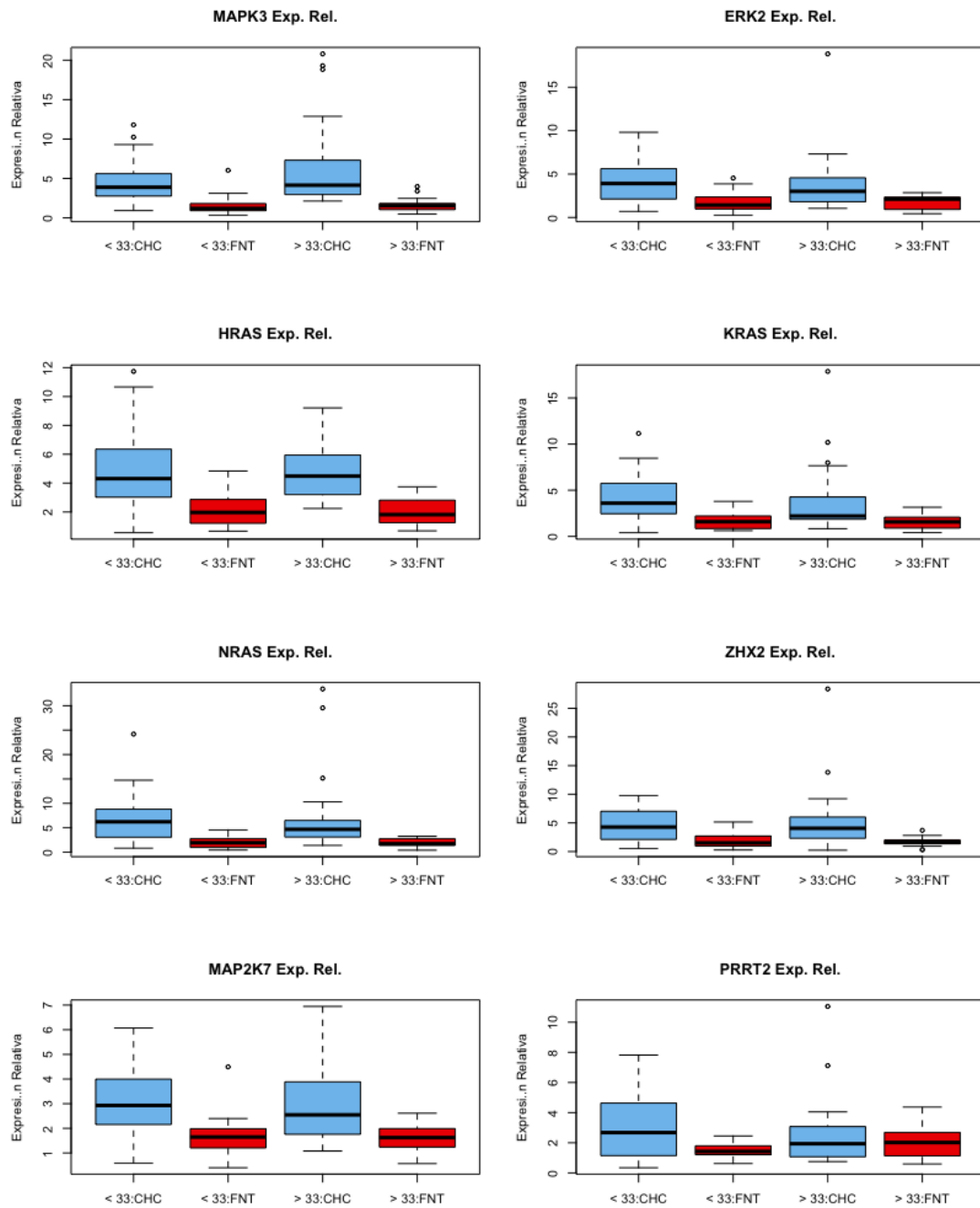


Figura 10S .4. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía ERK1/2 – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS, MEK, PRRT2, ZHX2), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (MAPK3/ERK2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

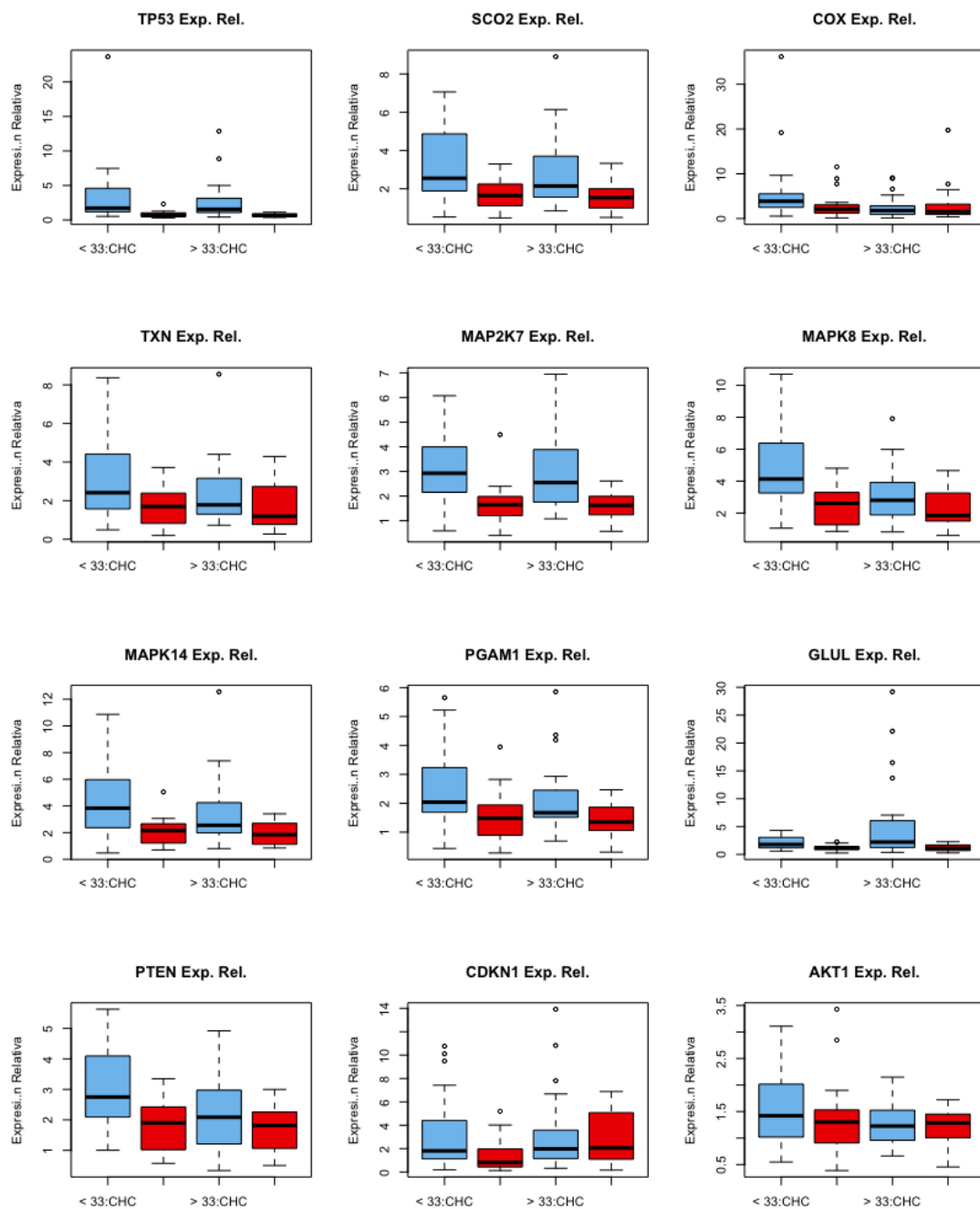


Figura 10S .5. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía p53 – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que son activados cómo resultado de la activación de la proteína efectora de esta vía (TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

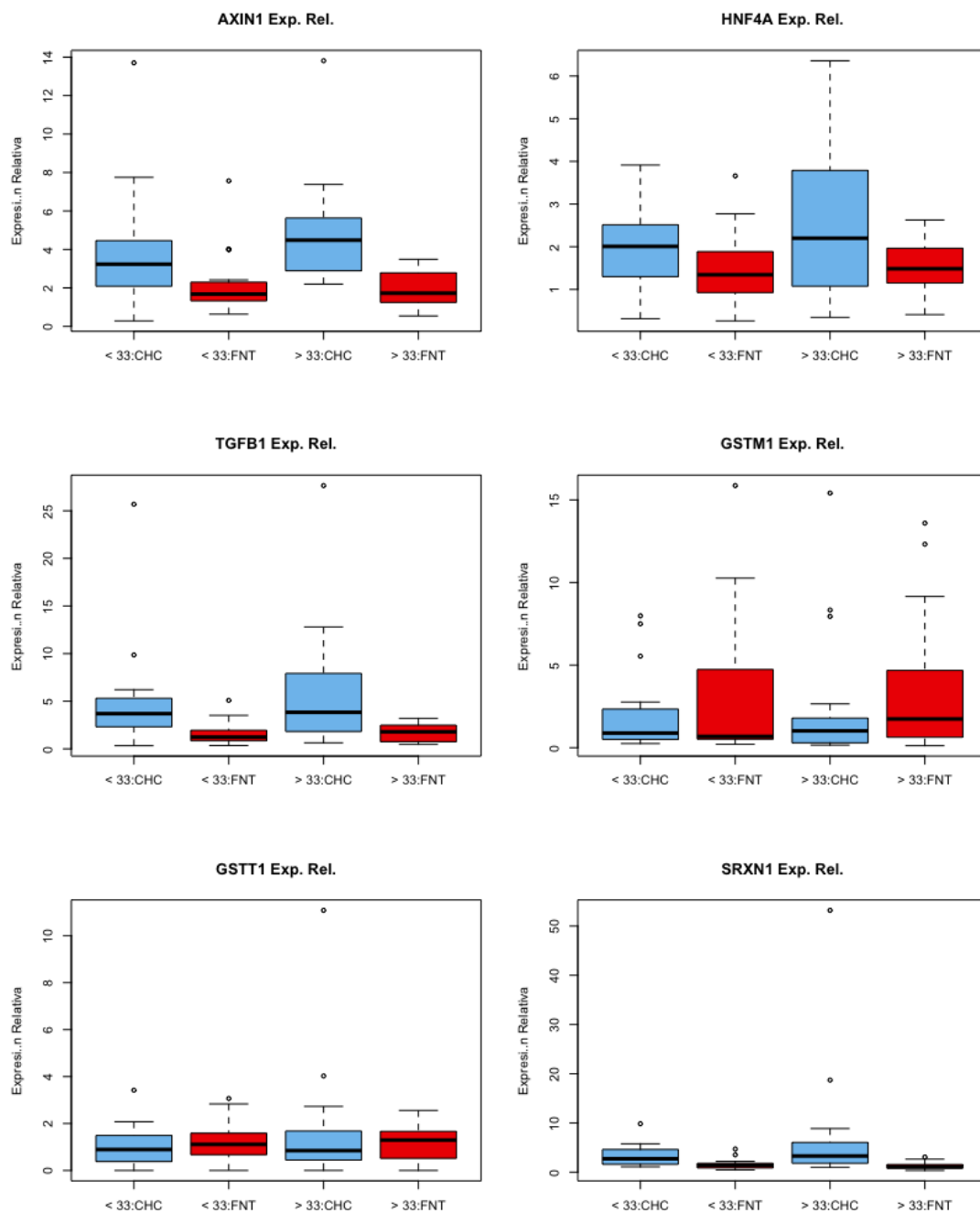


Figura 10S .6. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de respuesta al estrés oxidativo en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que regulan la activación de diferentes genes en el hígado (i.e. HNF4A) y genes que codifican proteínas antioxidantes (i.e. SRXN1, GSTM1, GSTT1) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

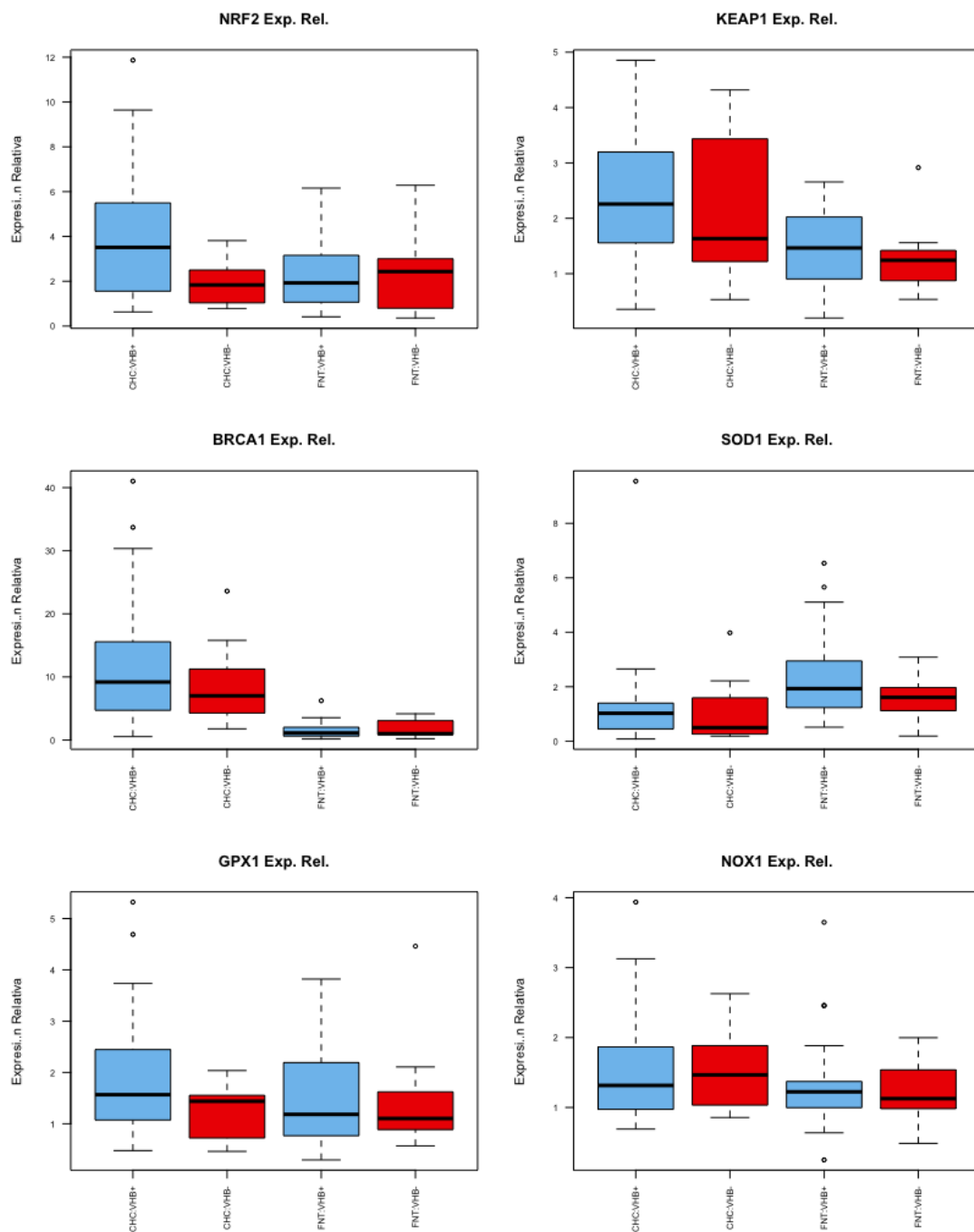


Figura 11S.1. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía NRF2 – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes (i.e. SOD1, GPX1) como respuesta a la activación de la vía, así como activadores (i.e. BRCA1) y represores (KEAP1); además del gen que codifica la proteína efectora de esta vía (NRF2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

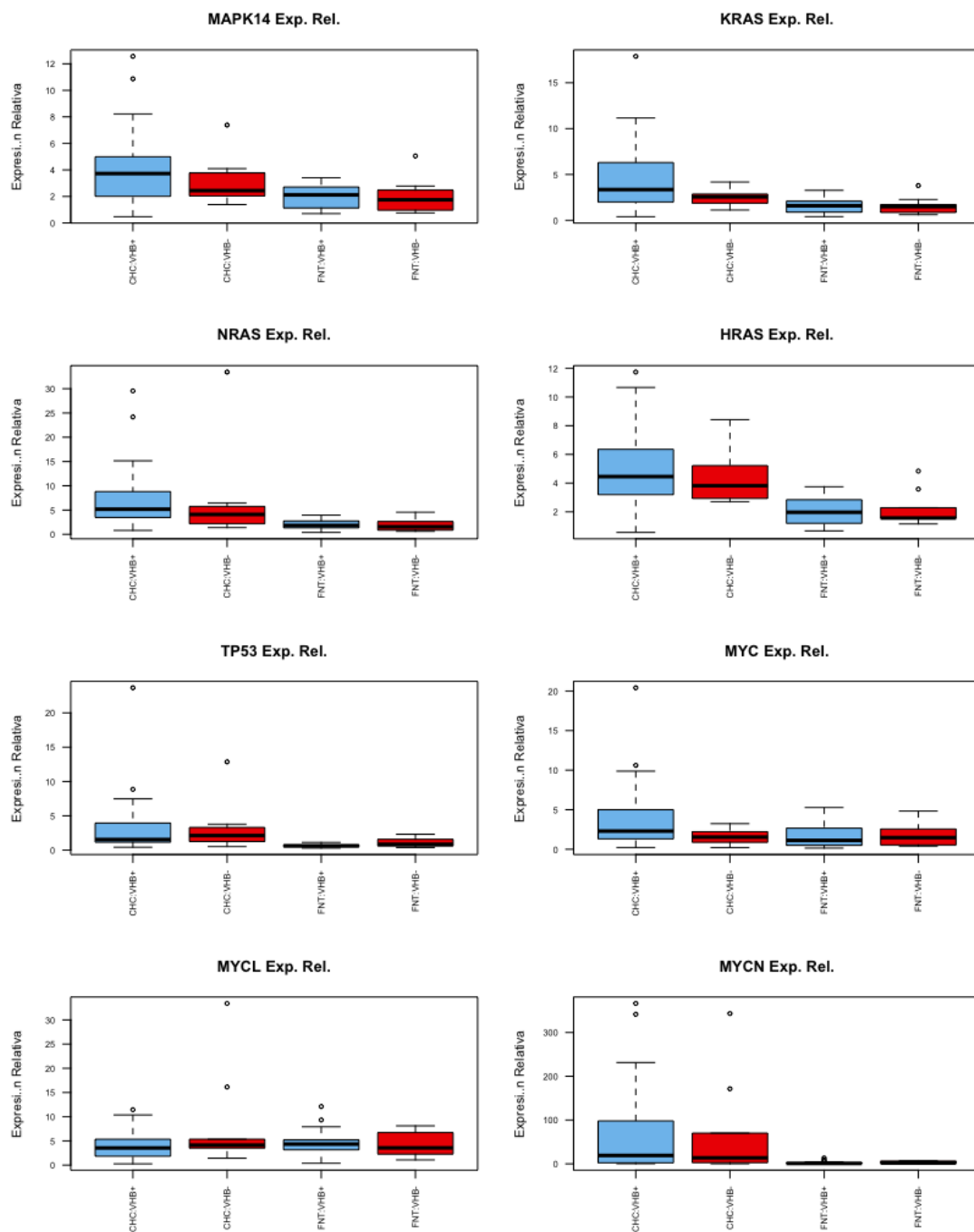


Figura 11S.2. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía p38 α – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (p38 α) y algunos de los genes que son transcritos como resultado de la activación de esta vía (i.e. MYC, MYCN, MYCL y TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

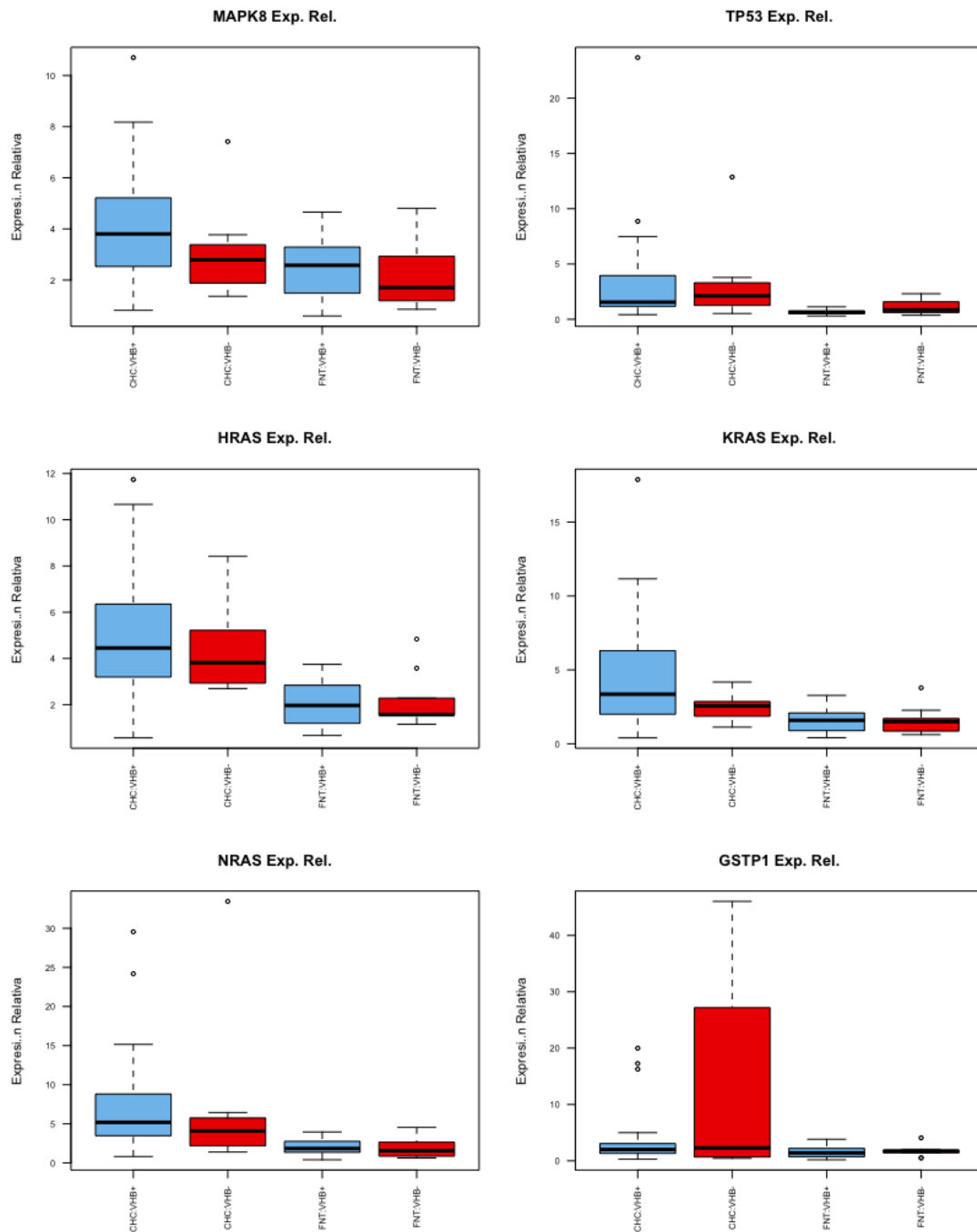


Figura 11S.3. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía JNK – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT sub-grupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (MAPK8) y algunos de los genes que son transcritos como resultado de la activación de esta vía (i.e. TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-grupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

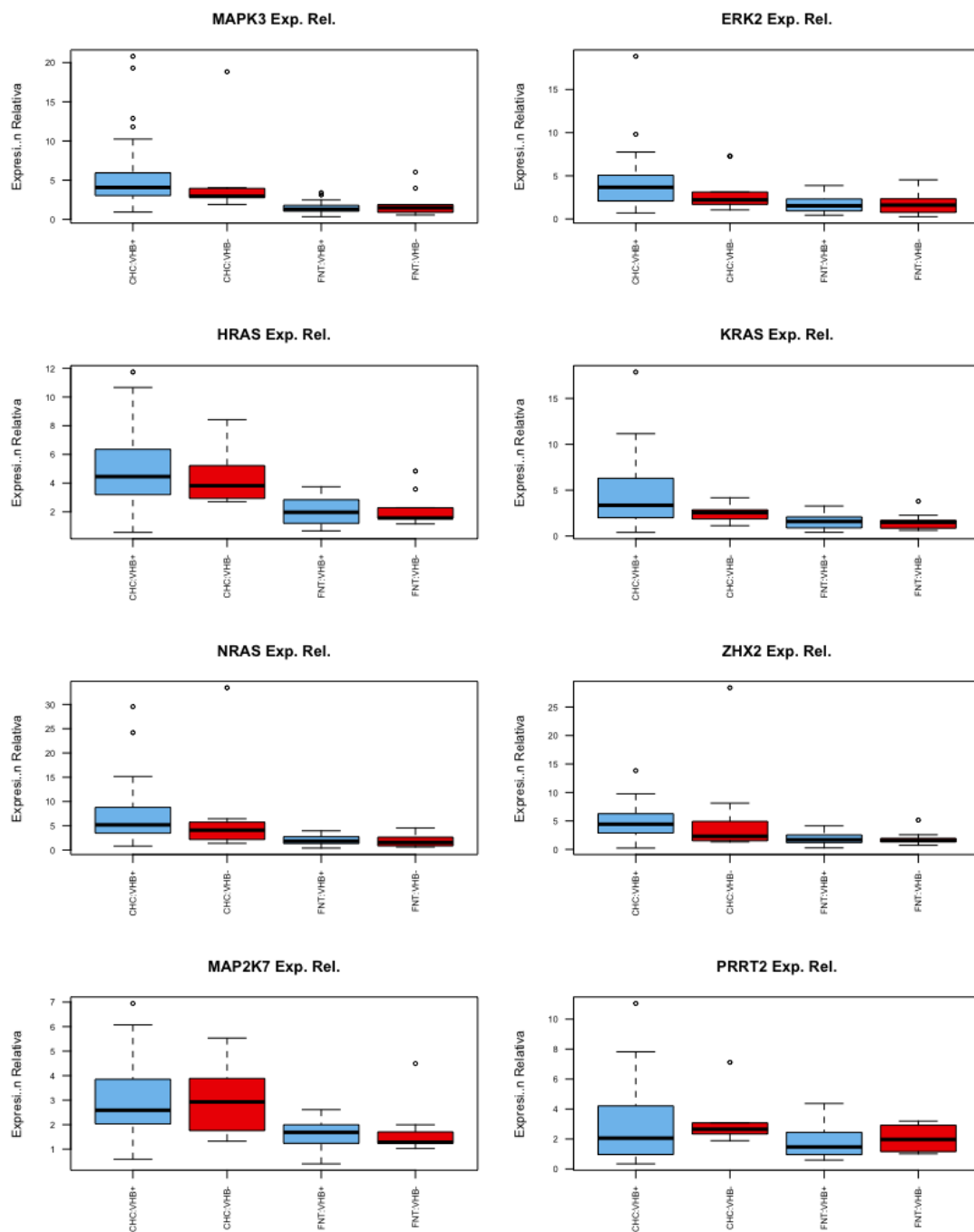


Figura 11S.4. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía ERK1/2 – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS, MAP2K7, PRRT2, RAF), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (MAPK3/ERK2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

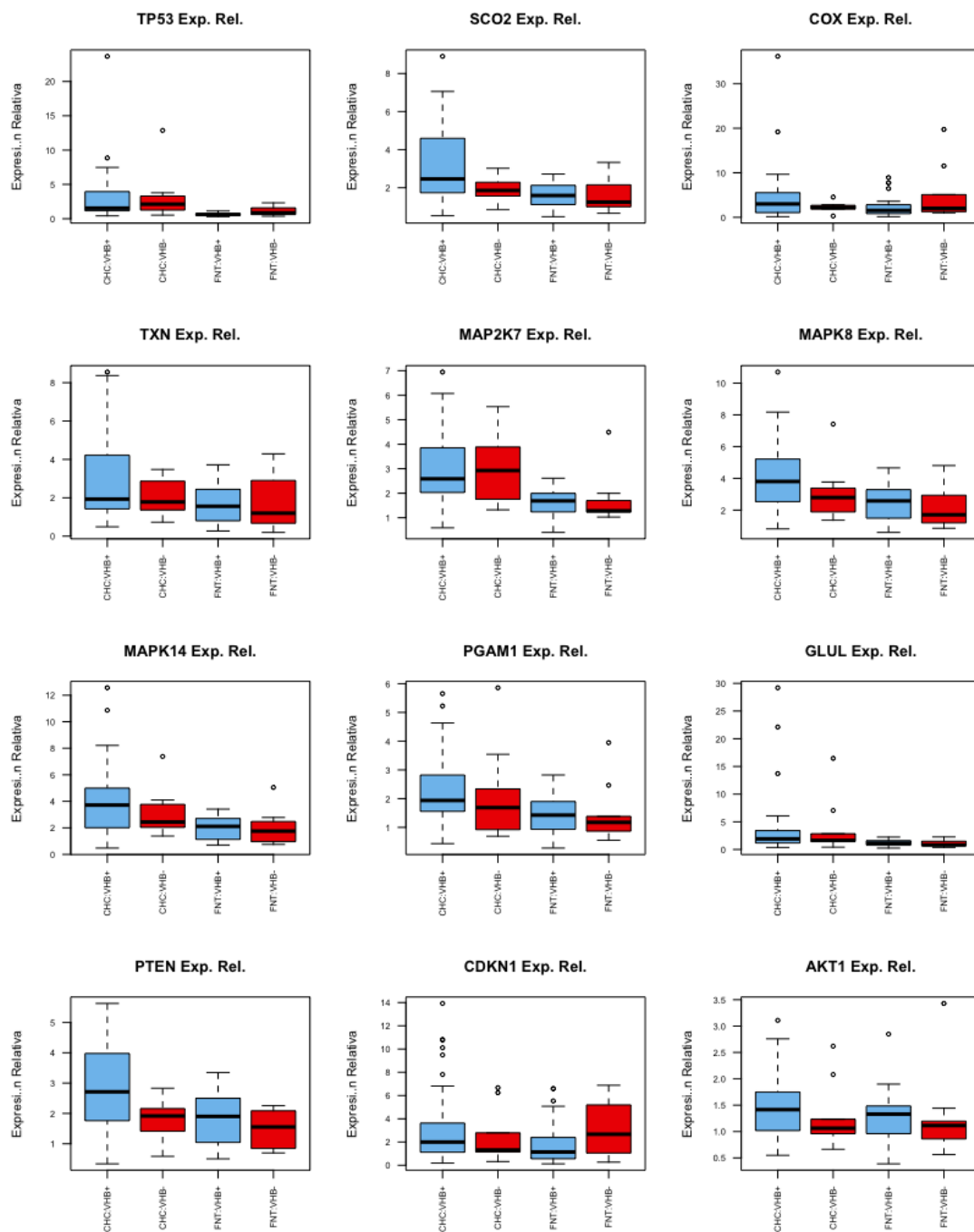


Figura 11S.5. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía p53 – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que son activados como resultado de la activación de la proteína efectora de esta vía (TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

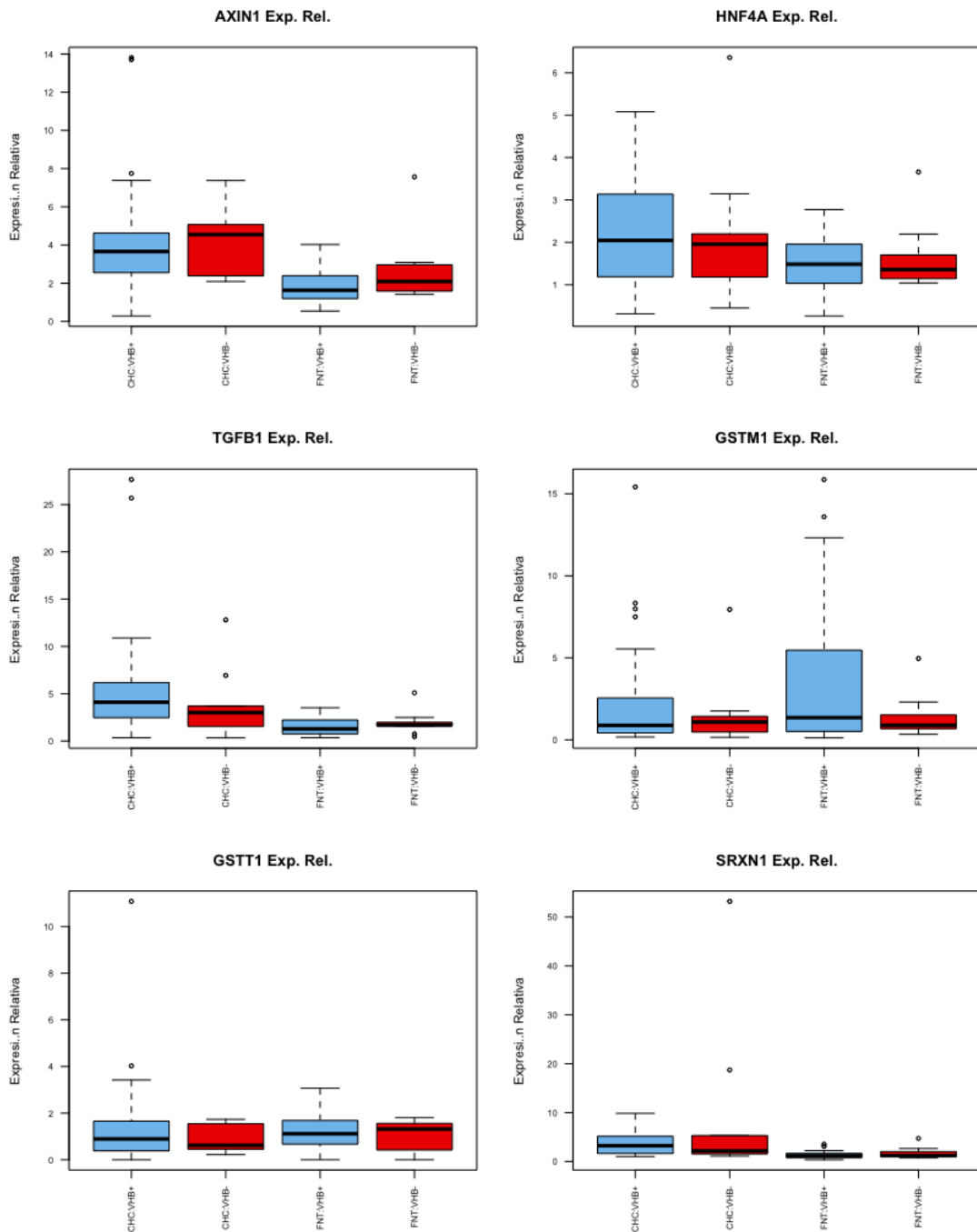


Figura 11S.6. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de respuesta al estrés oxidativo en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que regulan la activación de diferentes genes en el hígado (i.e. HNF4A) y genes que codifican proteínas antioxidantes (i.e. SRXN1, GSTM1, GSTT1) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

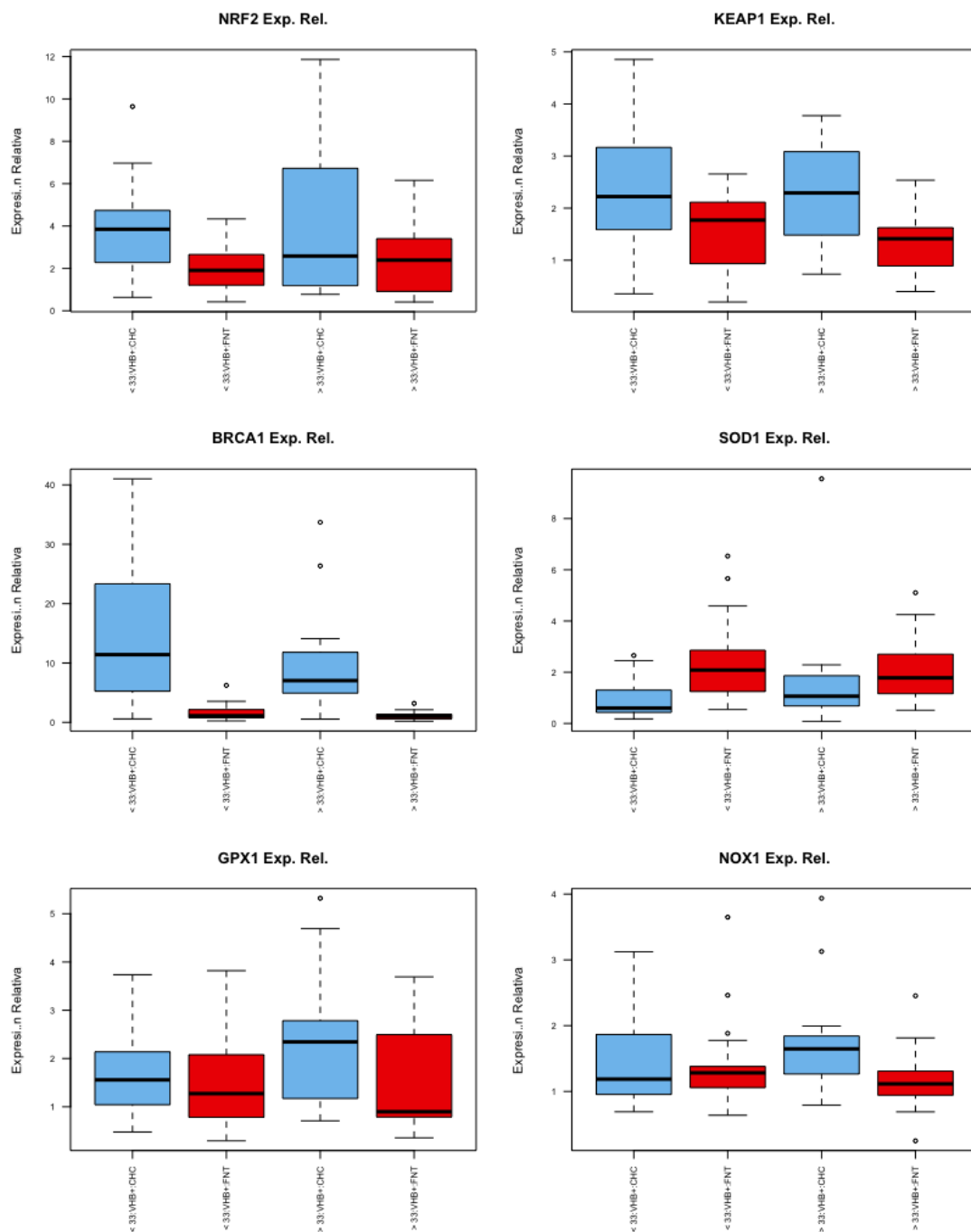


Figura 12S.1. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía NRF2 – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes (i.e. SOD1, GPX1) como respuesta a la activación de la vía, así como activadores (i.e. BRCA1) y represores (KEAP1); además del gen que codifica la proteína efectora de esta vía (NRF2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y por Edad.

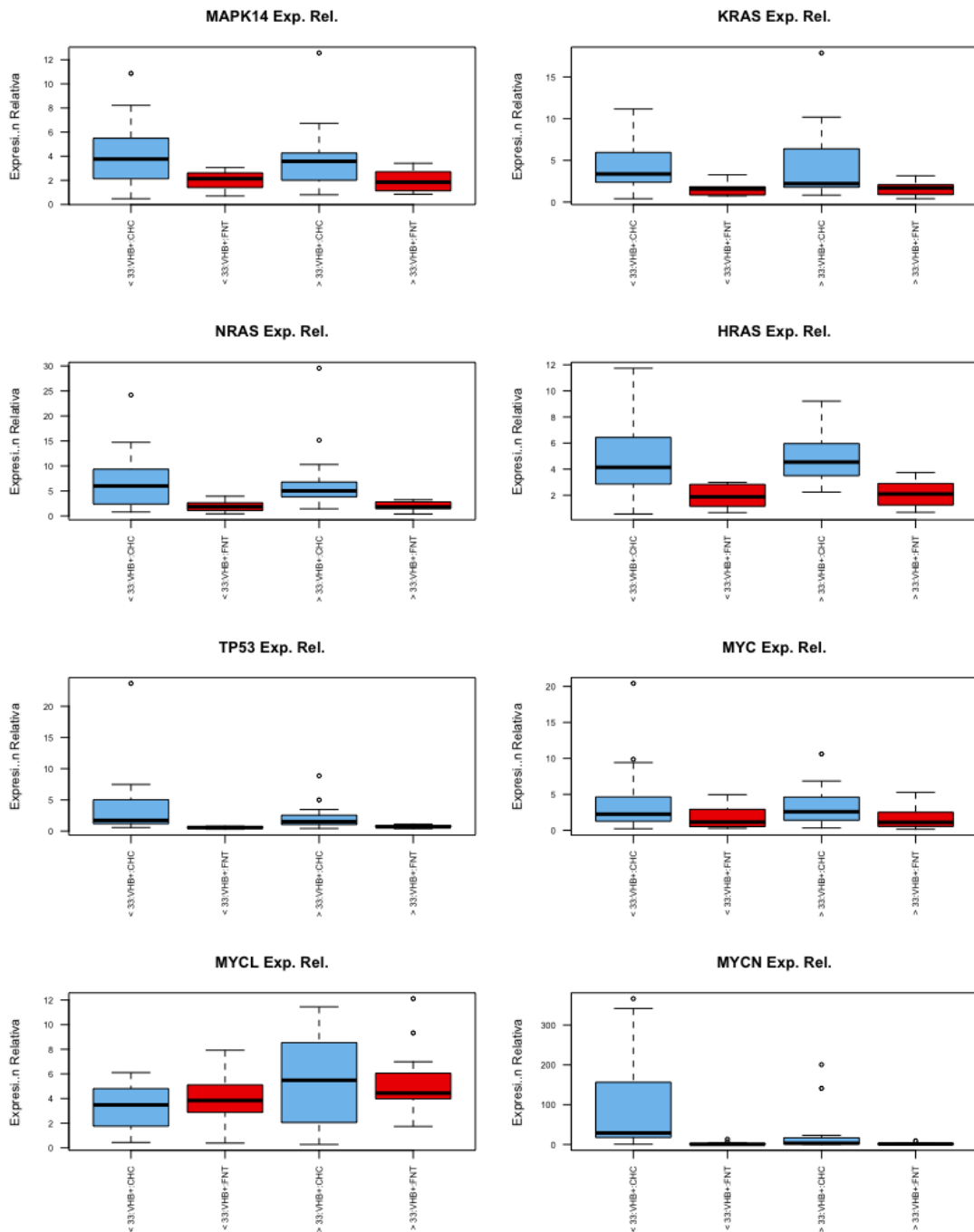


Figura 12S.2. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía p38 α – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (p38 α) y algunos de los genes que son transcritos como resultado de la activación de esta vía (i.e. MYC, MYCN, MYCL y TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y por Edad.

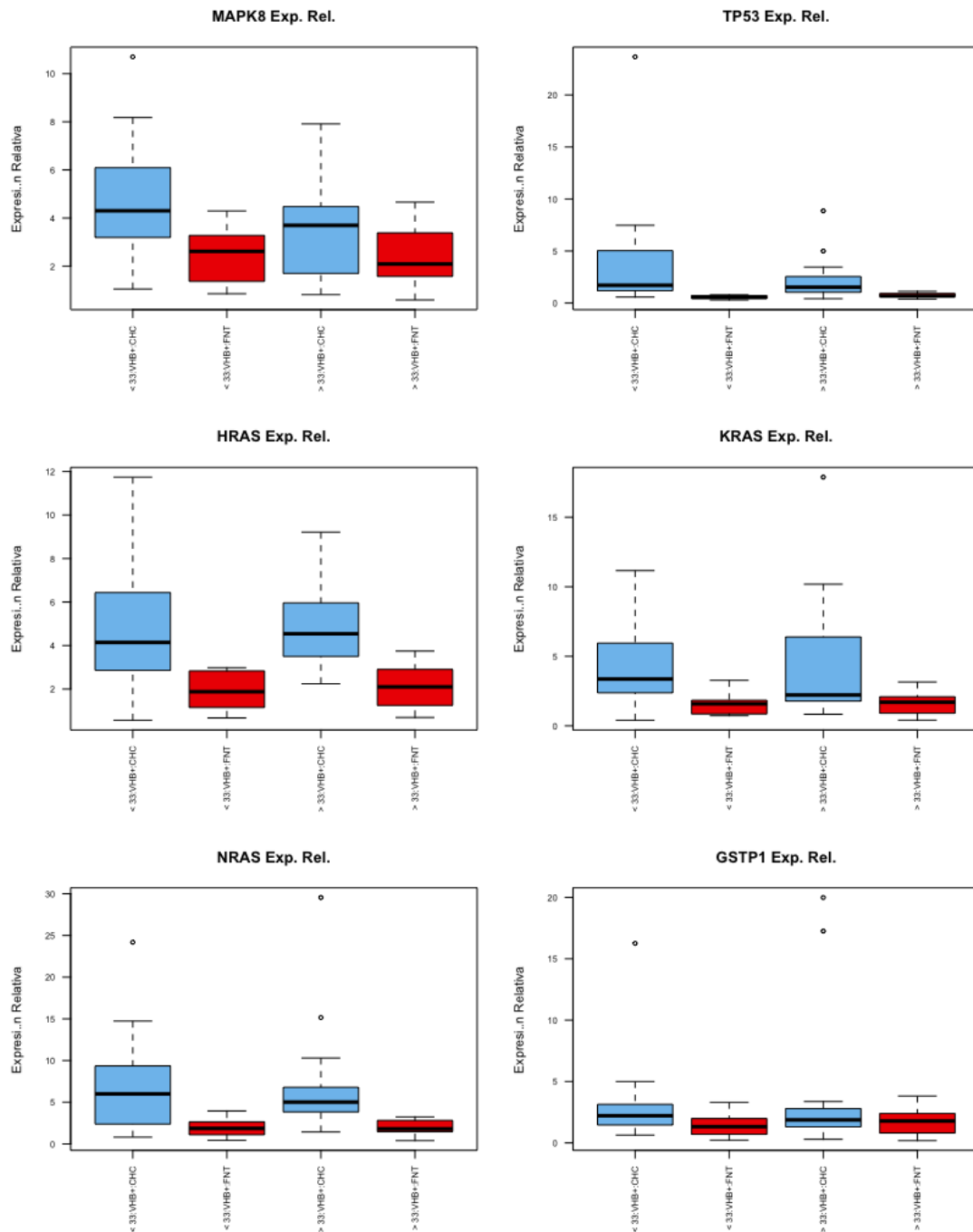


Figura 12S.3. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía JNK – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (MAPK8) y algunos de los genes que son transcritos como resultado de la activación de esta vía (i.e. TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y por Edad.

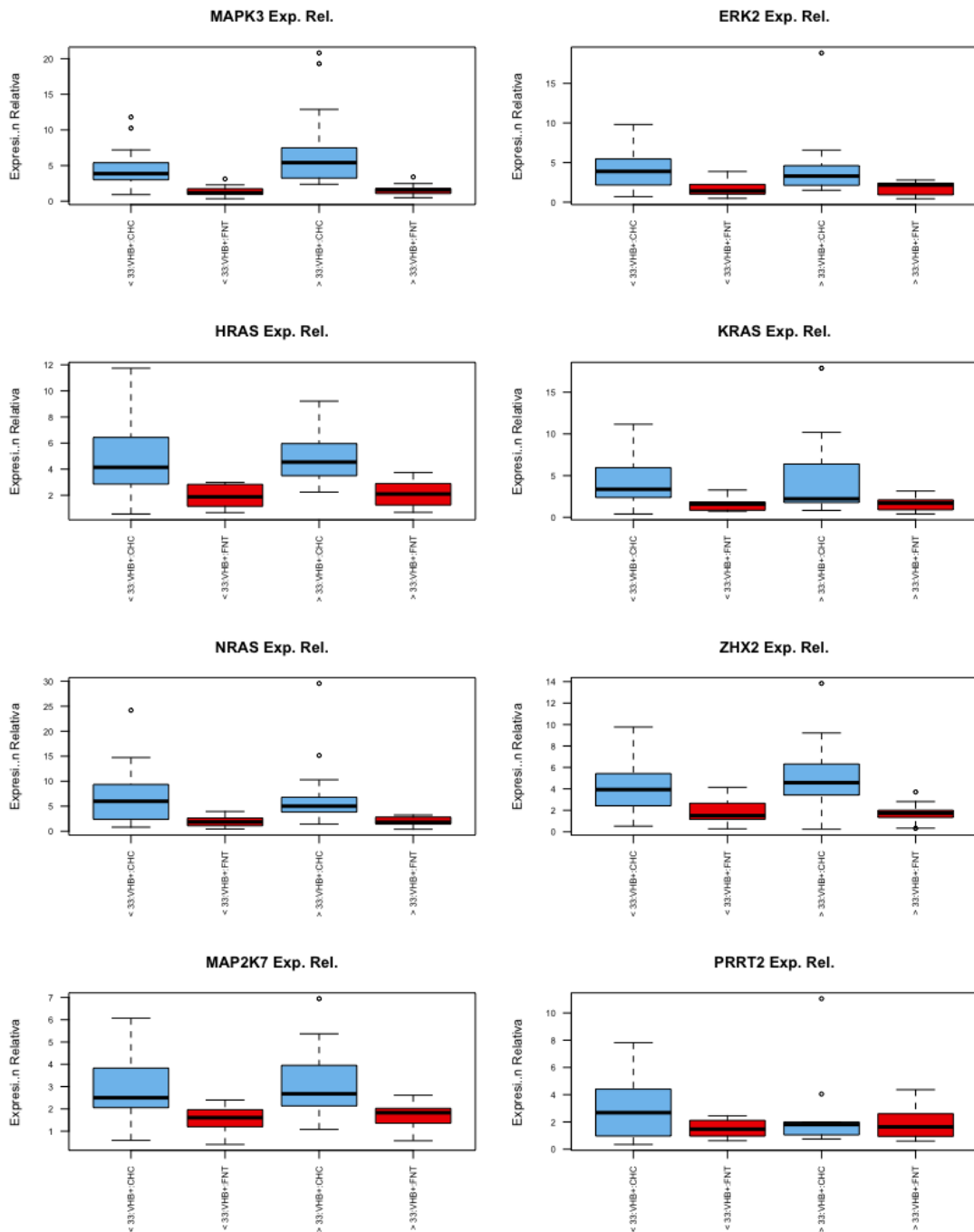


Figura 12S.4. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía ERK1/2 – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que forman parte de la cascada de activación de la vía (i.e. K/H/N-RAS, MAP2K7, PRRT2, RAF), el gen que codifica la proteína efectora de esta vía (MAPK3/ERK2) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y por Edad.

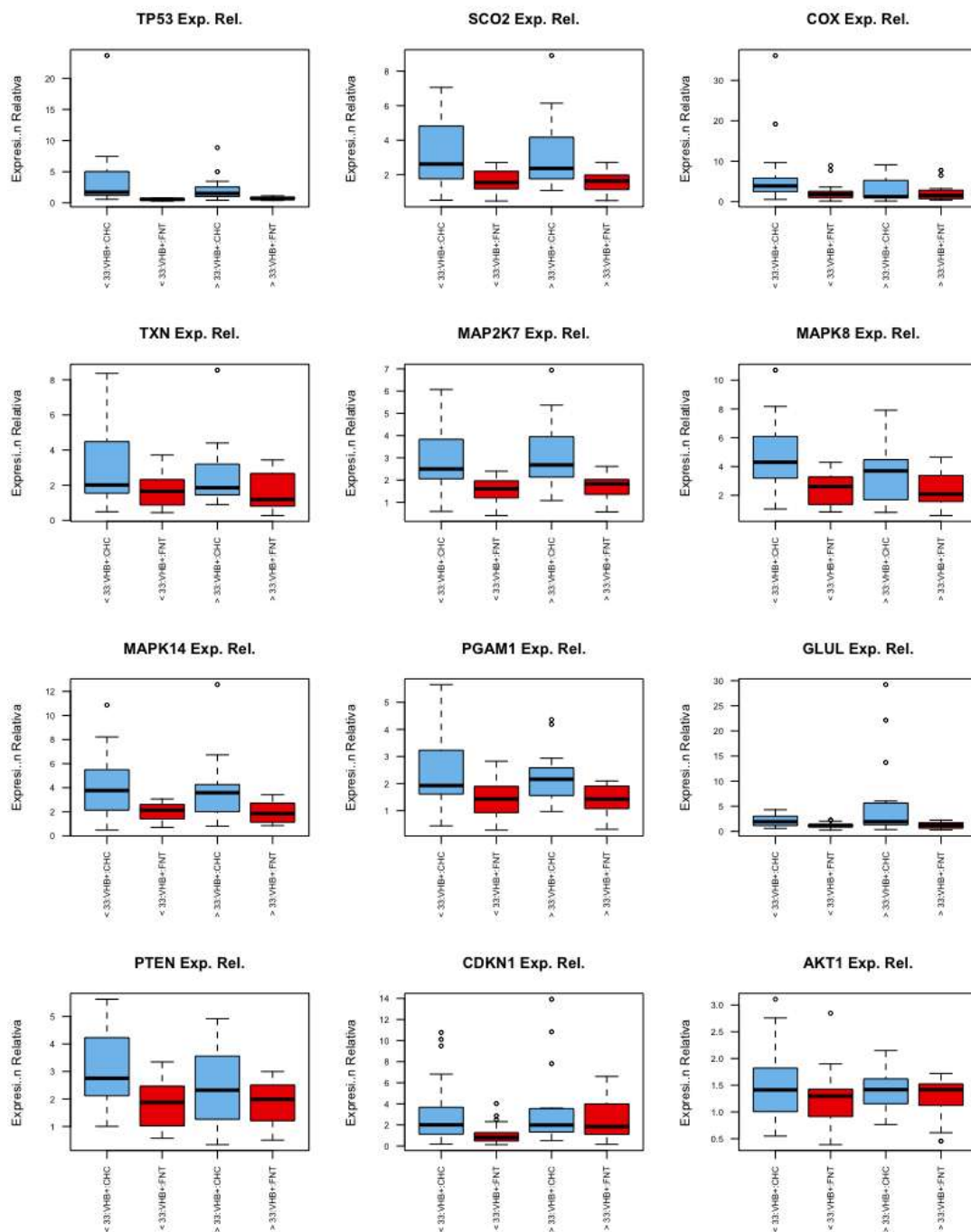


Figura 12S.5. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía p53 – respuesta al estrés oxidativo – en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que son activados como resultado de la activación de la proteína efectora de esta vía (TP53) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y por Edad.

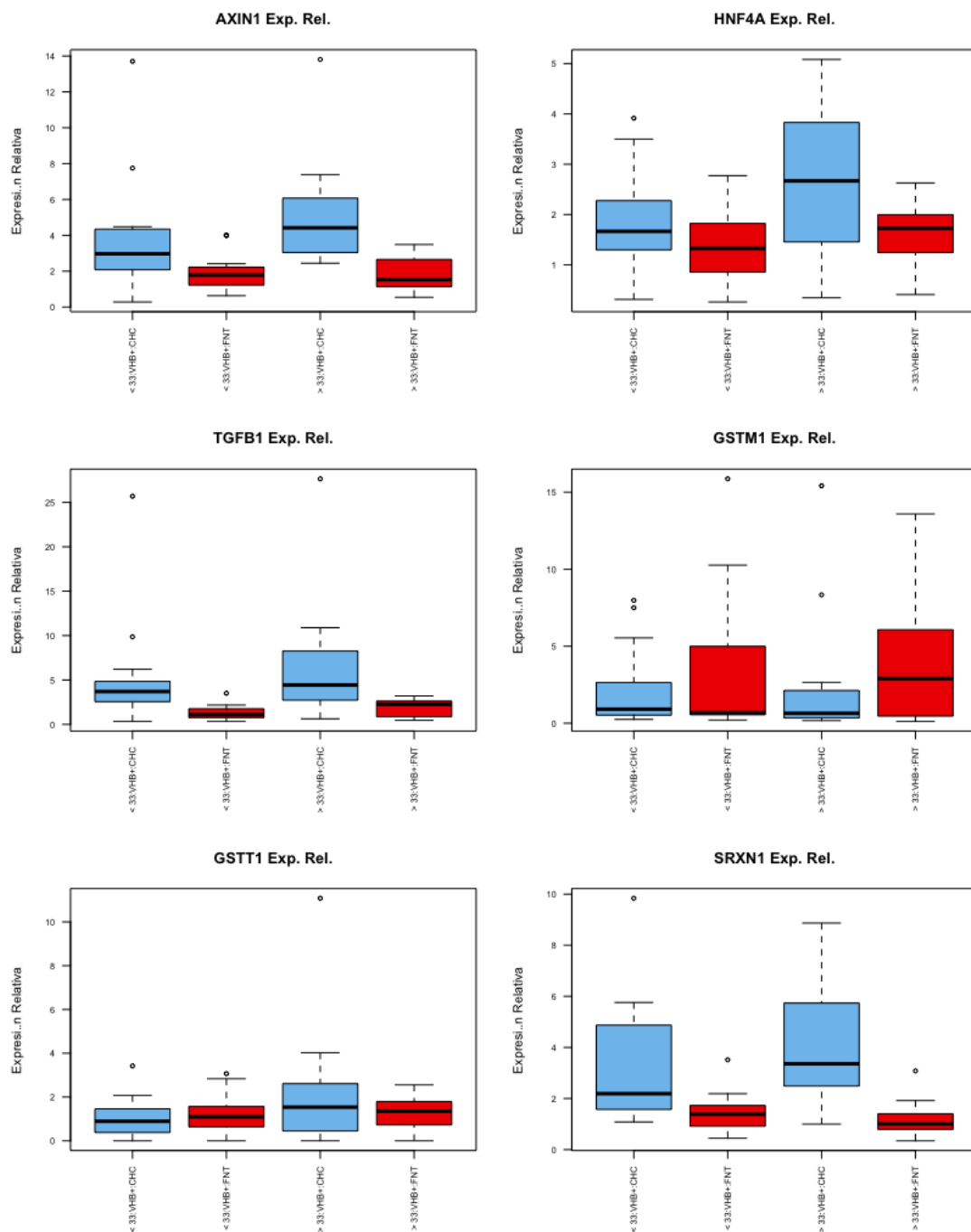


Figura 12S.6. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la vía de respuesta al estrés oxidativo en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados en joven y viejo. Se ha evaluado la expresión de genes que codifican proteínas que regulan la activación de diferentes genes en el hígado (i.e. HNF4A) y genes que codifican proteínas antioxidantes (i.e. SRXN1, GSTM1, GSTT1) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y por Edad.

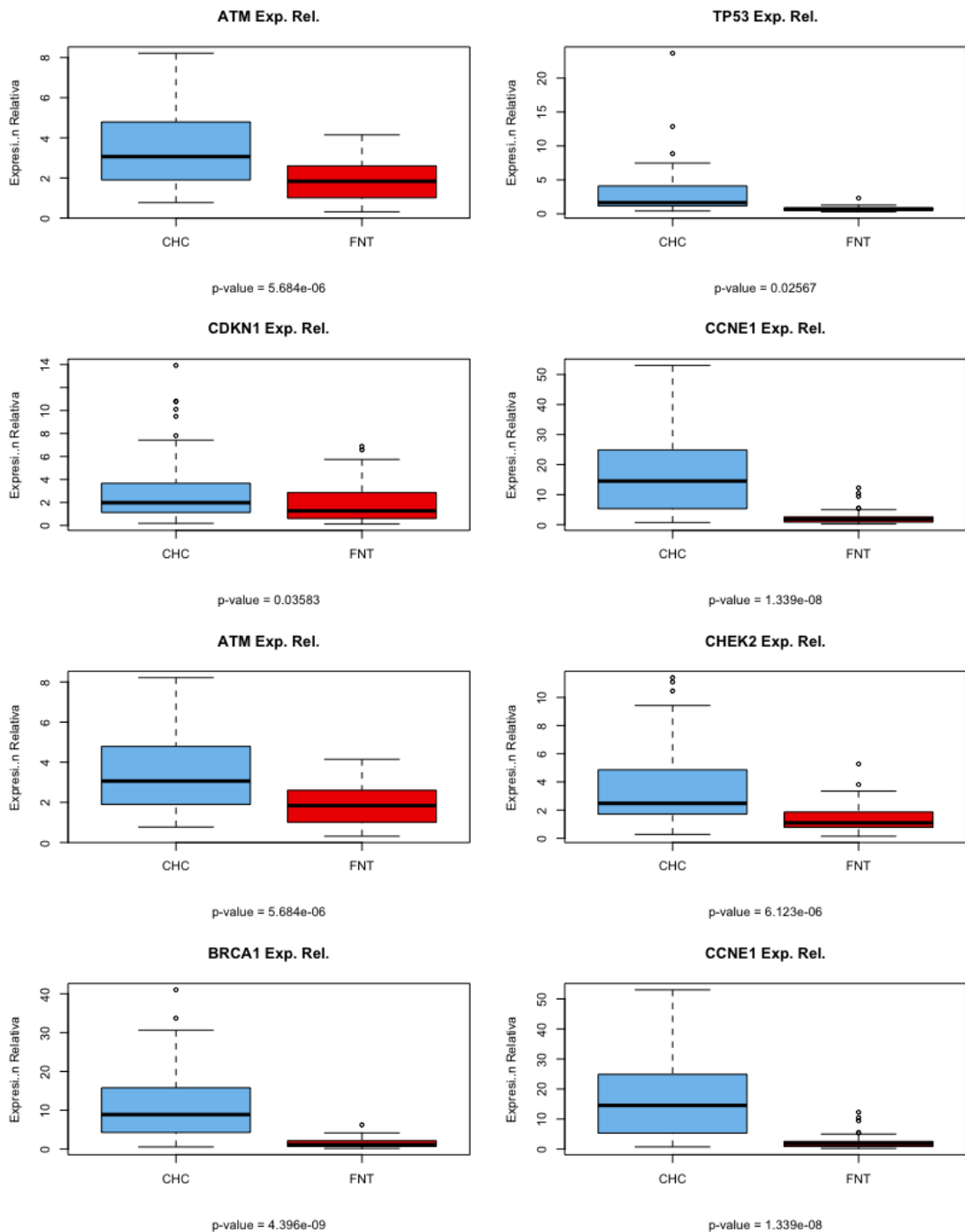


Figura 13S.1. Comparación de la expresión de genes que intervienen en los puntos de control del ciclo celular – reparación de ADN – en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la cascada de activación (i.e. ATM, TP53, P21, CHEK2 y BRCA1) y el gen que codifica la proteína efectora (CCNE1) de la Detención de la fase G1 y del retraso de la fase S del ciclo celular como respuesta al daño del ADN entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

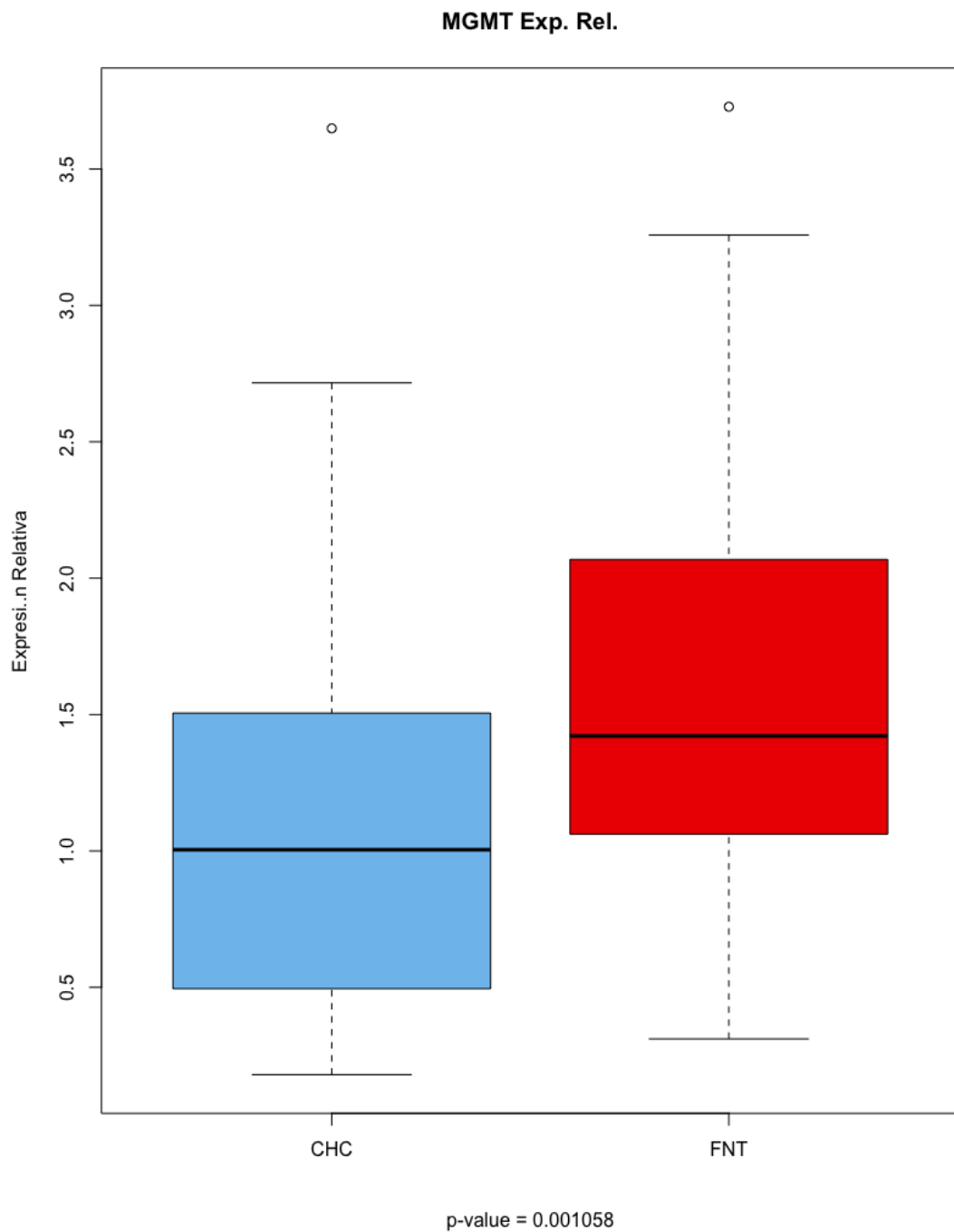


Figura 13S.2. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reversión directa – reparación de ADN – en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en el proceso de reversión directa para la reparación del ADN (i.e. MGMT) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

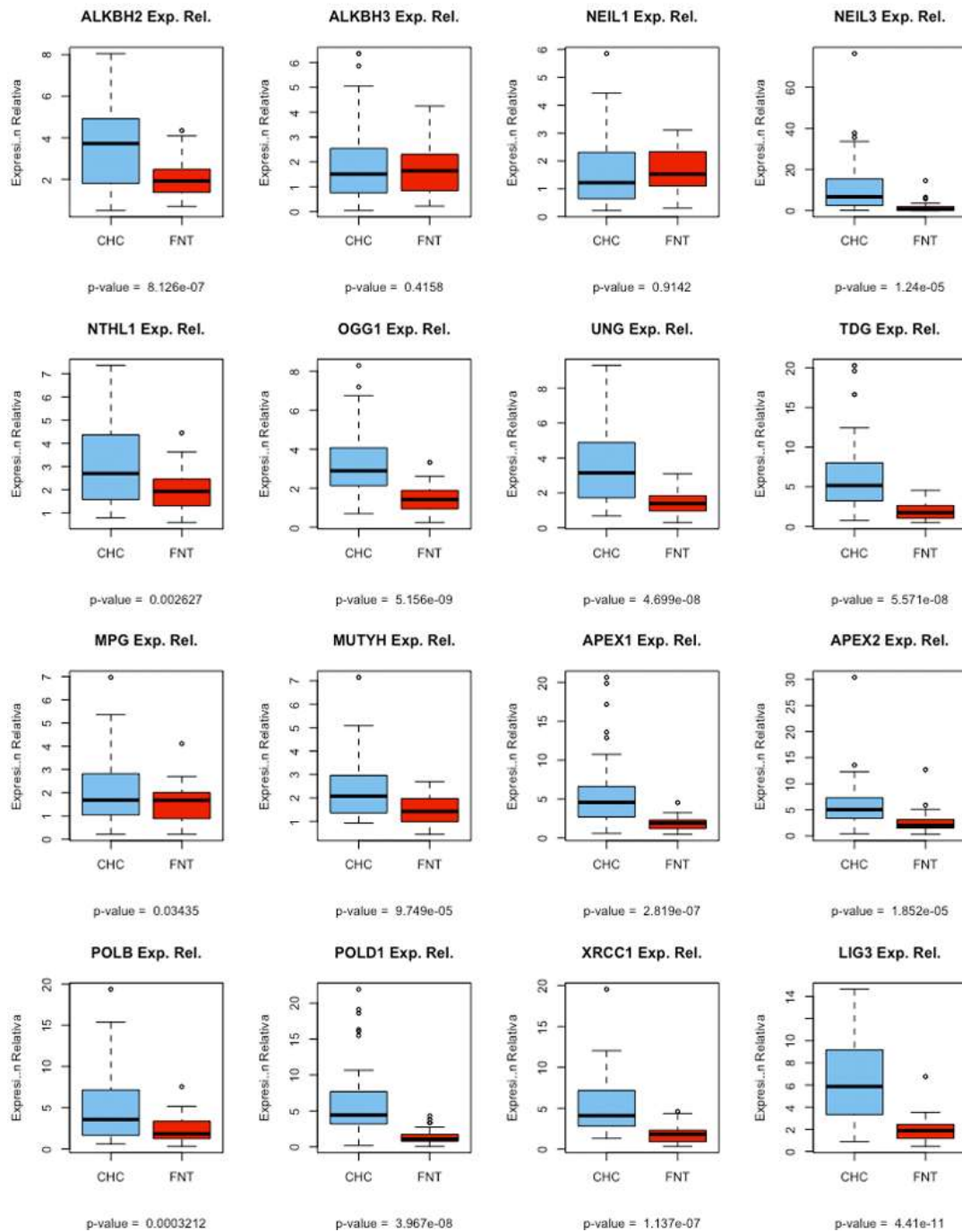


Figura 13S.3. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación por escisión de base del ADN en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en el reconocimiento y escisión de la base (i.e. APEX1, XRCC1, OGG, TDG, UND, etc.), en la iniciación de la resíntesis (i.e. POLD1 y POLB) y en el sellado de la nueva hebra (i.e. LIG3) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

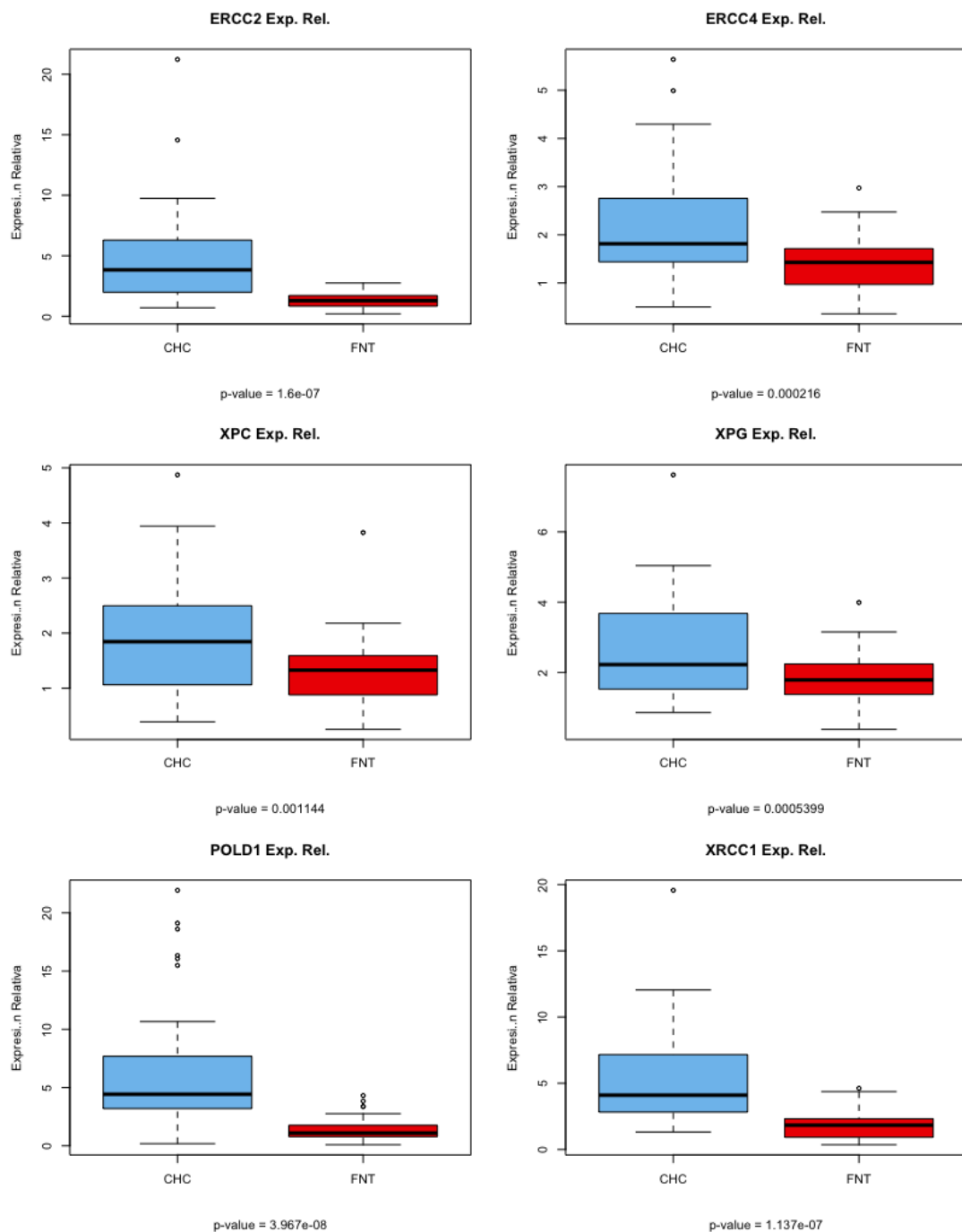


Figura 13S.4. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación del ADN por escisión de nucleótidos en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en el reconocimiento y escisión de la base (i.e. XPC, XPG, ERCC2, ERCC1, ERCC4), en la iniciación de la re-síntesis (i.e. POLD1) y en el sellado de la nueva hebra (i.e. LIG3) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

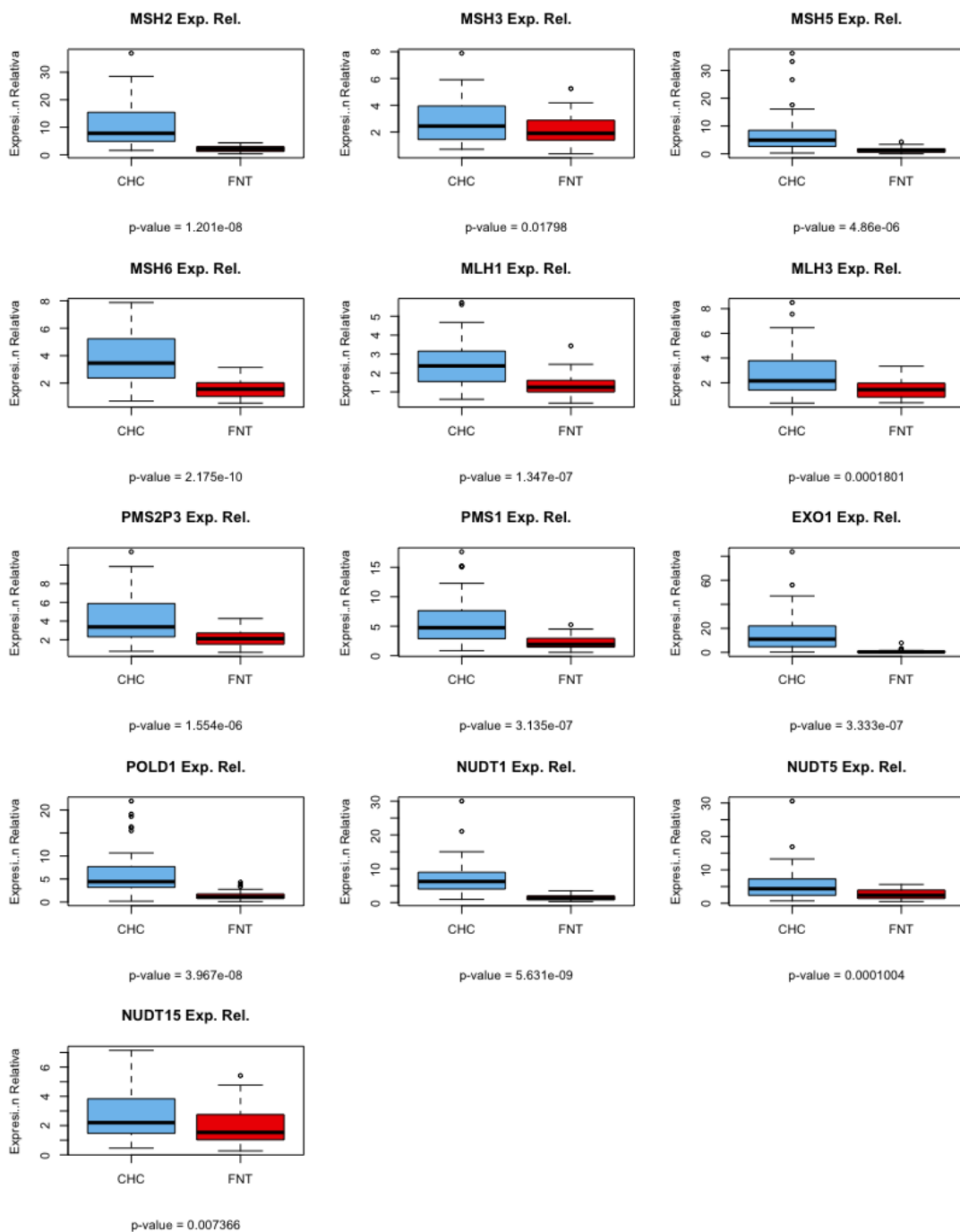


Figura 13S.5. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación del no-emparejamiento del ADN en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en el reconocimiento de la región no-emparejada (i.e. MSH2/3/5/6), el reconocimiento de la hebra parental (i.e. MLH1/3, PMS2P3 y PMS1), en la iniciación de la re-síntesis (i.e. POLD1) y en el sellado de la nueva hebra (i.e. LIG3). Además, se han evaluado genes que codifican proteína que previenen este no-emparejamiento del ADN (i.e. NUDT1/5/15) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

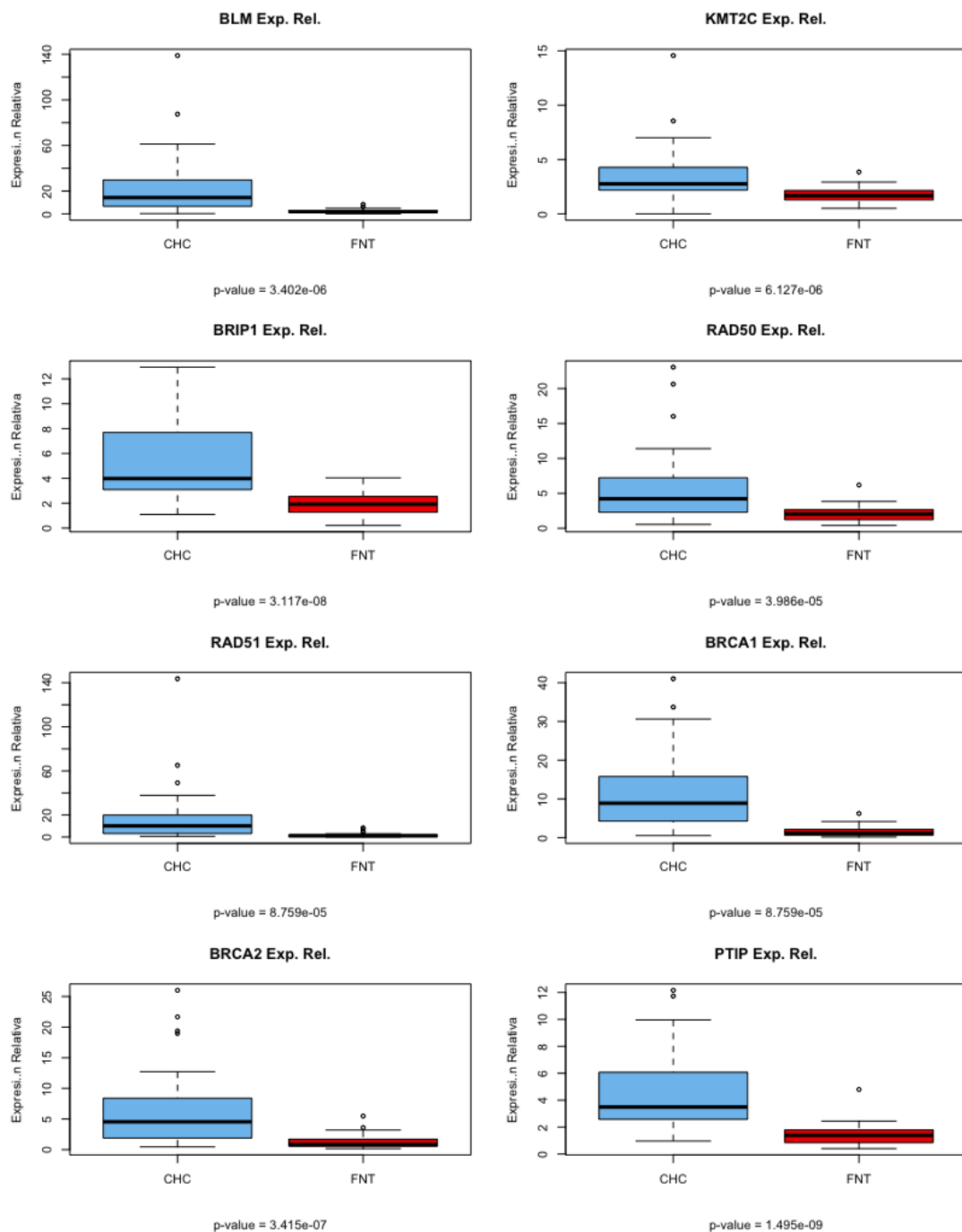


Figura 13S.6. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación de la ruptura de doble hebra del ADN en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reparación por recombinación homóloga (i.e. BLM, KMT2C, PTIP, RAD51, RAD 50, etc.) y por unión de terminaciones no-homologas (RAD50) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

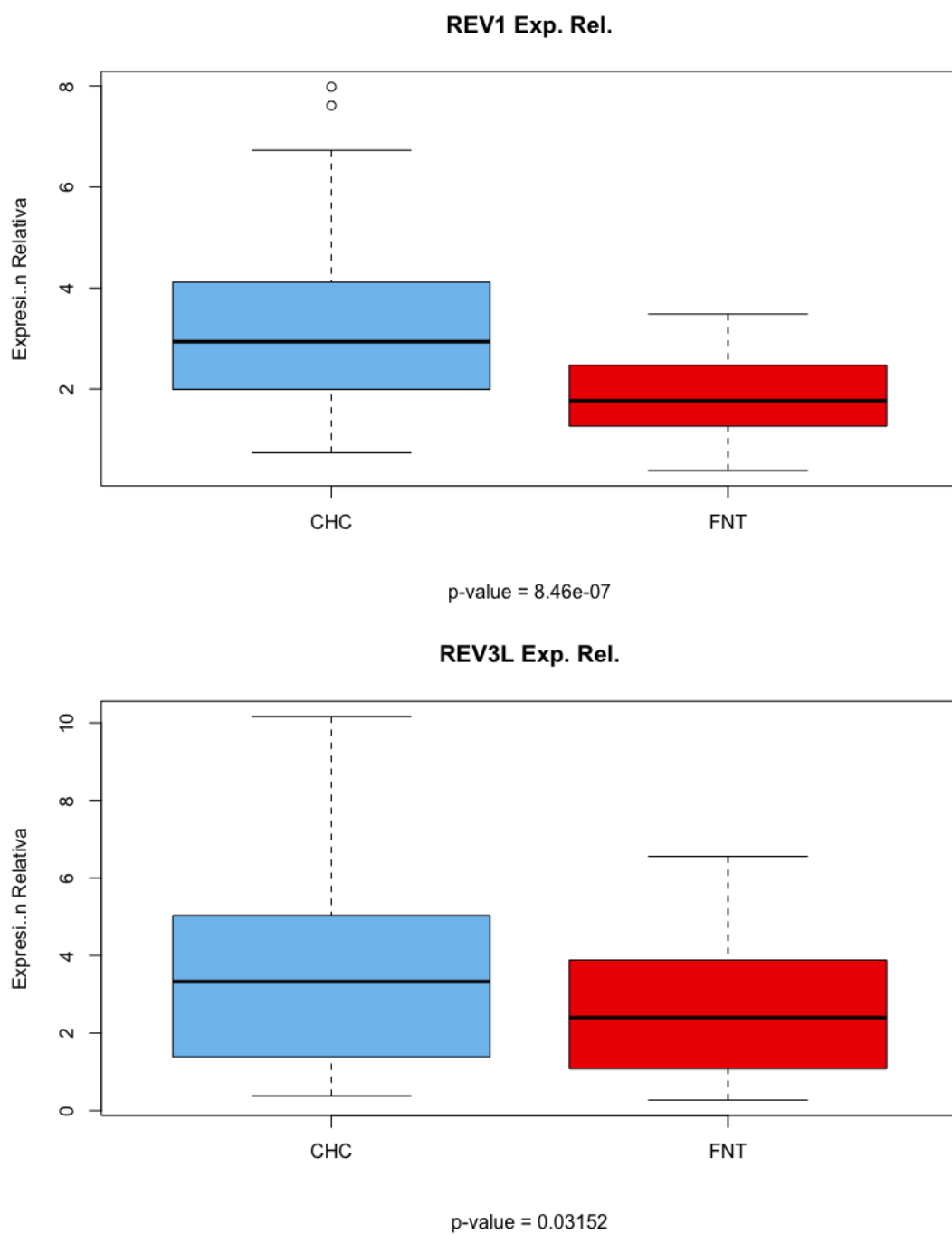


Figura 13S.7. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación por la síntesis trans-lesión del ADN en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reparación por la síntesis trans-lesión del ADN entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT).

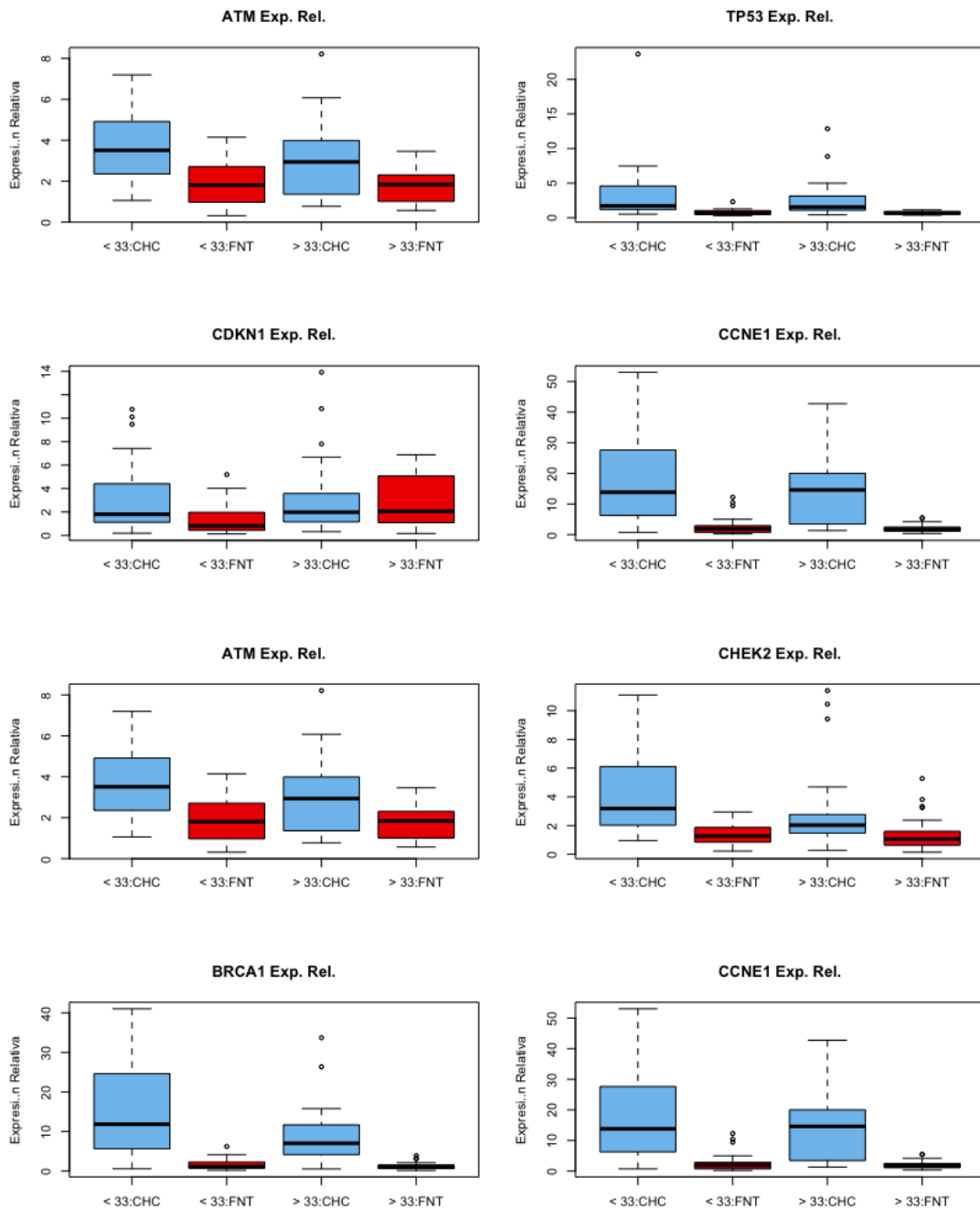


Figura 14S.1. Comparación de la expresión de genes que intervienen en los puntos de control del ciclo celular – reparación de ADN – en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la cascada de activación (i.e. ATM, TP53, P21, CHEK2 y BRCA1) y el gen que codifica la proteína efectora (CCNE1) de la (A) Detención de la fase G1 y (B) del retraso de la fase S del ciclo celular como respuesta al daño del ADN entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

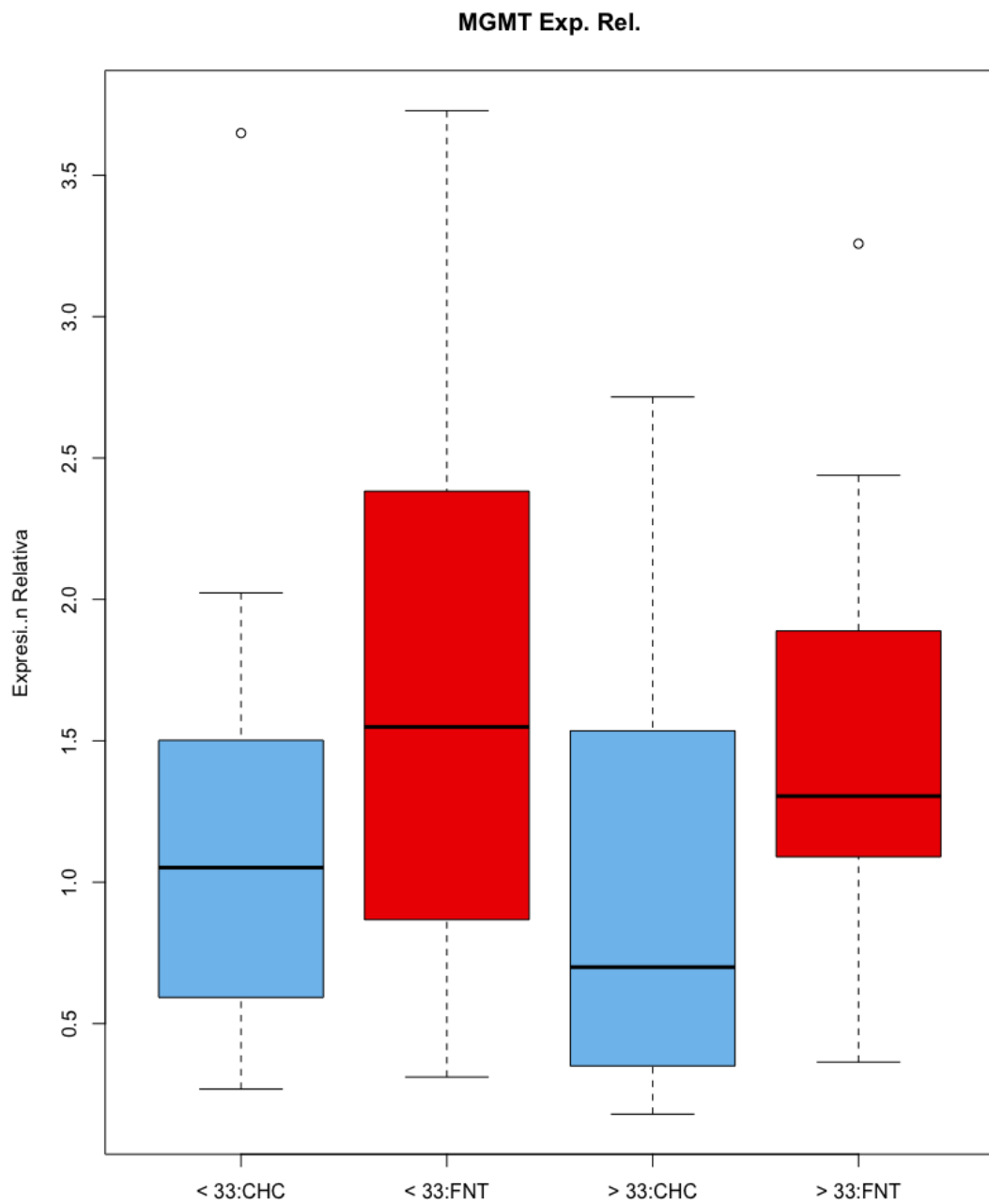


Figura 14S.2. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reversión directa – reparación de ADN – en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en el proceso de reversión directa para la reparación del ADN y (i.e. MGMT) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

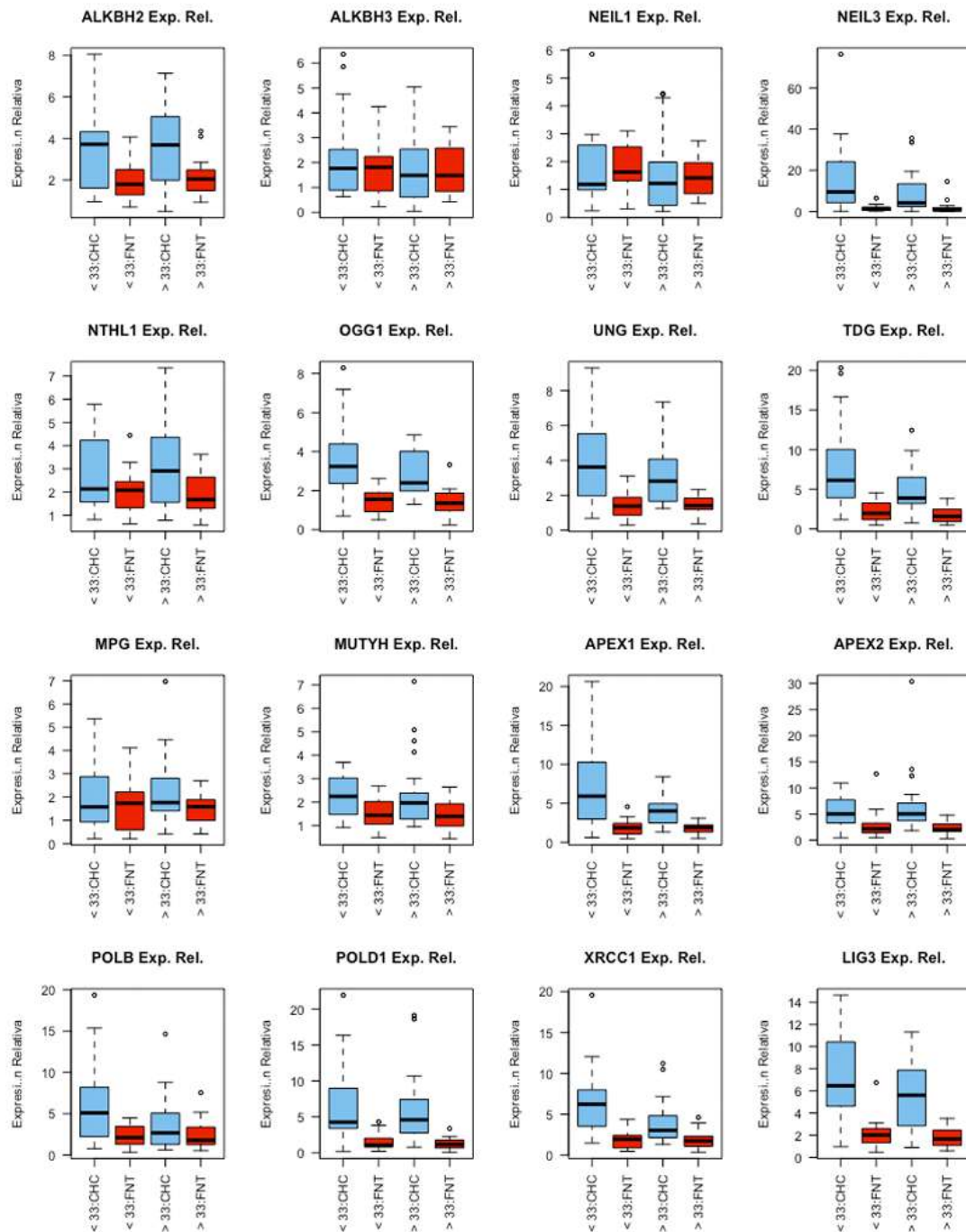


Figura 14S.3. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación por escisión de base del ADN en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en el reconocimiento y escisión de la base (i.e. APEX1, XRCC1, OGG, TDG, UND, etc.), en la iniciación de la re-síntesis (i.e. POLD1 y POLB) y en el sellado de la nueva hebra (i.e. LIG3) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

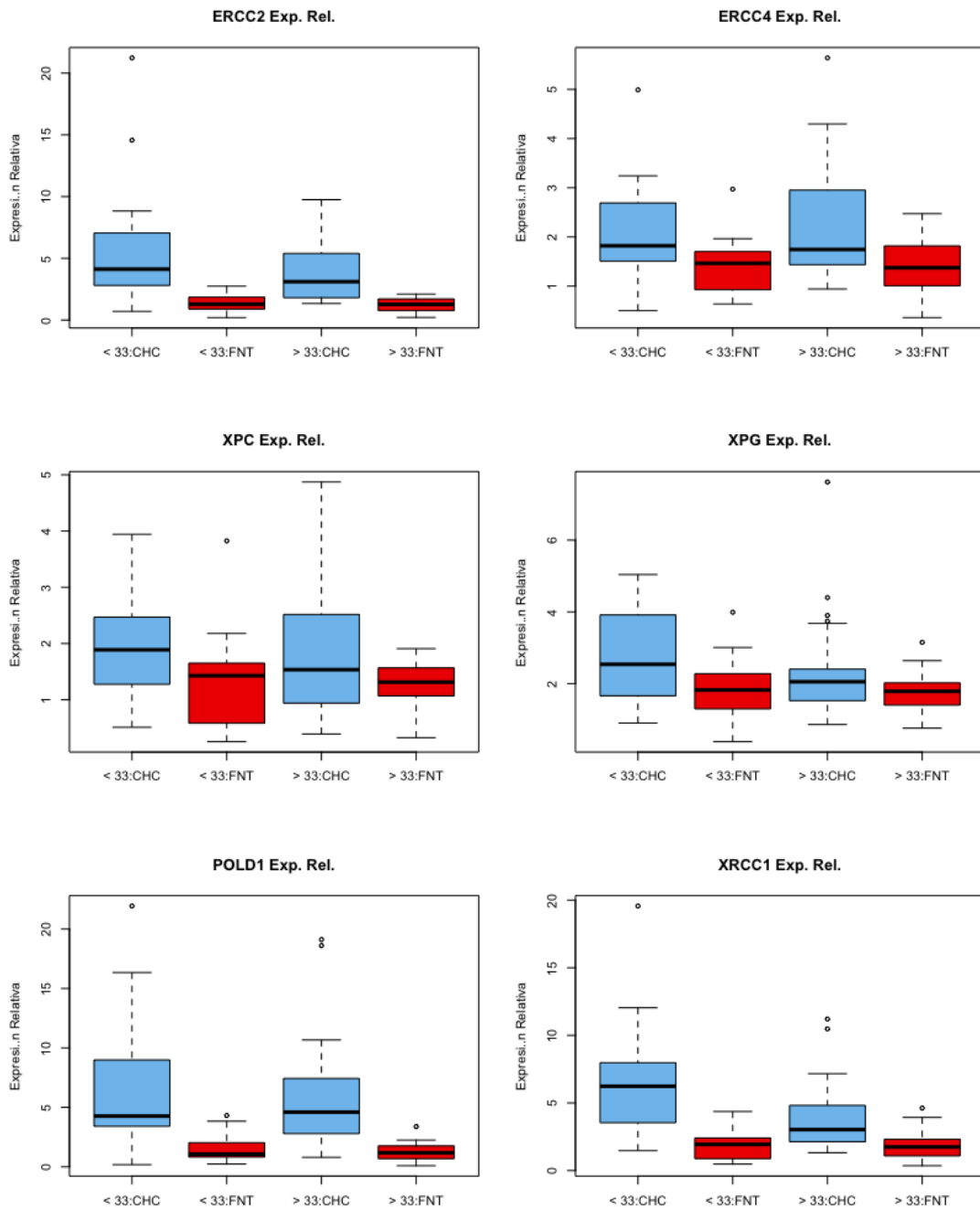


Figura 14S.4. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación del ADN por escisión de nucleótidos en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en el reconocimiento y escisión de la base (i.e. XPC, XPG, ERCC2, ERCC1, ERCC4), en la iniciación de la re-síntesis (i.e. POLD1) y en el sellado de la nueva hebra (i.e. LIG3) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

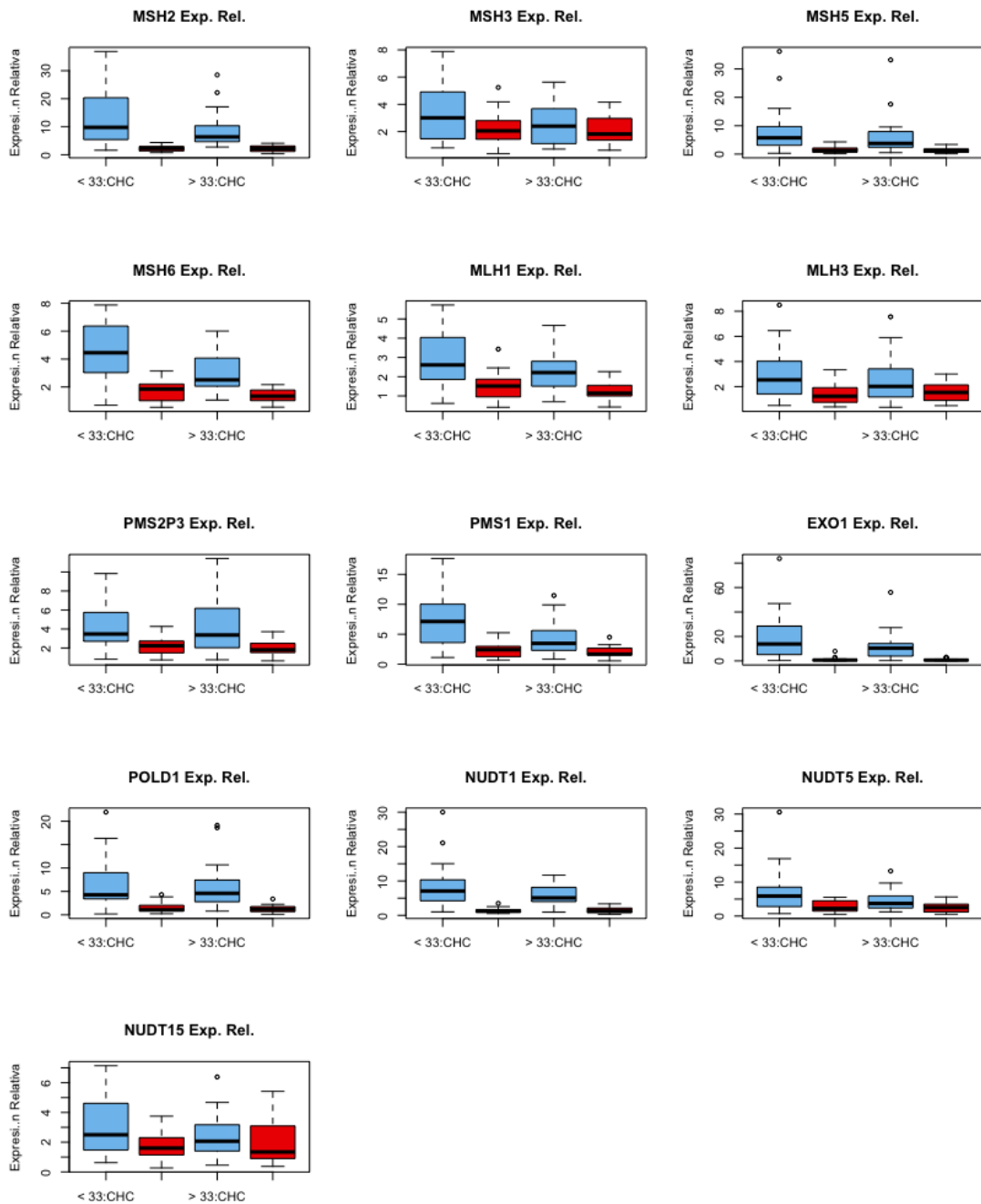


Figura 14S.5. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación del no-emparejamiento del ADN en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en el reconocimiento de la región no-emparejada (i.e. MSH2/3/5/6), el reconocimiento de la hebra parental (i.e. MLH1/3, PMS2P3 y PMS1), en la iniciación de la re-síntesis (i.e. POLD1) y en el sellado de la nueva hebra (i.e. LIG3). Además, se han evaluado genes que codifican proteína que previenen este no-emparejamiento del ADN (i.e. NUDT1/5/15) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

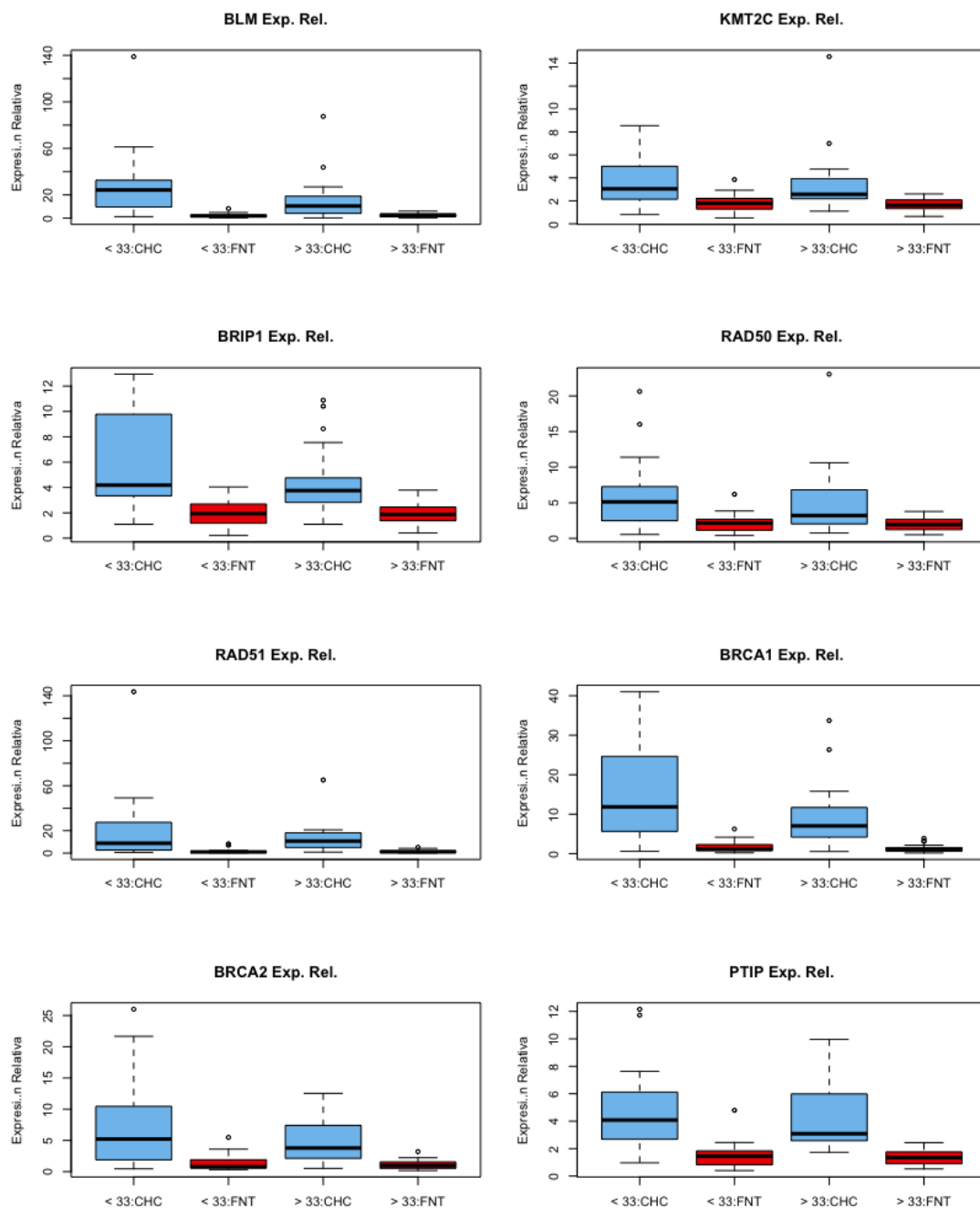


Figura 14S.6. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación de la ruptura de doble hebra en el ADN de tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reparación por recombinación homóloga (i.e. BLM, KMT2C, PTIP, RAD51, RAD 50, etc.) y por unión de terminaciones no-homologas (RAD50) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

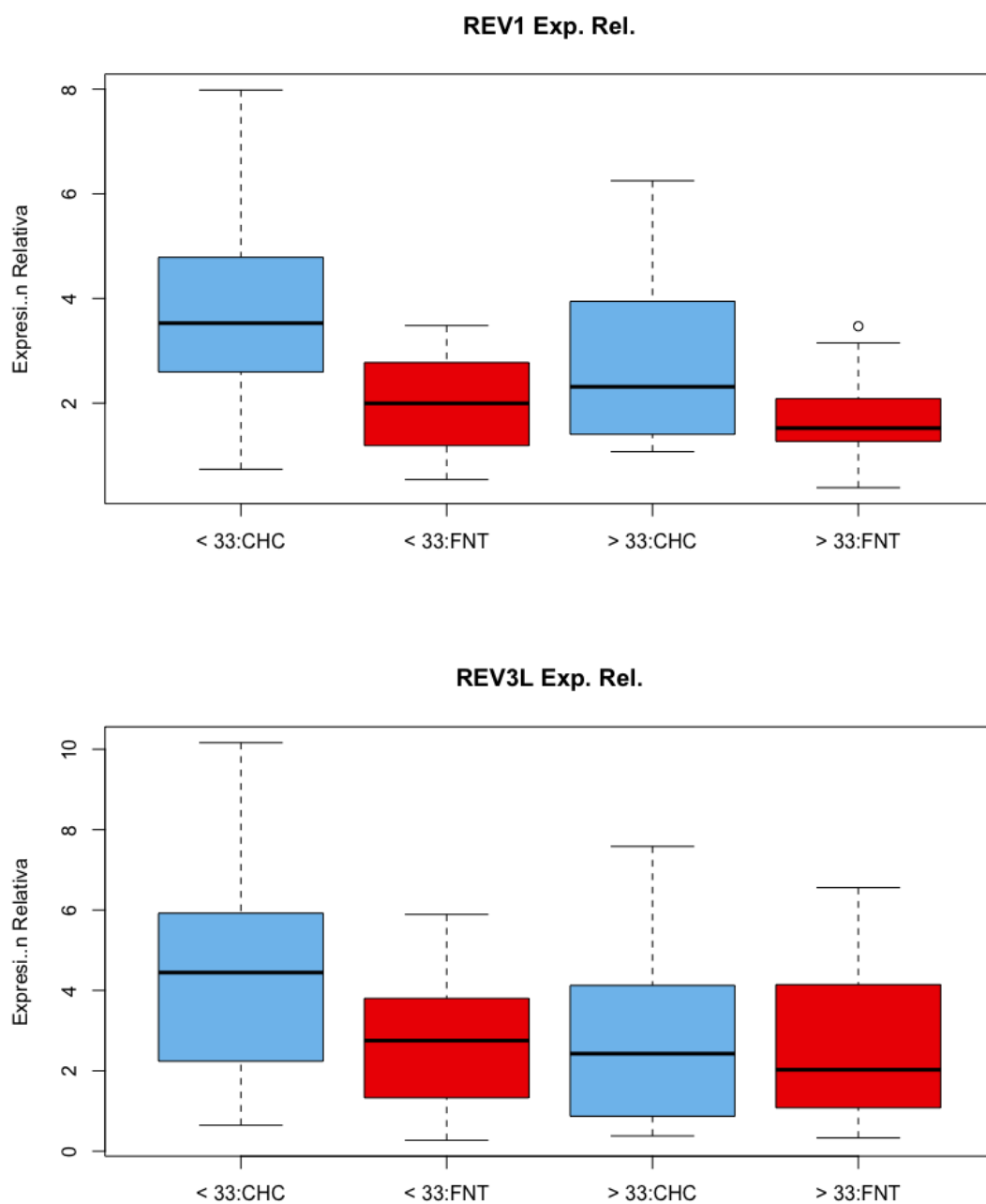


Figura 14S.7. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación por la síntesis trans-lesión en el ADN de tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reparación por la síntesis trans-lesión del ADN entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad.

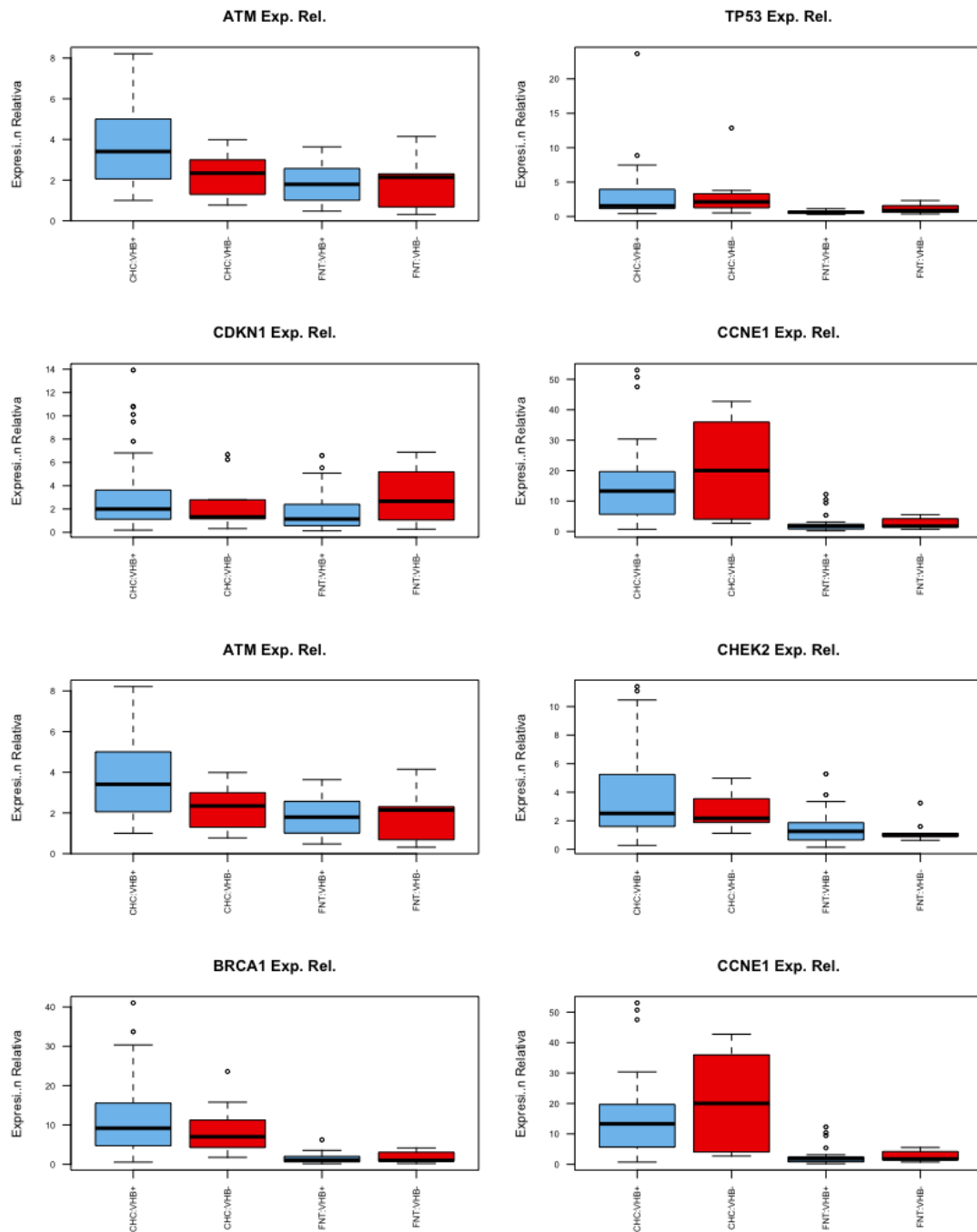


Figura 15S.1. Comparación de la expresión de genes que intervienen en los puntos de control del ciclo celular – reparación de ADN – en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la cascada de activación (i.e. ATM, TP53, P21, CHEK2 y BRCA1) y el gen que codifica la proteína efectora (CCNE1) de la Detención de la fase G1 y del retraso de la fase S del ciclo celular como respuesta al daño del ADN entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

MGMT Exp. Rel.

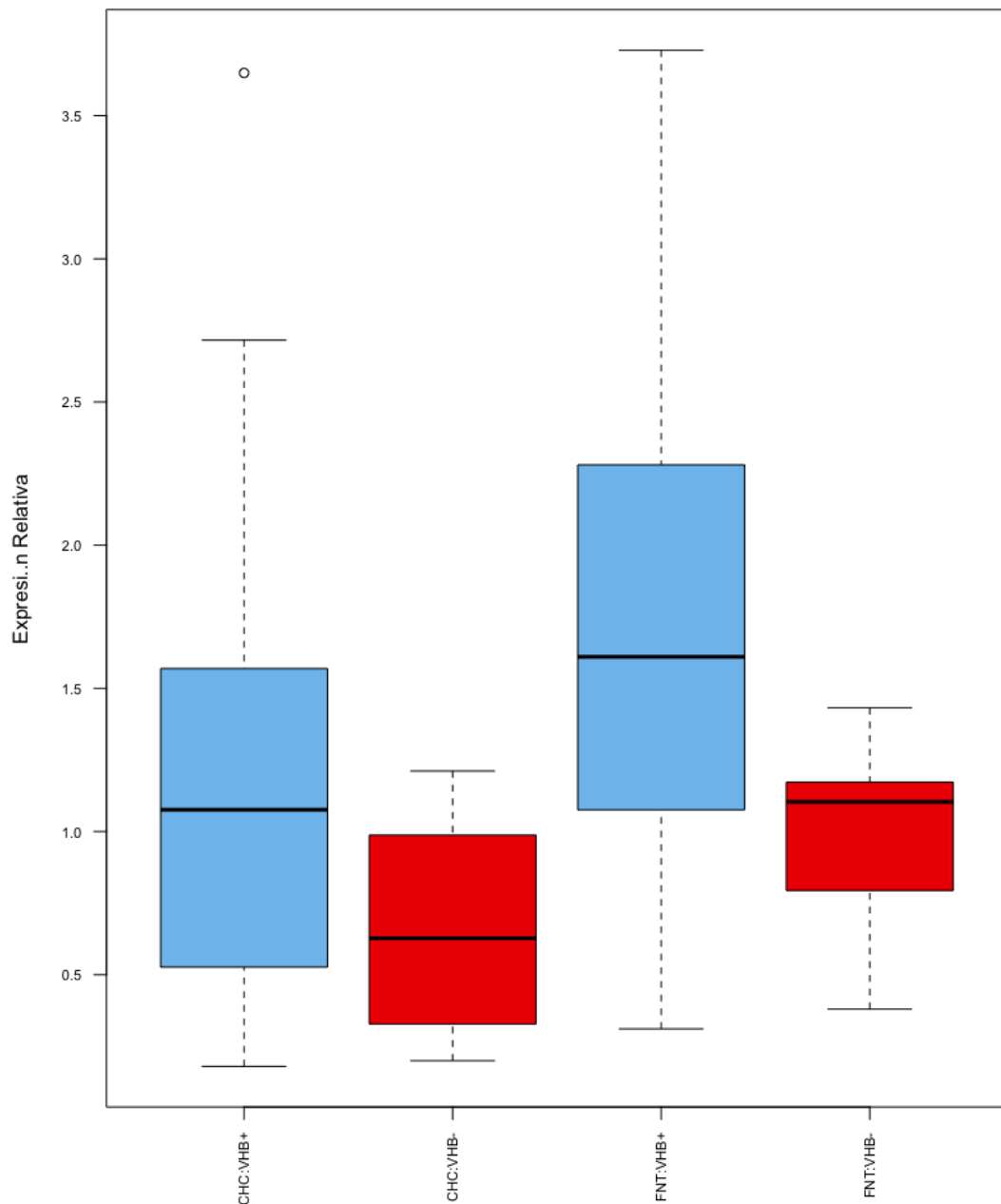


Figura 15S.2. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reversión directa – reparación de ADN – en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en el proceso de reversión directa para la reparación del ADN (i.e. MGMT) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

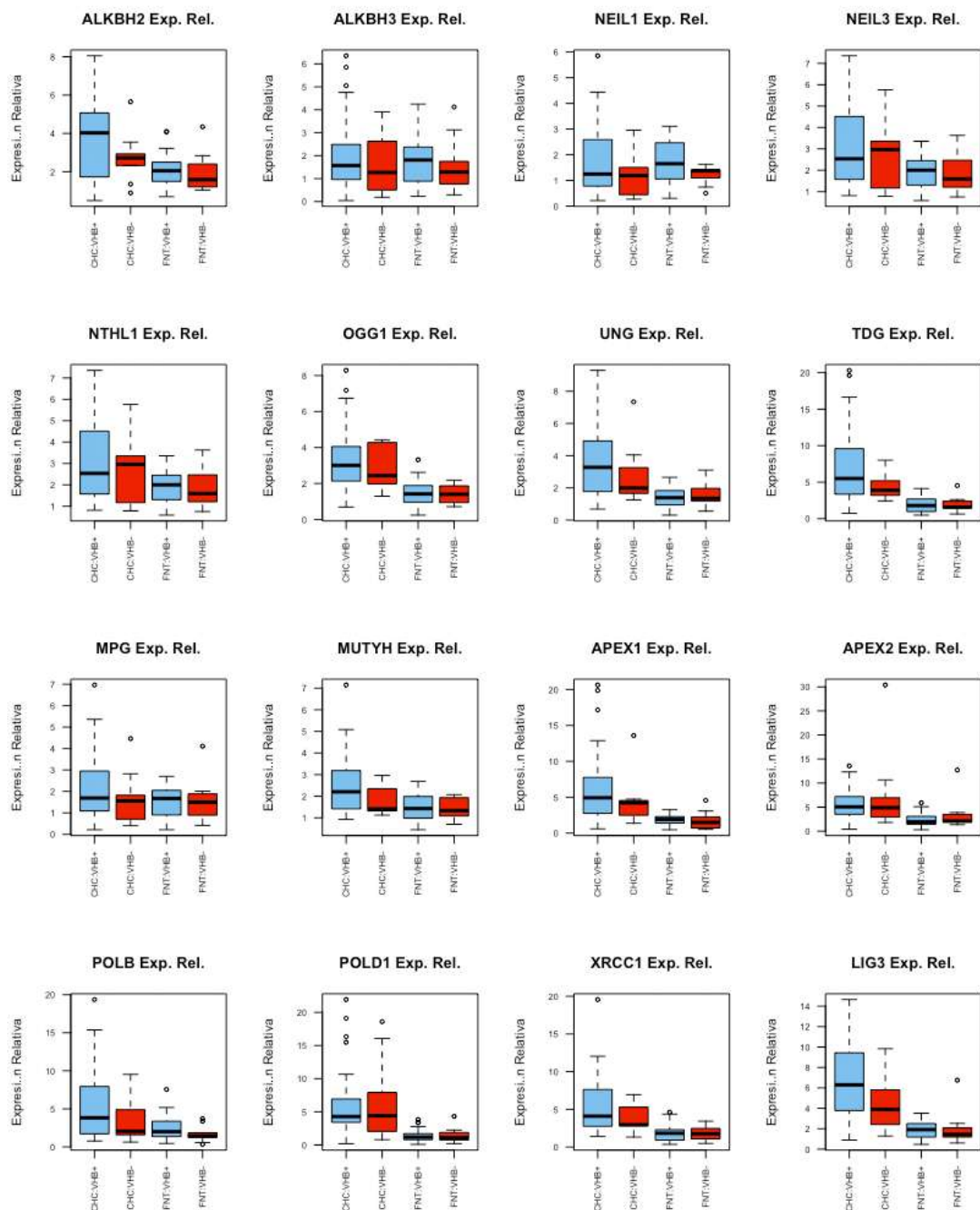


Figura 15S.3. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación por escisión de base del ADN en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en reparación del ADN por escisión de base entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

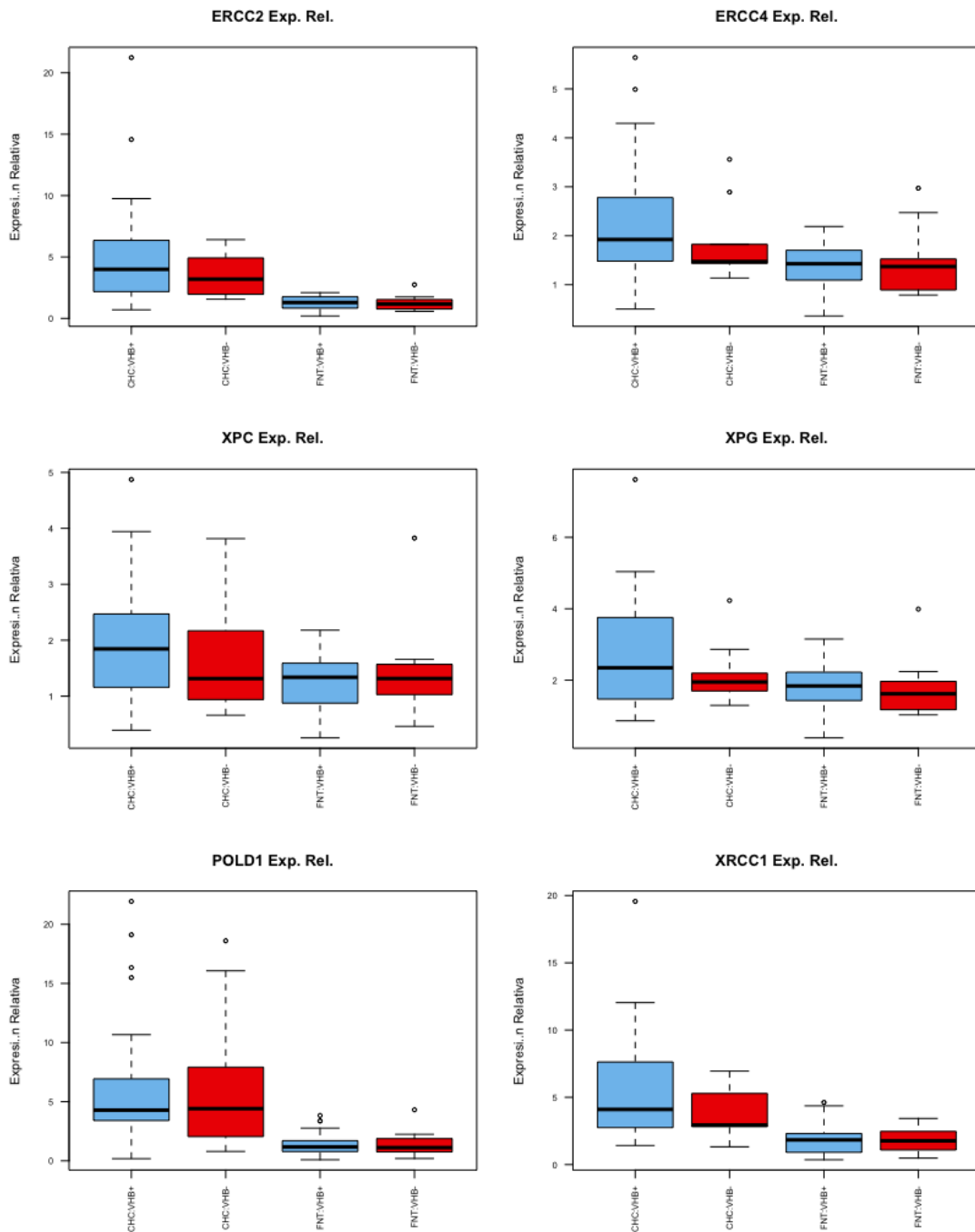


Figura 15S.4. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación del ADN por escisión de nucleótidos en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reparación del ADN por escisión de nucleótido entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

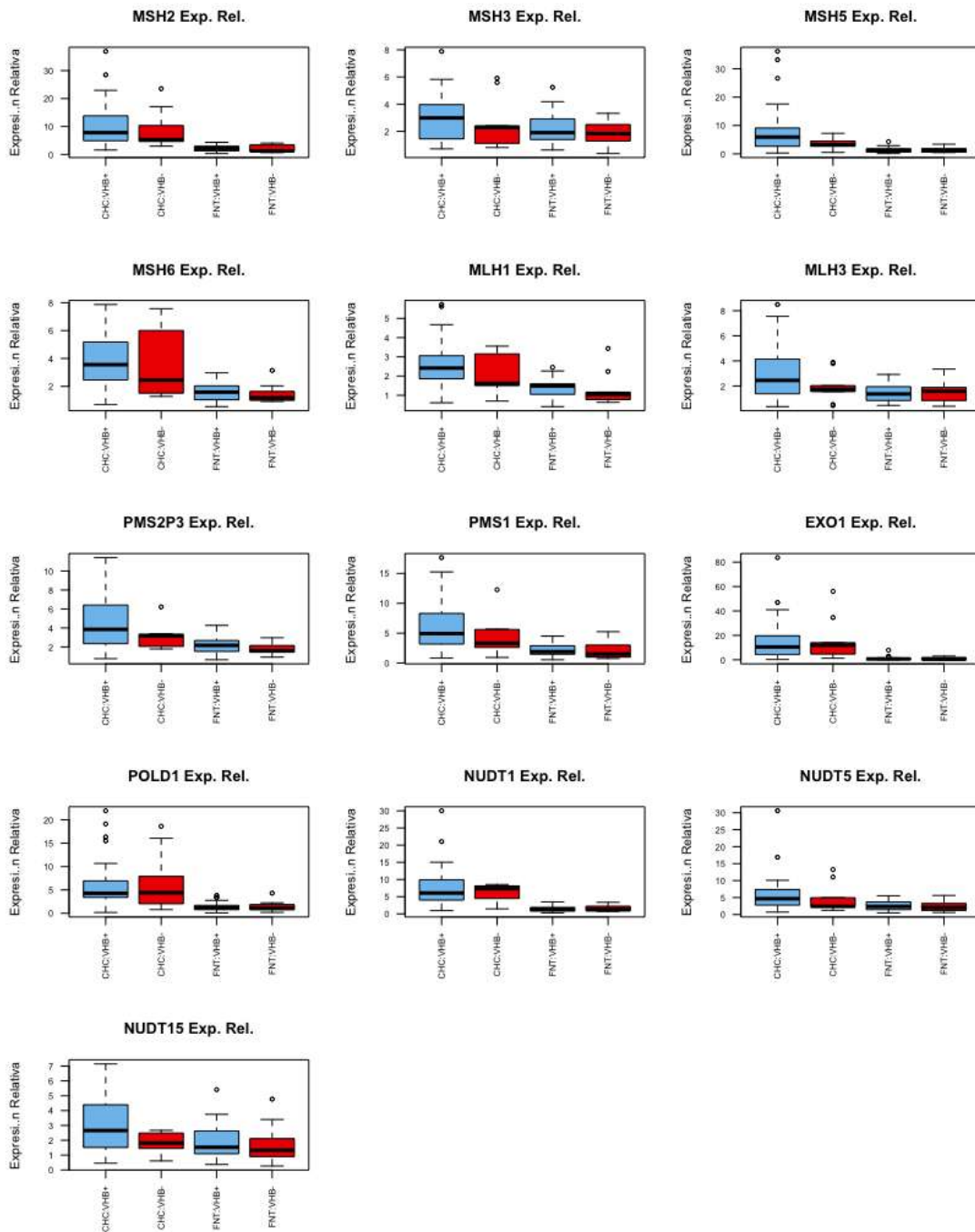


Figura 15S.5. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación del no-emparejamiento del ADN por escisión de nucleótidos en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en el reconocimiento de la región no-emparejada (e.g. MSH2/3, etc), reconocimiento de la hebra parental (e.g. , MLH1/3, PMS2P3, etc), iniciación de la re-síntesis (i.e. POLD1) y sellado de la nueva hebra (i.e. LIG3); así como también genes que codifican proteína que previenen este no-emparejamiento del ADN (i.e. NUDT1/5/15) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

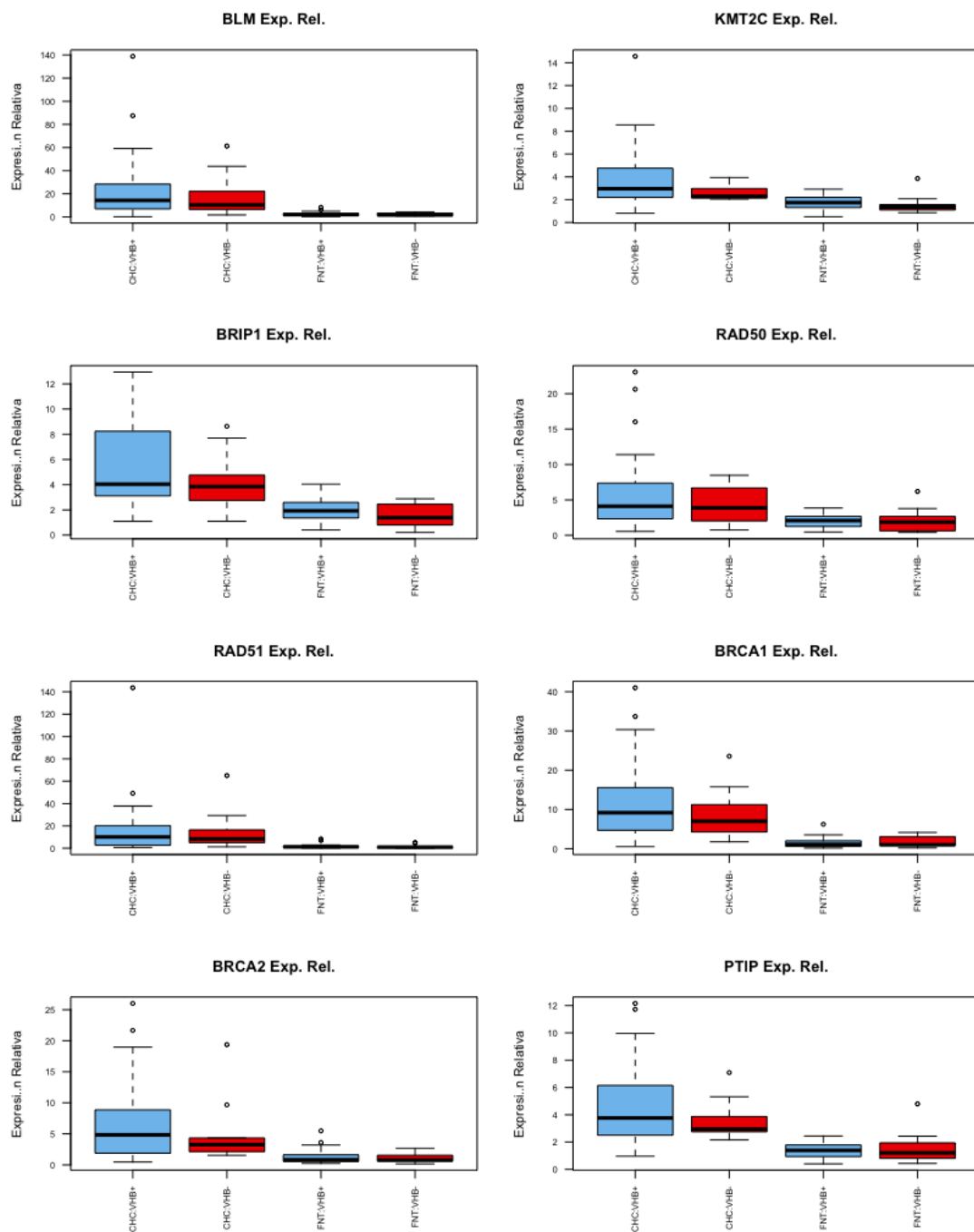


Figura 15S.6. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación de la ruptura de doble hebra del ADN en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reparación por recombinación homóloga (i.e. BLM, KMT2C, PTIP, RAD51, RAD 50, etc.) y por unión de terminaciones no-homologas (RAD50) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

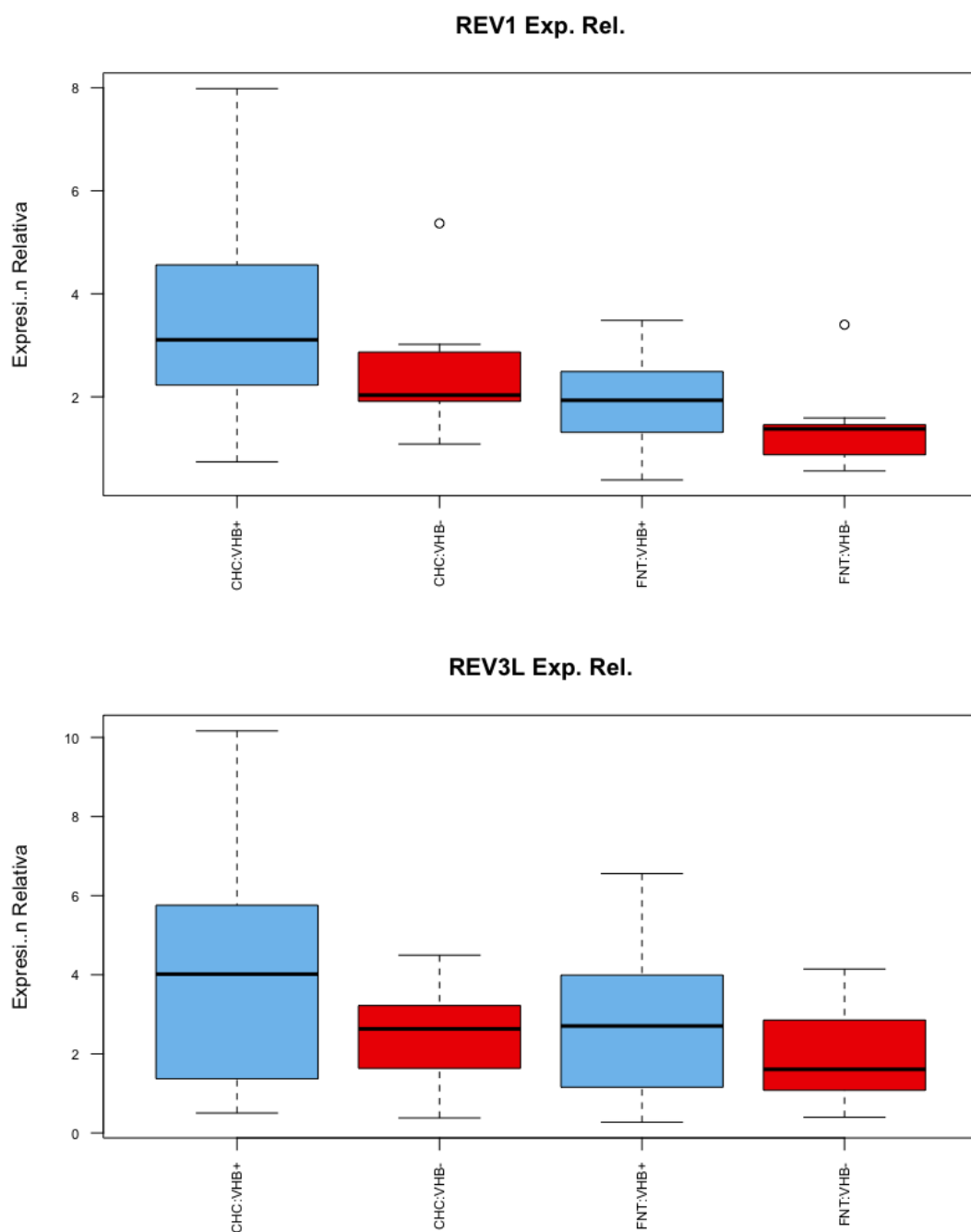


Figura 15S.7. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación por la síntesis trans-lesión del ADN en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reparación por la síntesis trans-lesión del ADN entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-).

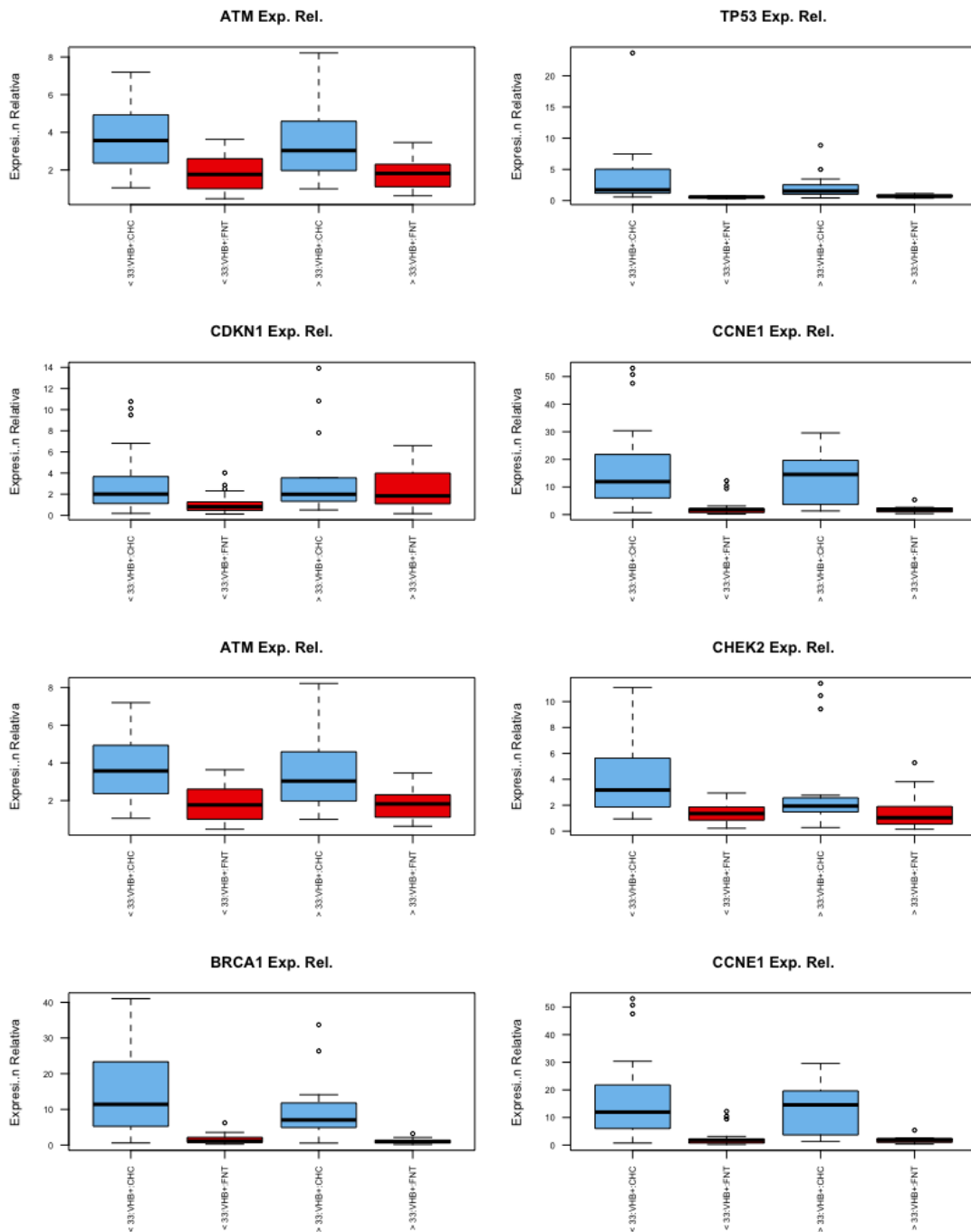


Figura 16S.1. Comparación de la expresión de genes que intervienen en los puntos de control del ciclo celular – reparación de ADN – en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la cascada de activación y el gen que codifica la proteína efectora de la Detención de la fase G1 y del retraso de la fase S del ciclo celular como respuesta al daño del ADN entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad.

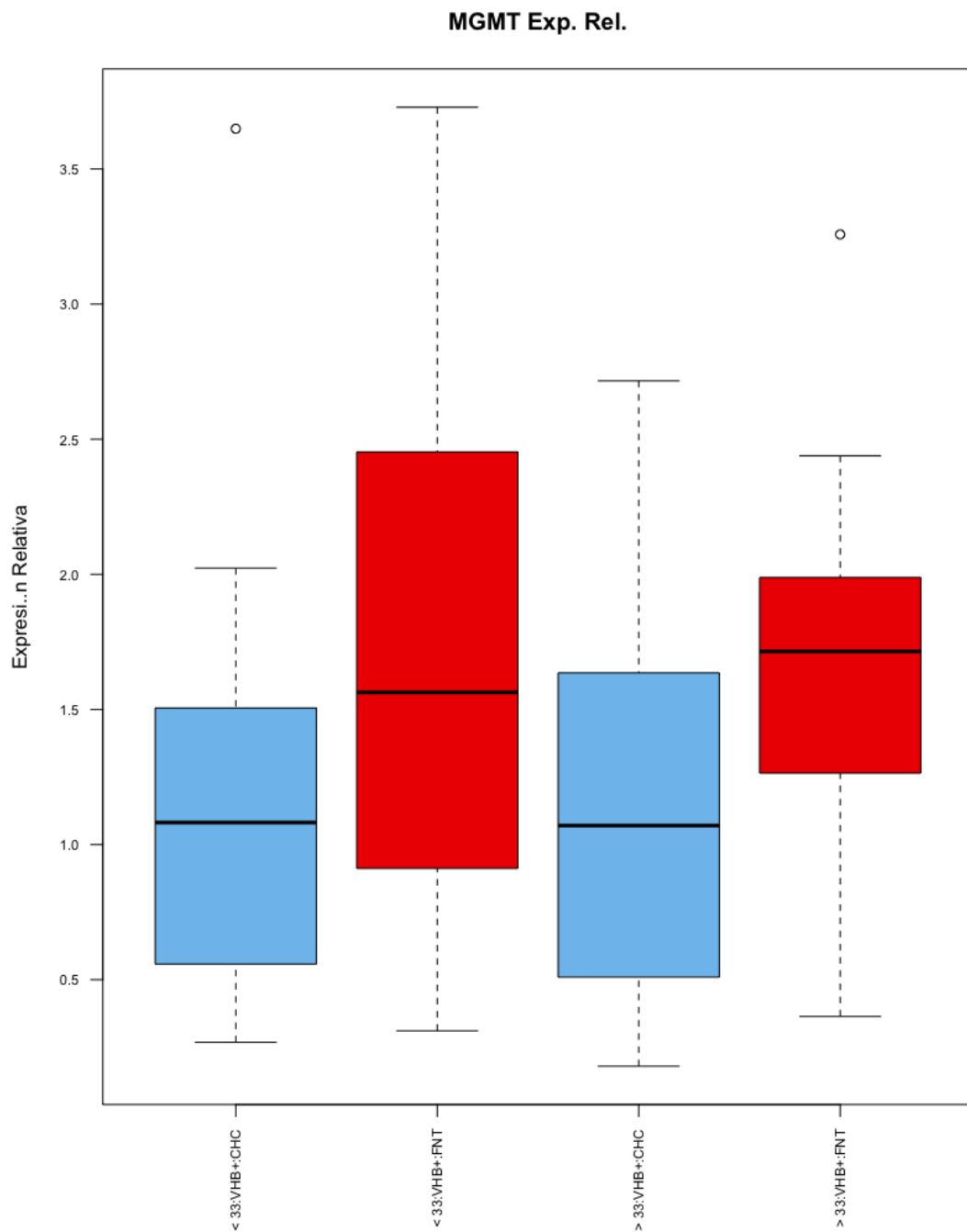


Figura 16S.2. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reversión directa – reparación de ADN – en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reversión directa – reparación de ADN (i.e. *mgmt*) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad.

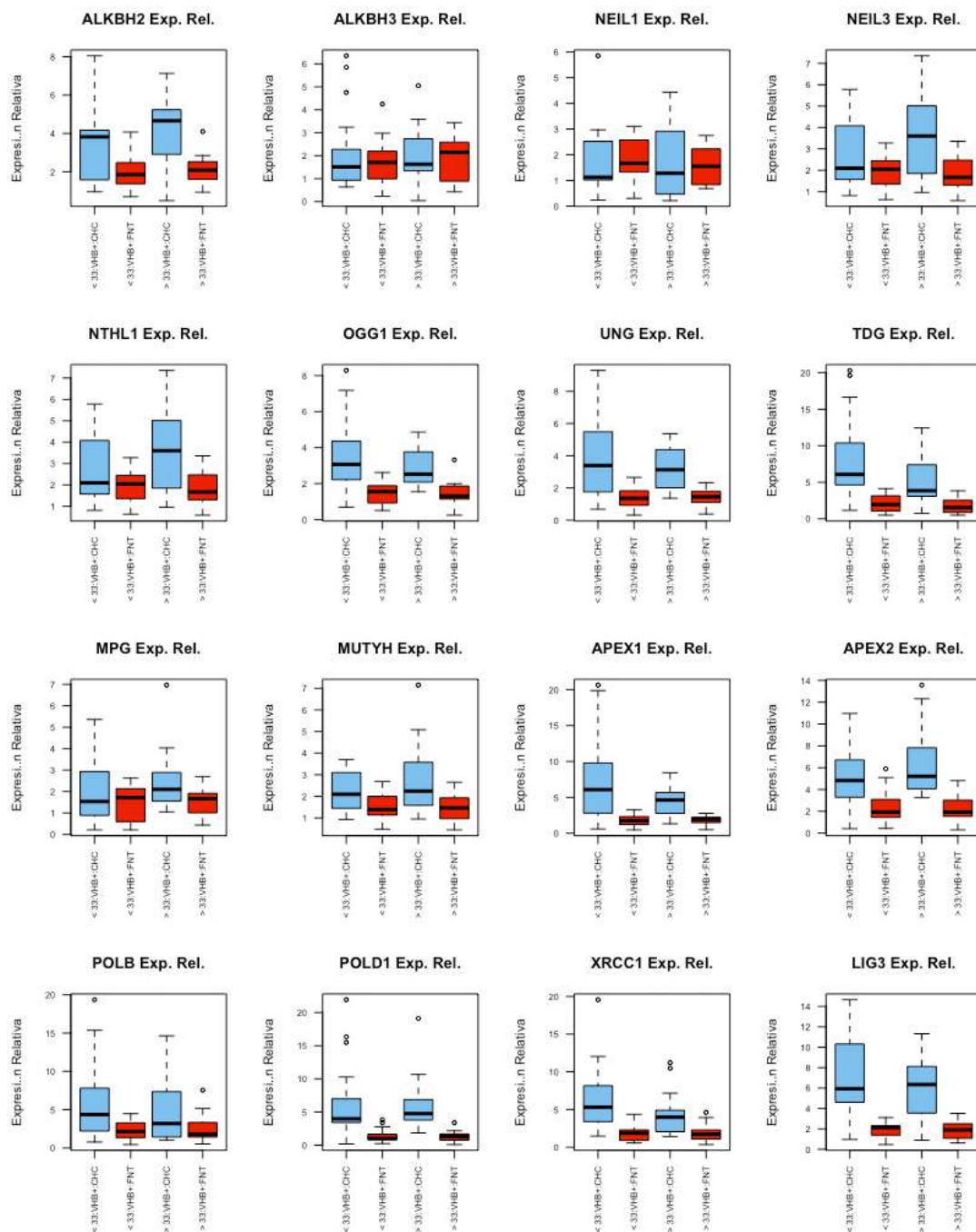


Figura 16S.3. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación por escisión de base del ADN en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la por escisión de base del ADN (e.g. *ercc2*, *ercc4*, *xpc*, *xpg*, etc.) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad.

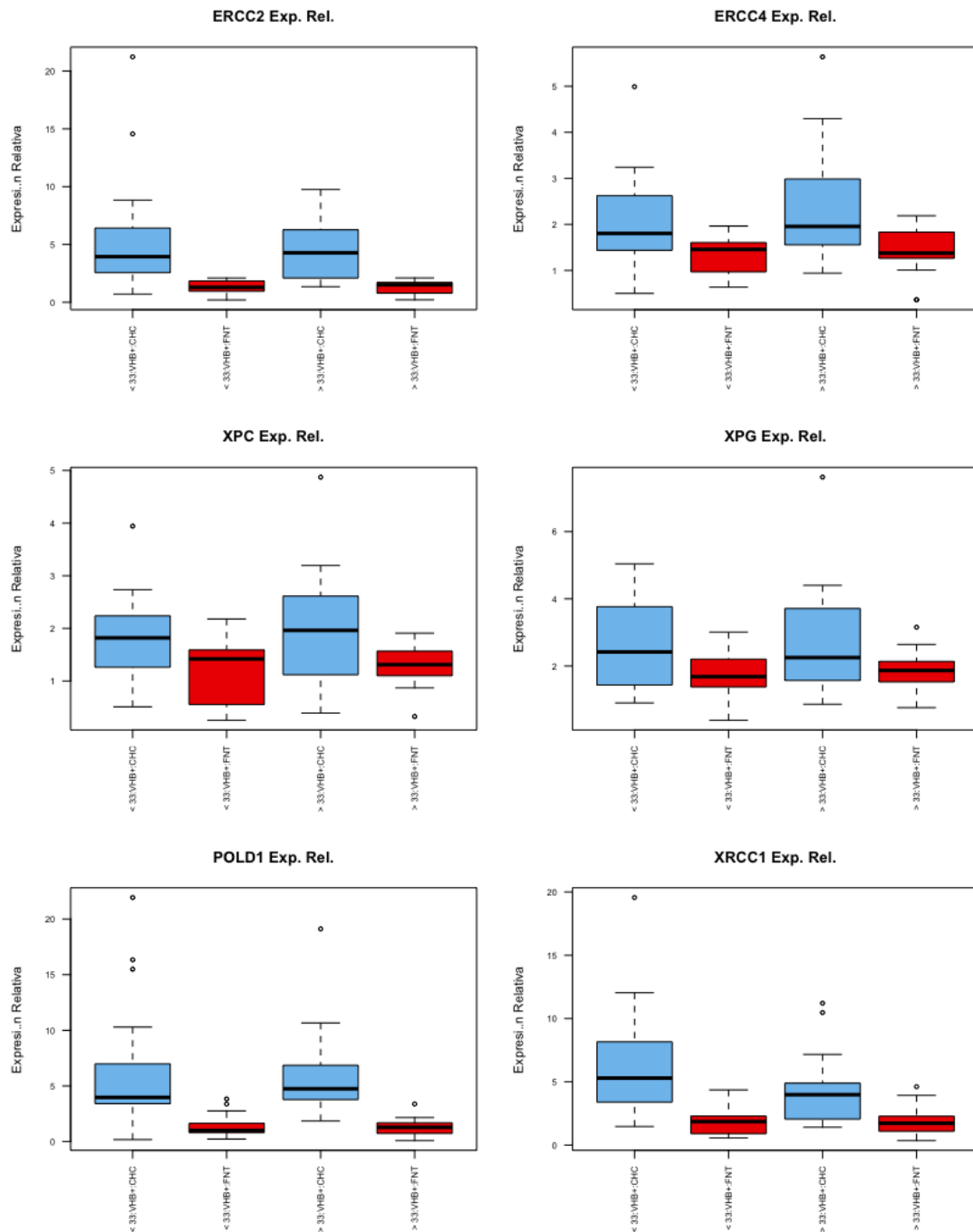


Figura 16S.4. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación del ADN por escisión de nucleótidos en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reparación del ADN por escisión de nucleótidos (e.g. ERCC2, ERCC4, XPC, XPG, etc.) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad.

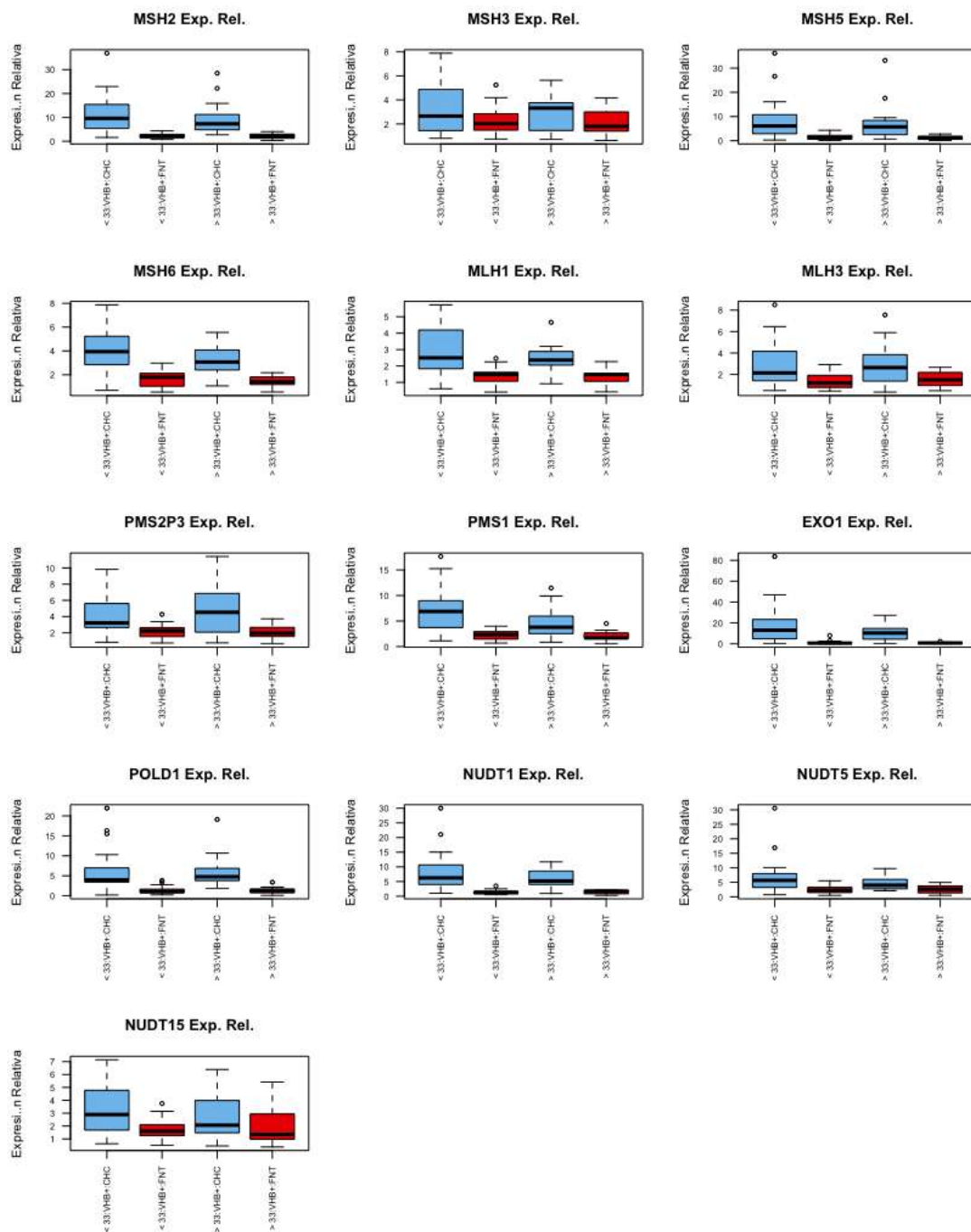


Figura 16S.5. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación del no-emparejamiento en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados en joven y viejo. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reparación del no-emparejamiento del ADN (e.g. MSH2, MSH3, MSH5, MSH6, MLH1, etc.) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad.

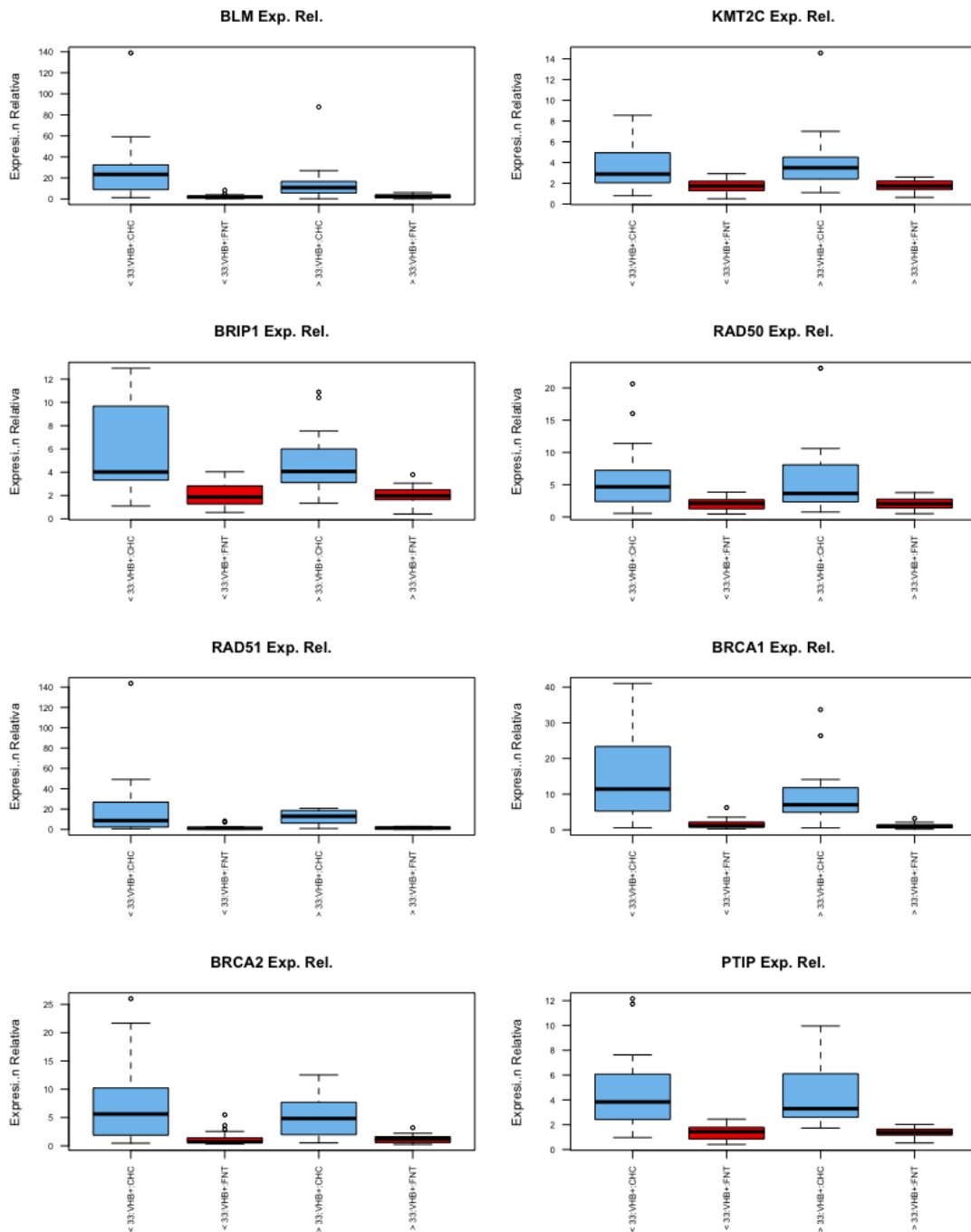


Figura 16S.6. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación de la ruptura de doble hebra en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reparación por recombinación homóloga (e.g. BLM, KMT2C, PTIP, RAD51, RAD 50, etc.) y por unión de terminaciones no-homologas (RAD50) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad.

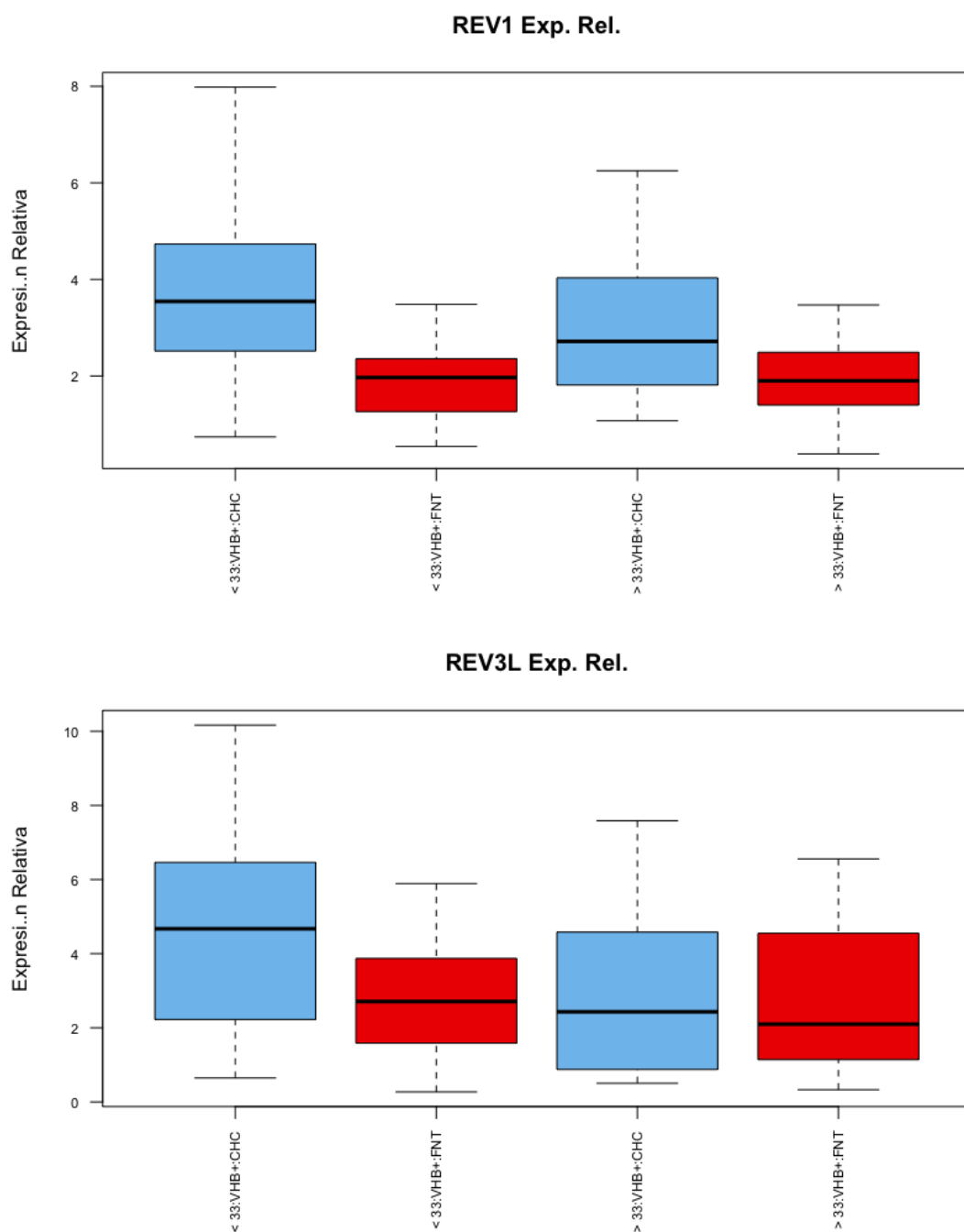


Figura 16S.7. Comparación de la expresión de genes que intervienen en la reparación por la síntesis trans-lesión en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados en joven y viejo. Se ha evaluado la expresión de genes que participan en la reparación por síntesis de trans-lesión (i.e. REV1 y REV3L) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad.

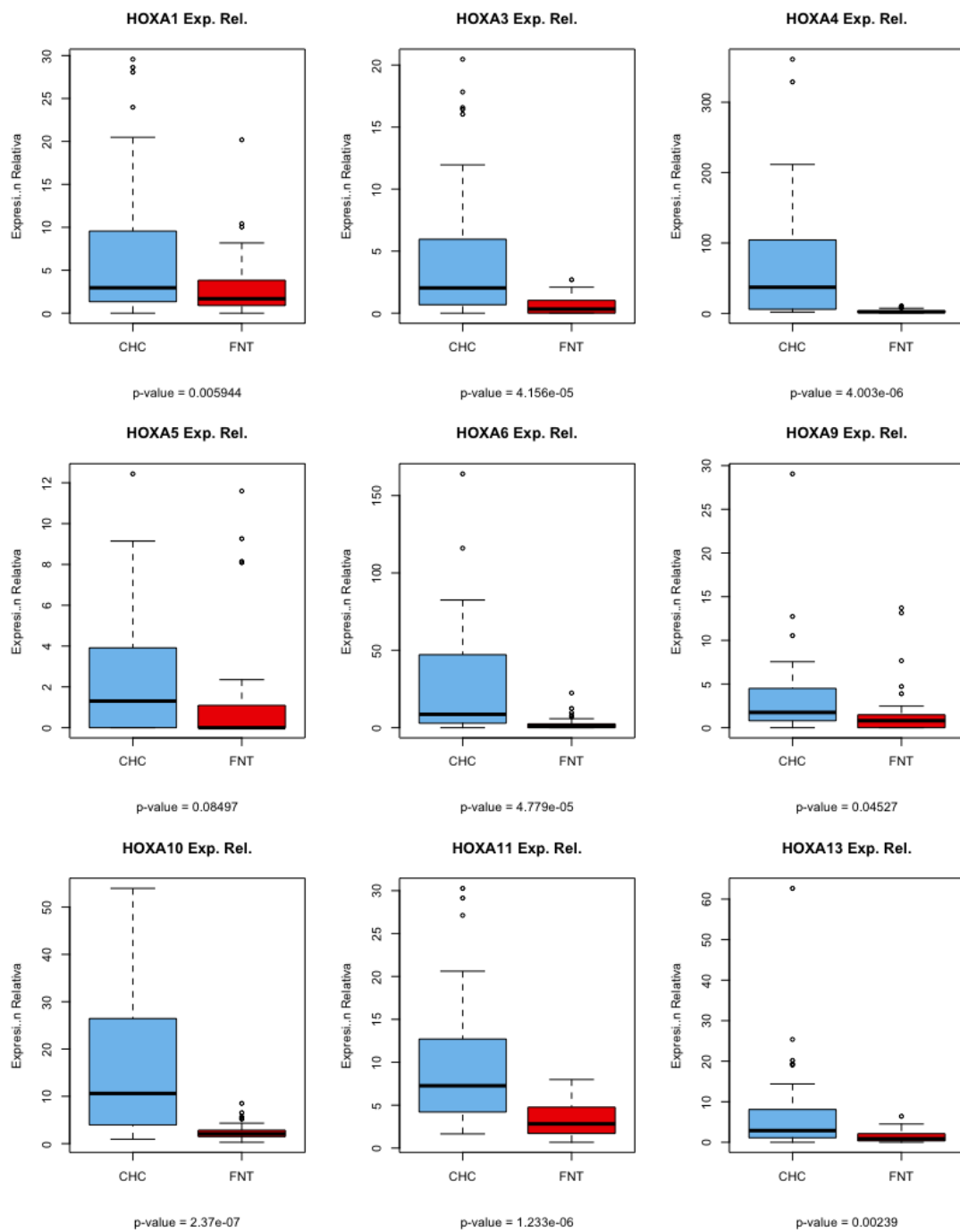


Figura 17S.1. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo A (HOXA) en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXA (11) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT). Sólo en 9 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos. Los genes que no mostraron expresión fueron HOXA2 y HOXA7.

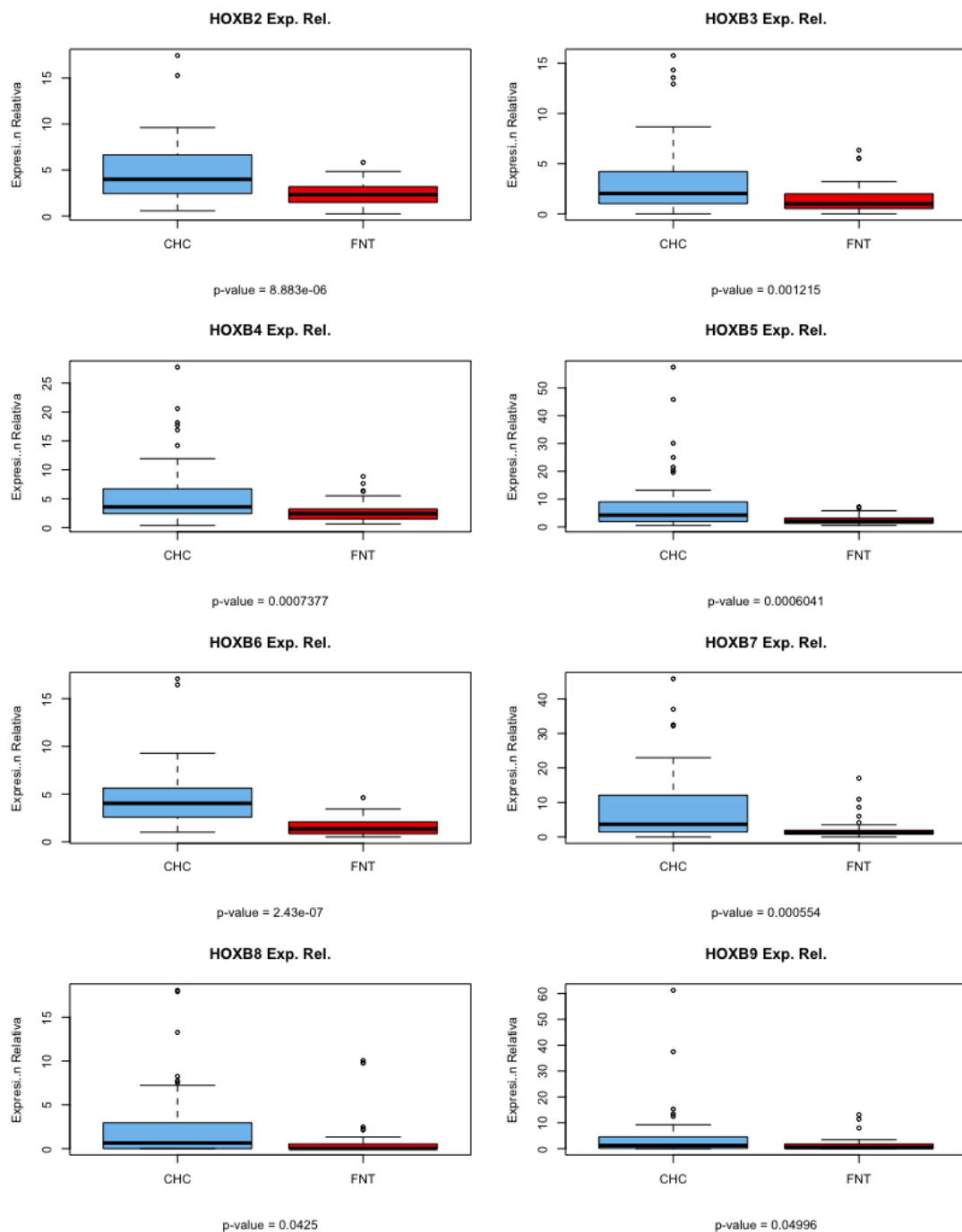


Figura 17S.2. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo B (HOXB) en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXB (10) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT). Sólo en 8 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos. Los genes que no mostraron expresión fueron HOXB1 y HOXB13.

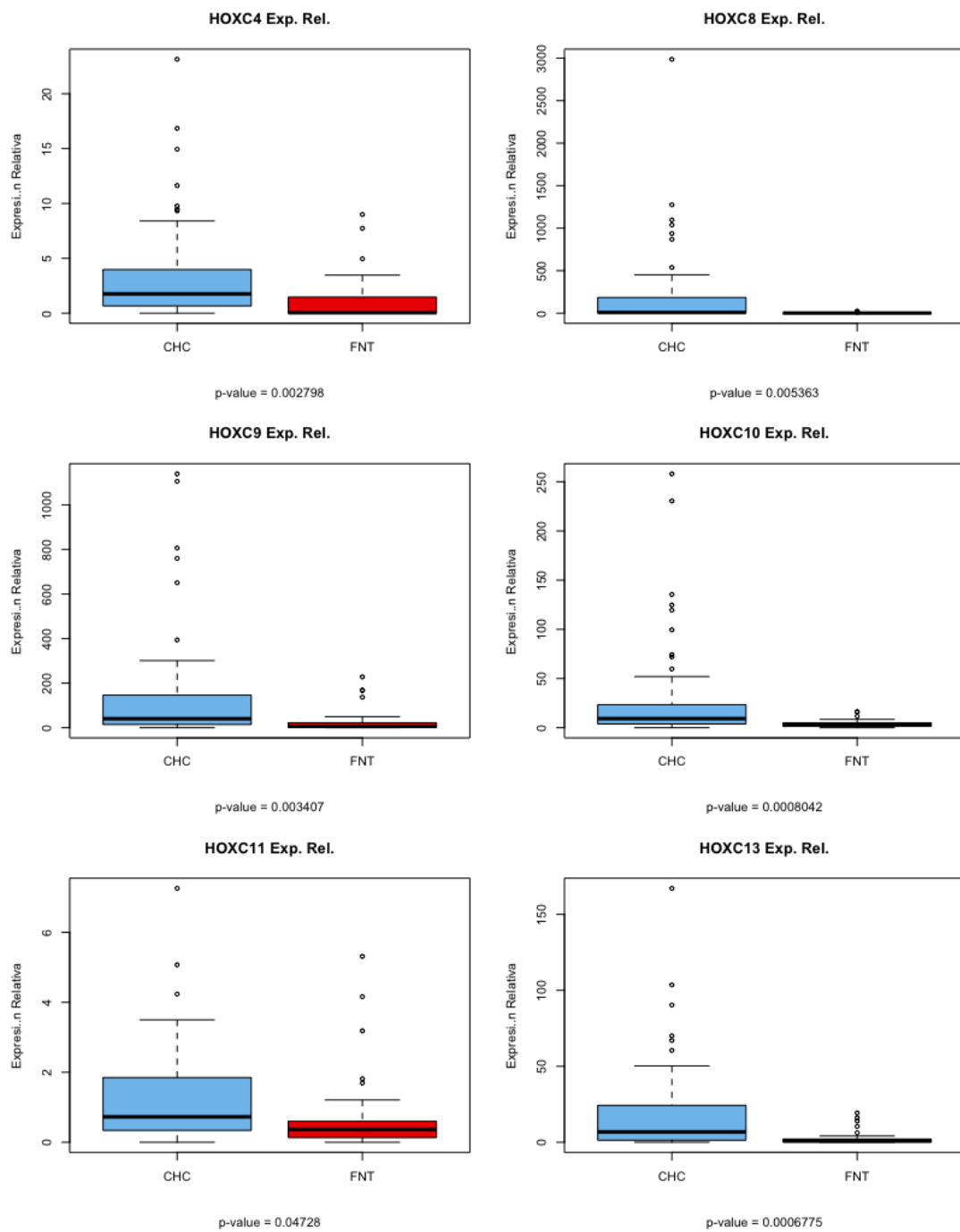


Figura 17S.3. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo C (HOXC) en el tejido CHC y NT. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXC (9) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT). Sólo en 6 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos. Los genes que no mostraron expresión fueron HOXC5, HOXC6 y HOXC12.

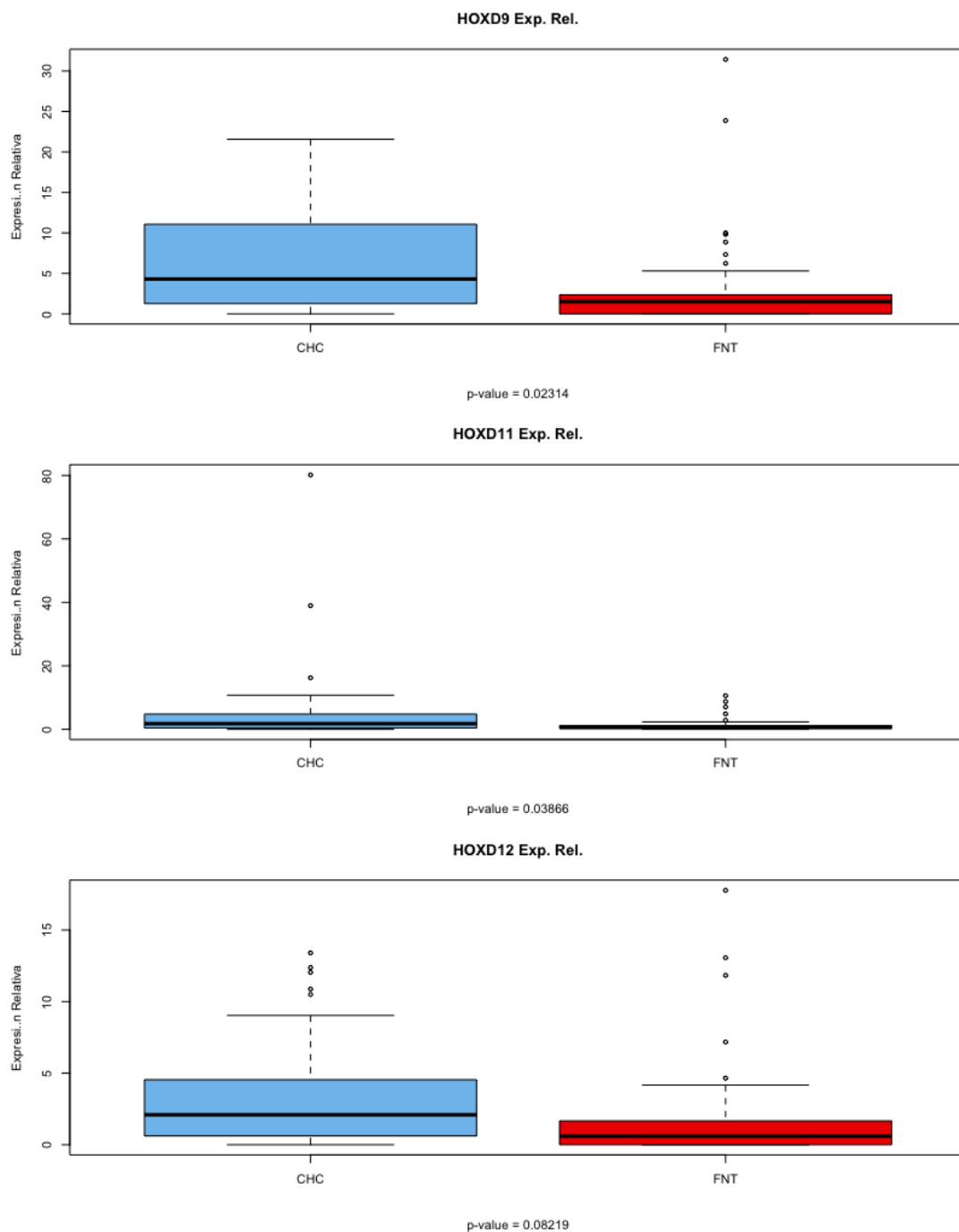


Figura 17S.4. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo D (HOXD) en el tejido CHC y NT. Comparación de la expresión relativa de genes homeóticos del grupo D (HOXD). Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXD (9) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT), pero sólo en 3 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos. Los genes que no mostraron expresión fueron HOXD1, HOXD3, HOXD4, HOXD8, HOXD10 y HOXD13.

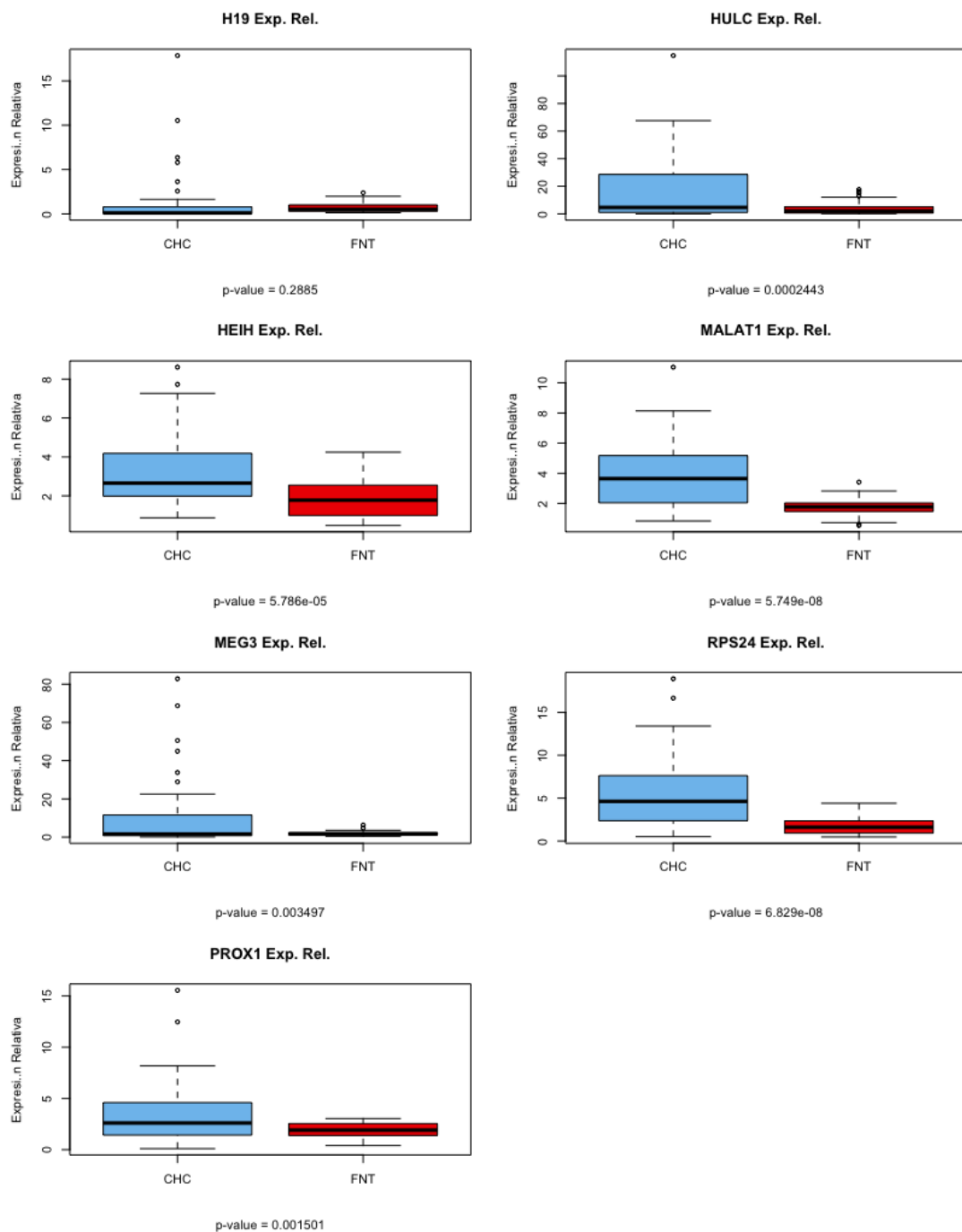


Figura 17S.5. Comparación de la expresión genes o RNAs no-codificante que controlan la expresión de los genes HOX en el tejido CHC y NT. Se han evaluado la expresión de un total de 9 genes: 2 RNA largos no-codificantes (HEIH y HULC), 3 RNA que no codifican proteínas (H19, MALAT1 y MEG3), 2 RNA anti-sentido (HOTAIR y HOTTIP) y 2 genes codificantes (PROX1 y RPS24) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT). Sólo en 7 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos. Los genes que no mostraron expresión fueron HOTTIP y HOTAIR.

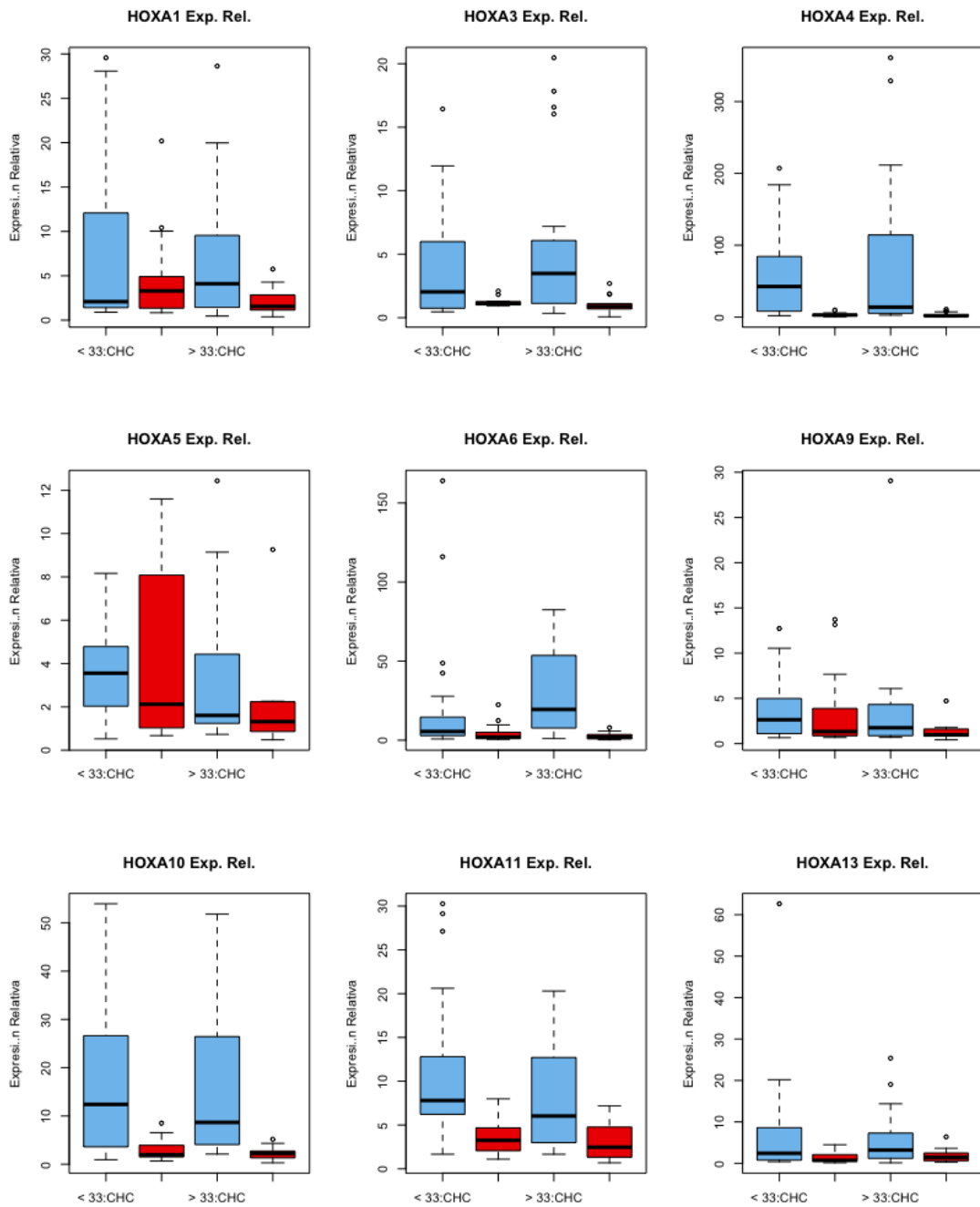


Figura 18S.1. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo A (HOXA) en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXA (11) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad, pero sólo en 9 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

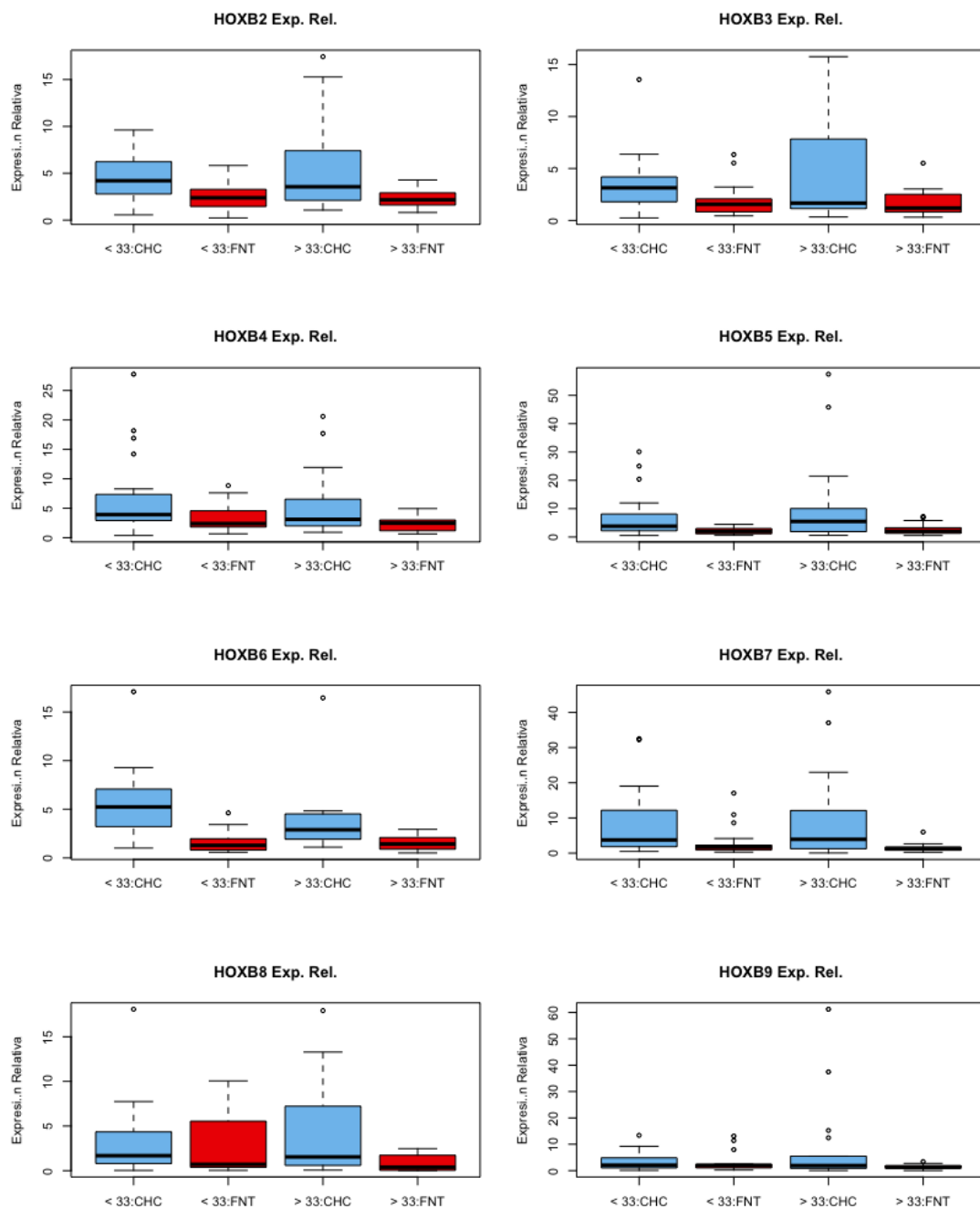


Figura 18S.2. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo B (HOXB) en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXB (10) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad, pero sólo en 8 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

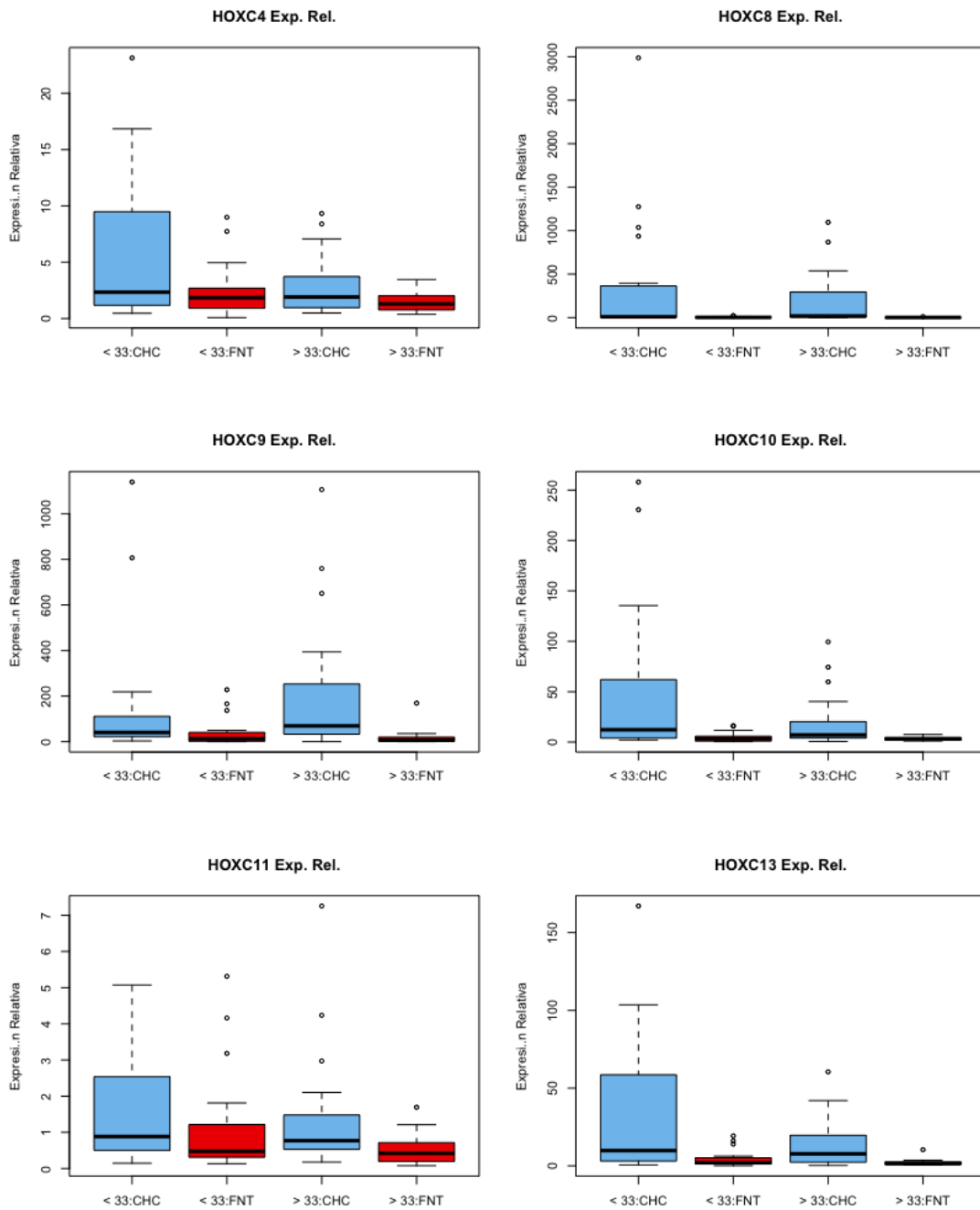


Figura 18S.3. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo C (HOXC) en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXC (9) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad, pero sólo en 6 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

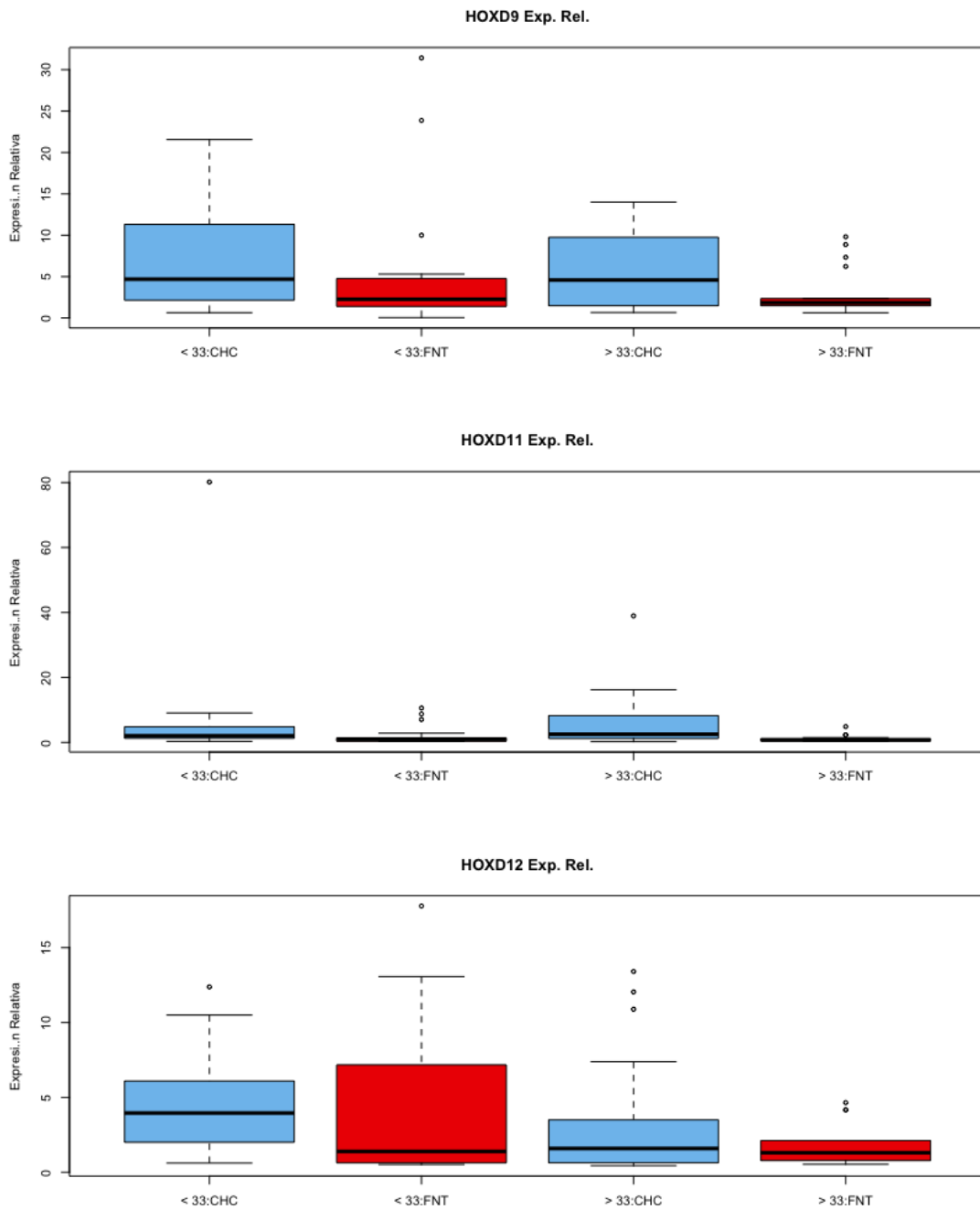


Figura 18S.4. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo D (HOXD) en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXD (9) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad, pero sólo en 3 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

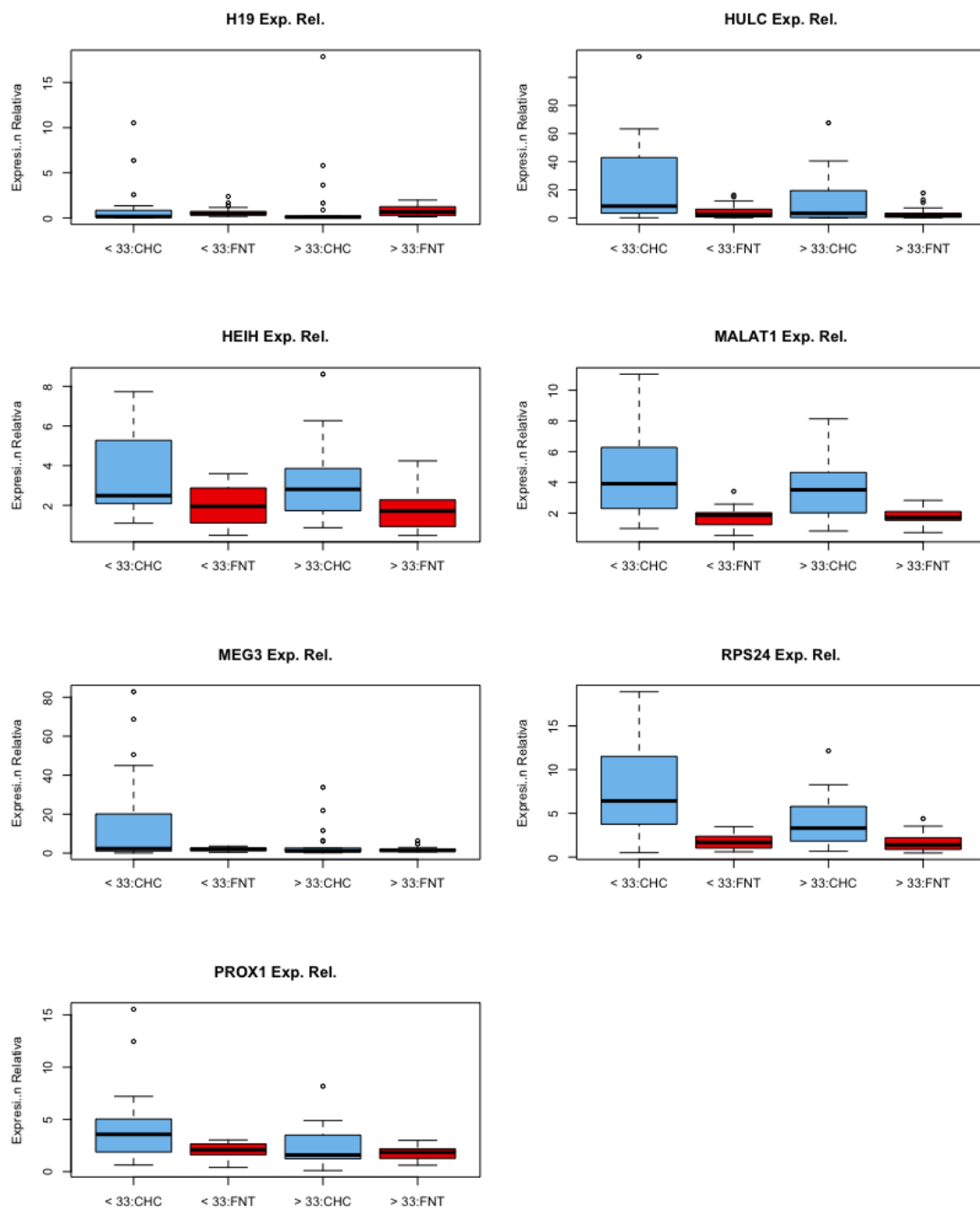


Figura 18S.5. Comparación de la expresión genes o RNAs no-codificante que controlan la expresión de los genes HOX en el tejido CHC y NT sub-agrupados por Edad. Se han evaluado la expresión de un total de 9 genes: 2 RNA largos no-codificantes (HEIH y HULC), 3 RNA que no codifican proteínas (H19, MALAT1 y MEG3), 2 RNA anti-sentido (HOTAIR y HOTTIP) y 2 genes codificantes (PROX1 y RPS24) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados según la Edad, pero sólo en 7 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

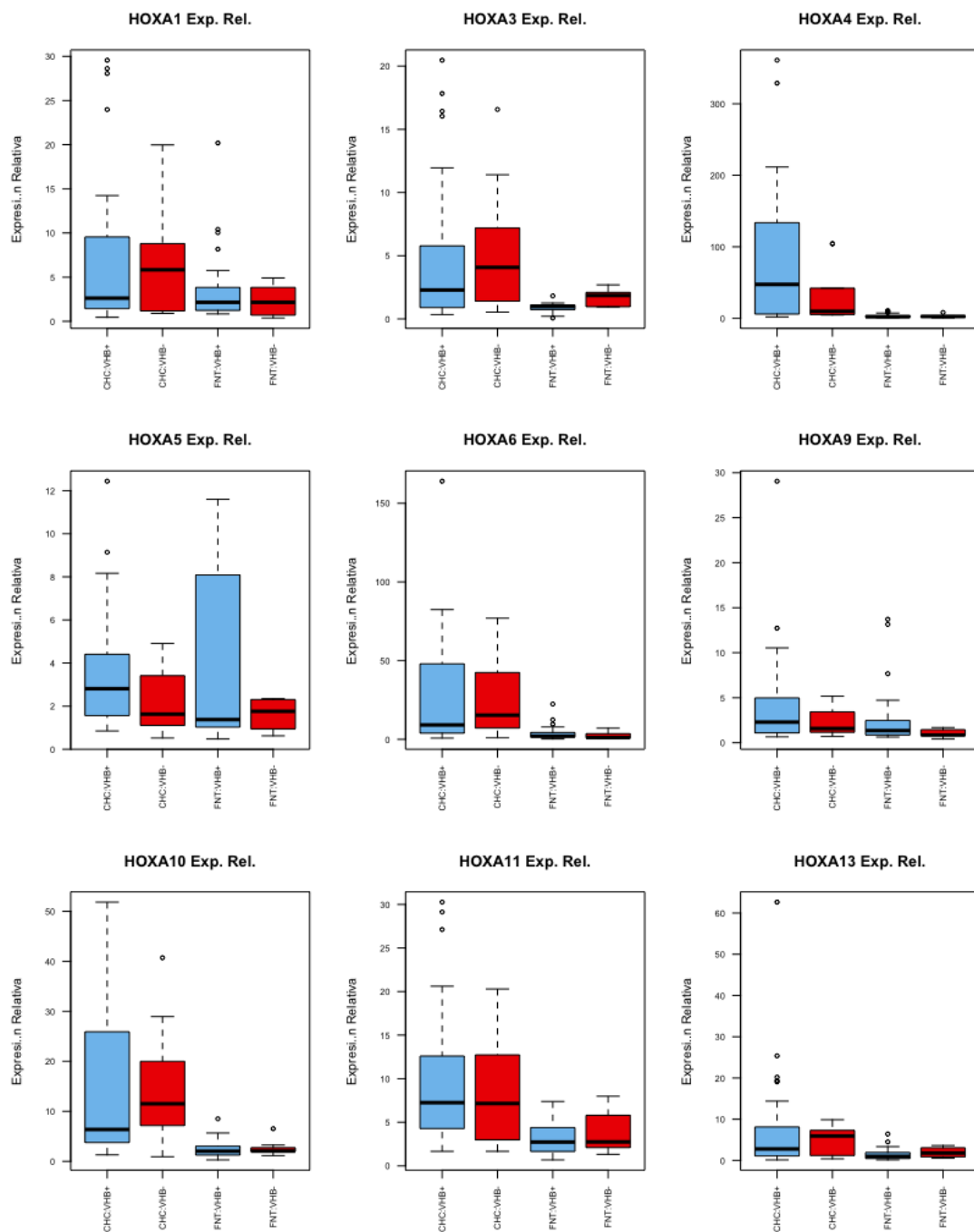


Figura 19S.1. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo A (HOXA) en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXA (11) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-), pero sólo en 9 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

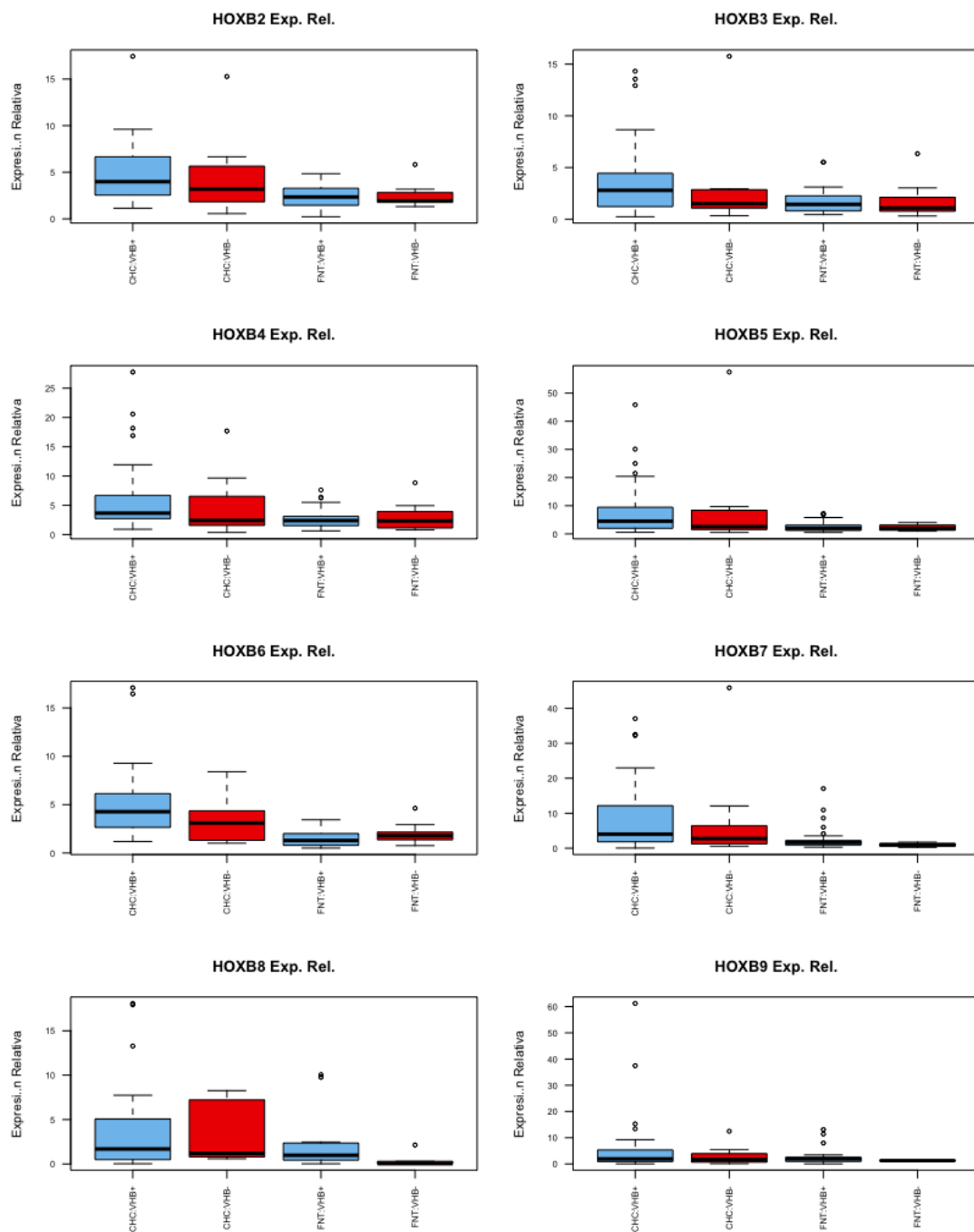


Figura 19S.2. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo B (HOXB) en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXB (10) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-), pero sólo en 8 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

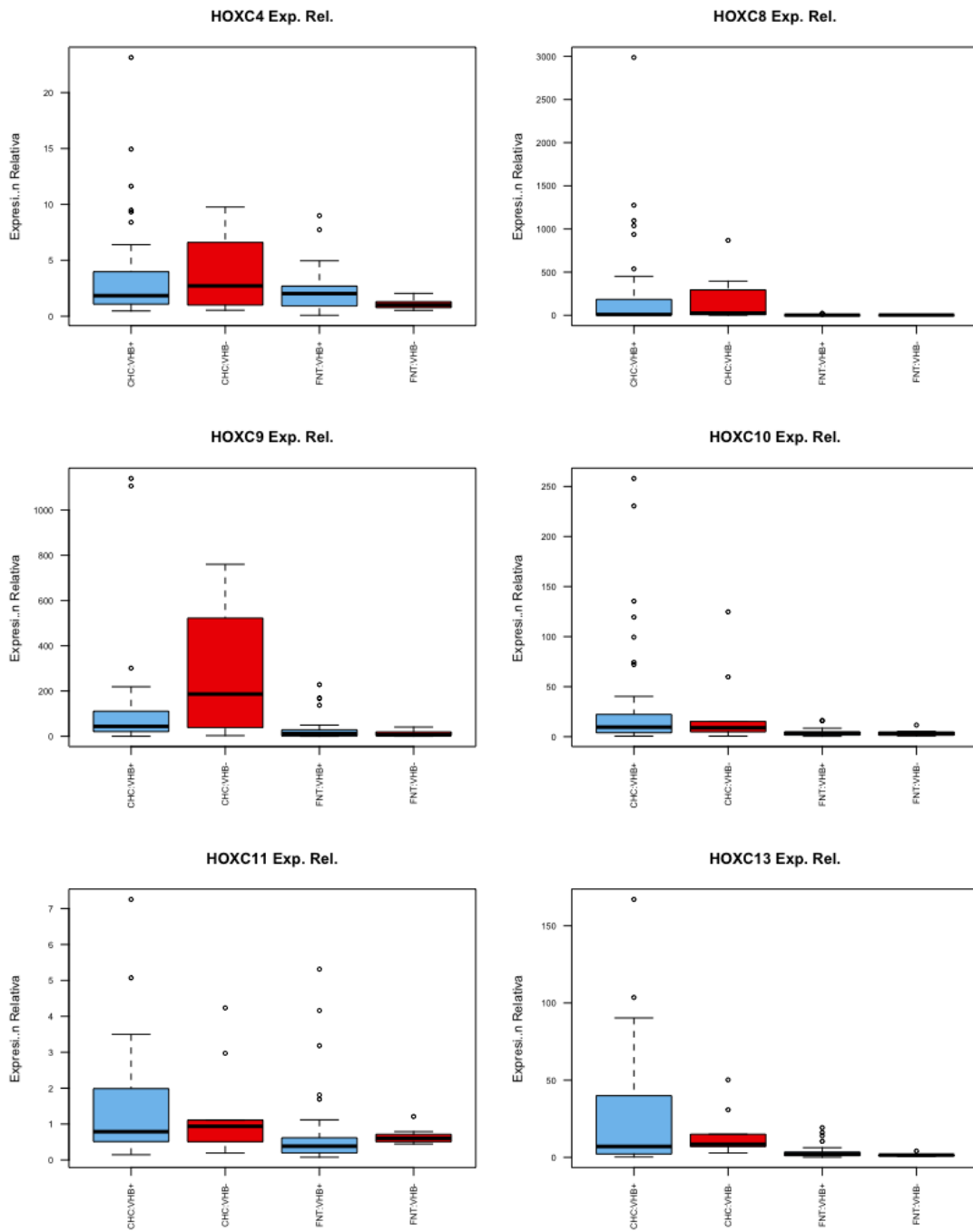


Figura 19S.3. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo C (HOXC) en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXC (9) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-), pero sólo en 6 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

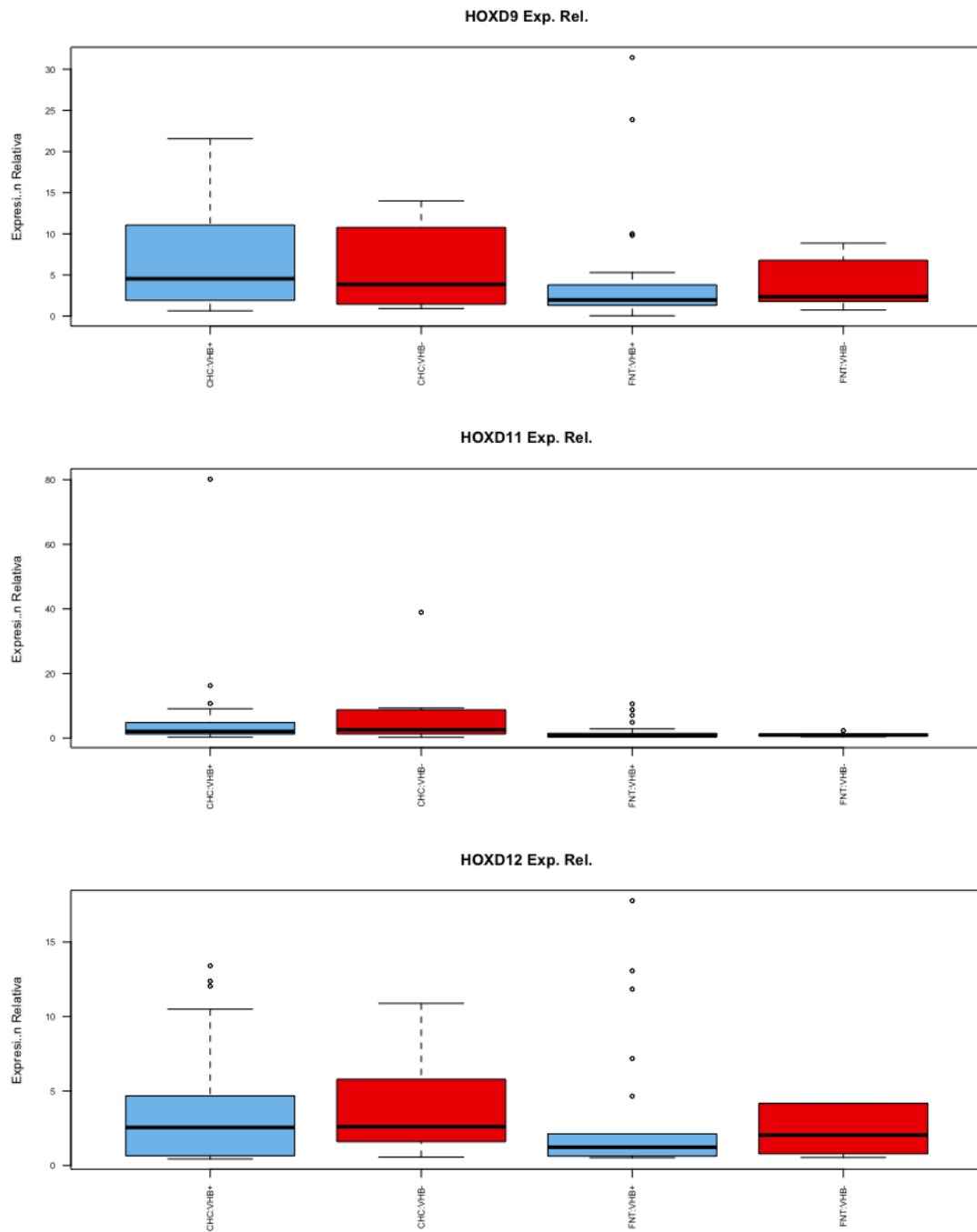


Figura 19S.4. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo D (HOXD) en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXD (9) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-), pero sólo en 3 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

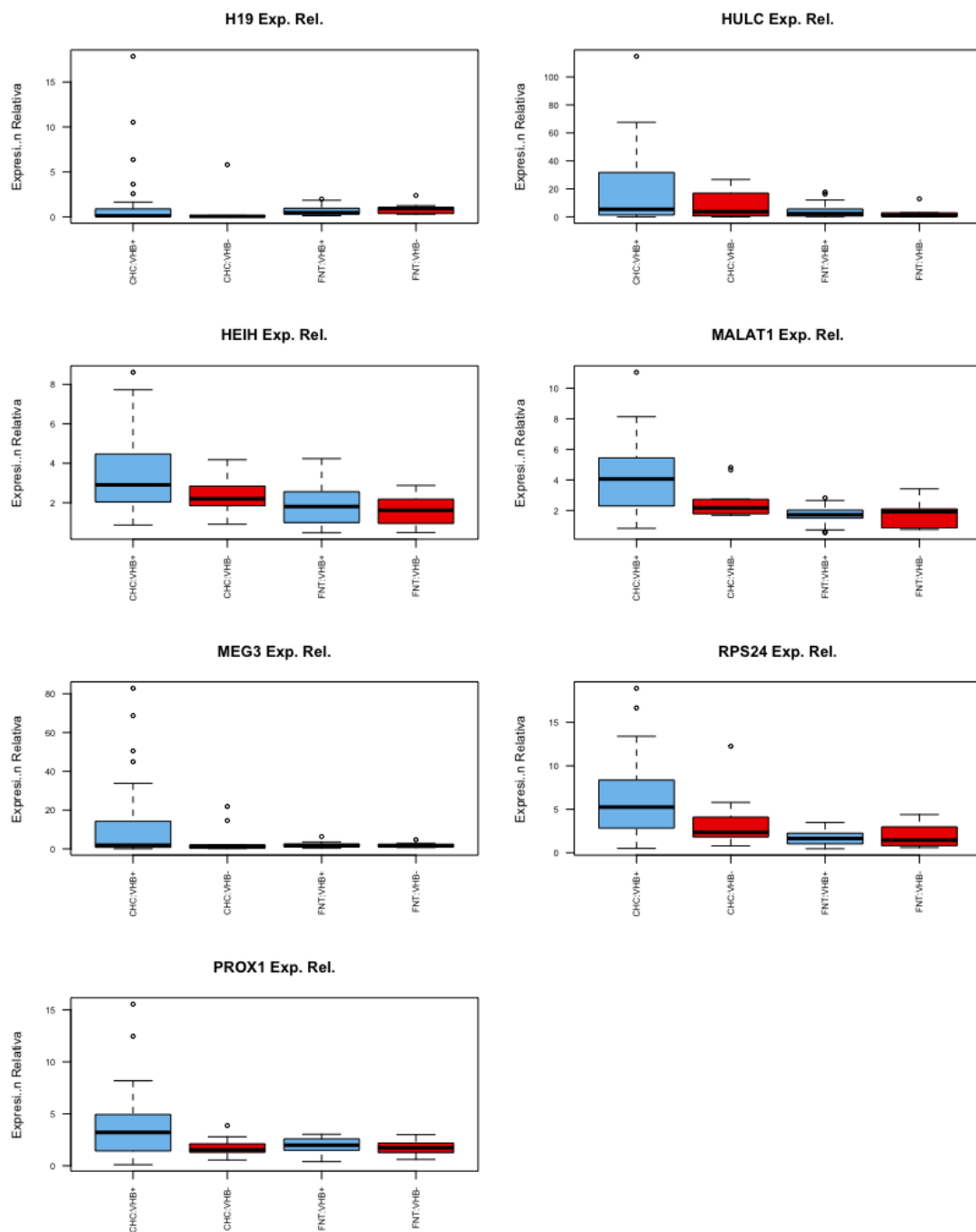


Figura 19S.5. Comparación de la expresión genes o RNAs no-codificante que controlan la expresión de los genes HOX en el tejido CHC y NT sub-agrupados en VHB+ y VHB-. Se han evaluado la expresión de un total de 9 genes: 2 RNA largos no-codificantes (HEIH y HULC), 3 RNA que no codifican proteínas (H19, MALAT1 y MEG3), 2 RNA anti-sentido (HOTAIR y HOTTIP) y 2 genes codificantes (PROX1 y RPS24) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) y no-infectados con VHB (VHB-), pero sólo en 7 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

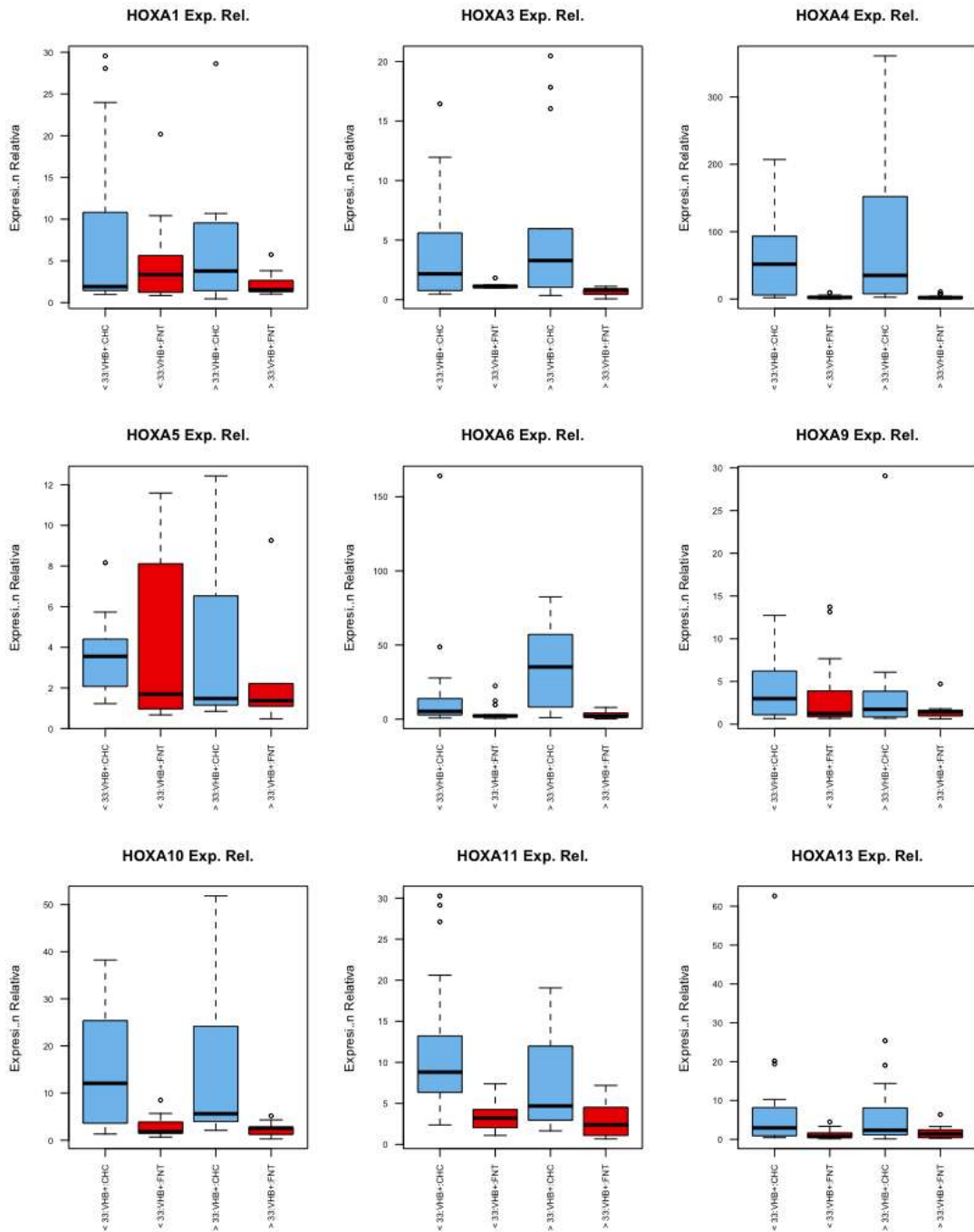


Figura 20S.1. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo A (HOXA) en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXA (11) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad, pero sólo en 9 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

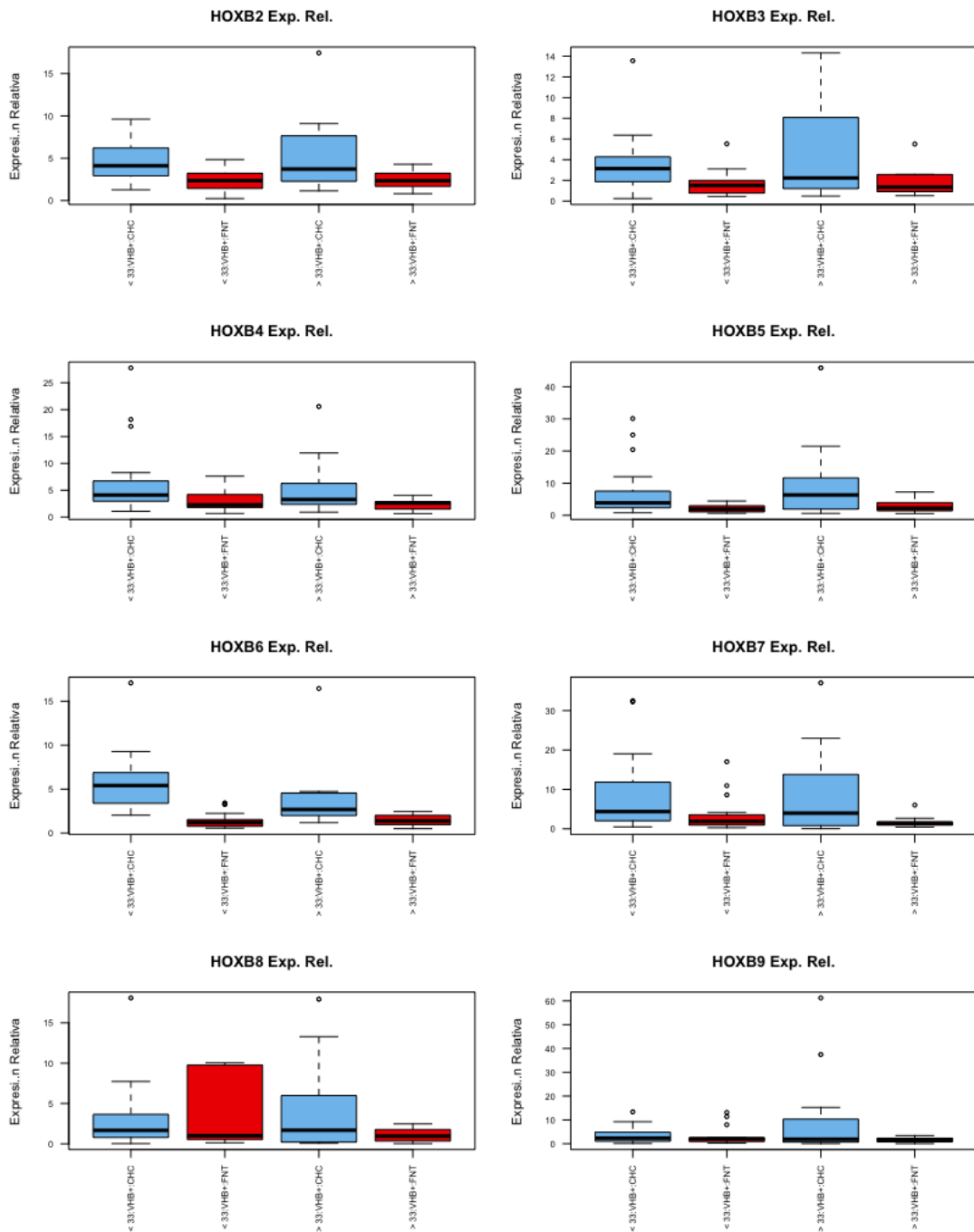


Figura 20S.2. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo B (HOXB) en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXB (10) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad, pero sólo en 8 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

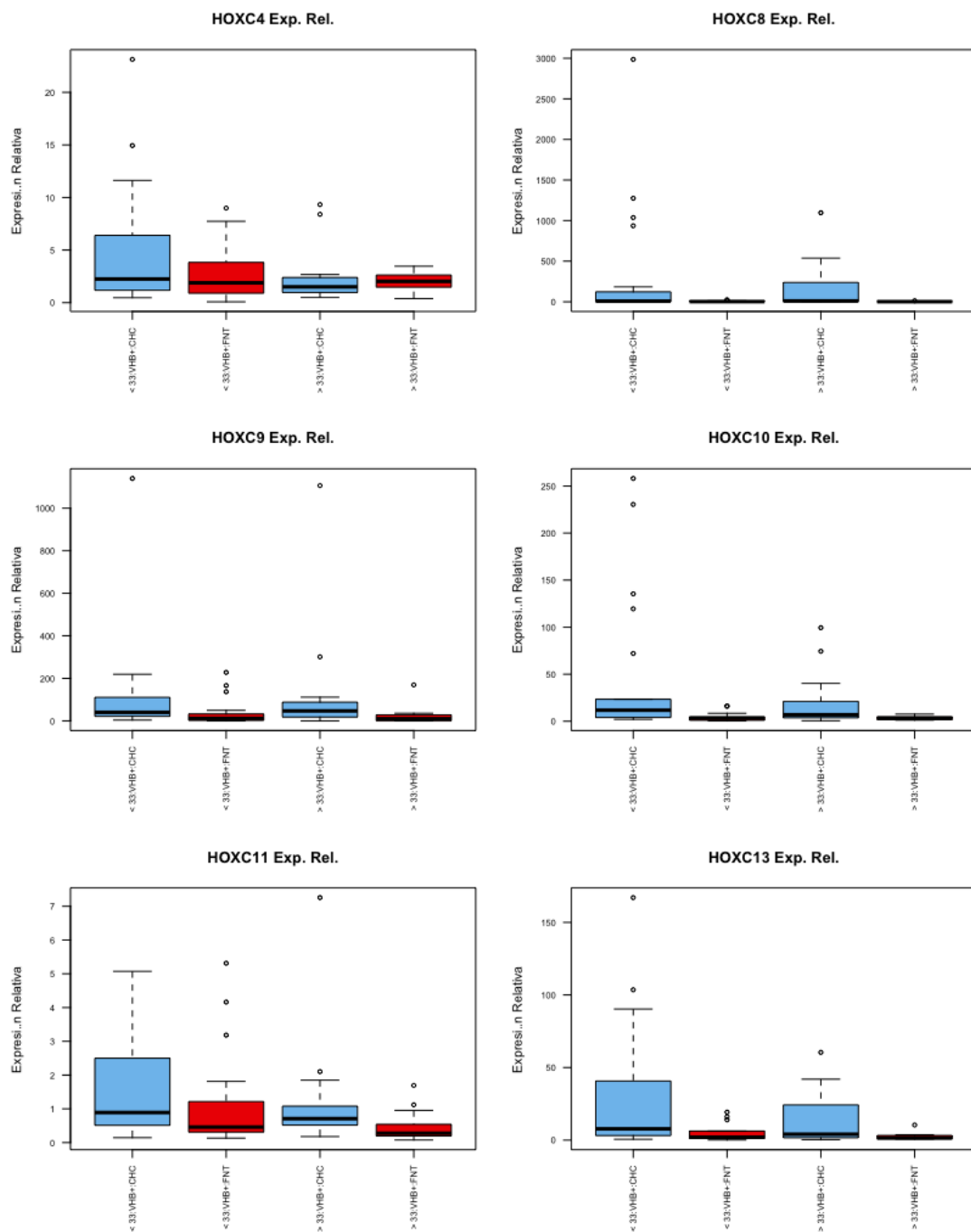


Figura 20S.3. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo C (HOXC) en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXC (9) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad, pero sólo en 6 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

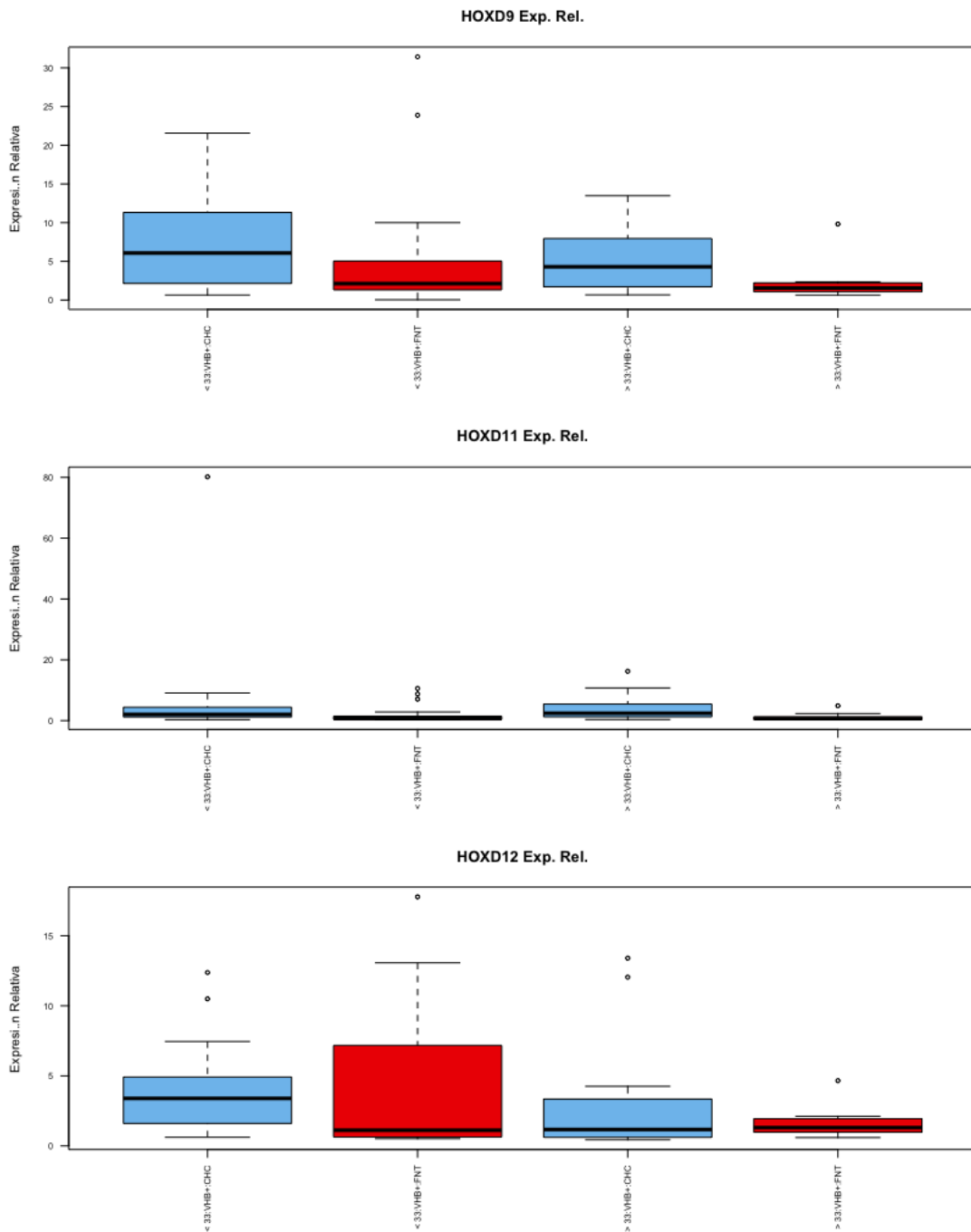


Figura 20S.4. Comparación de la expresión de genes homeóticos del grupo D (HOXD) en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se ha evaluado la expresión de todos los genes HOXD (9) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad, pero sólo en 3 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

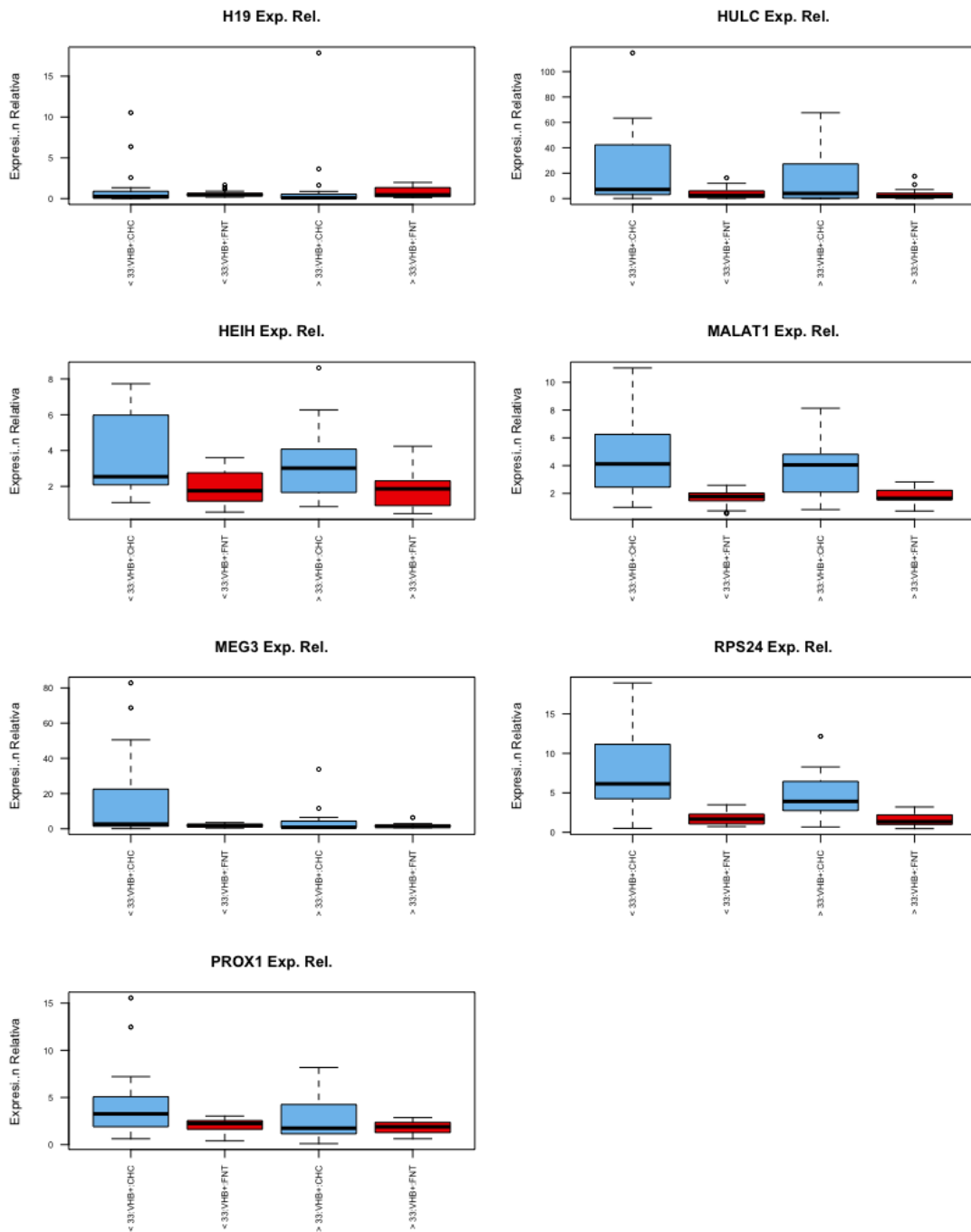


Figura 20S.5. Comparación de la expresión genes o RNAs no-codificante que controlan la expresión de los genes HOX en el tejido CHC y NT de pacientes VHB+ sub-agrupados por Edad. Se han evaluado la expresión de un total de 9 genes: 2 RNA largos no-codificantes (HEIH y HULC), 3 RNA que no codifican proteínas (H19, MALAT1 y MEG3), 2 RNA anti-sentido (HOTAIR y HOTTIP) y 2 genes codificantes (PROX1 y RPS24) entre el tejido tumoral (CHC) y no-tumoral (NT) sub-agrupados en infectados con VHB (VHB+) según la Edad, pero sólo en 7 de ellos se pudo observar una expresión en ambos tejidos.

Tabla 1S. Genes diferencialmente expresados con un $p < 0.0001$ únicamente en pacientes con CHC < 33 años

GEN	GRUPO
CP	HIERRO
OGG1	REPARACION DEL ADN
UNG	REPARACION DEL ADN
TDG	REPARACION DEL ADN
APEX1	REPARACION DEL ADN
POLD1	REPARACION DEL ADN
XRCC1	REPARACION DEL ADN
CCNE1	REPARACION DEL ADN
BLM	REPARACION DEL ADN
BRIP1	REPARACION DEL ADN
BRCA2	REPARACION DEL ADN
MSH2	REPARACION DEL ADN
MSH6	REPARACION DEL ADN
MLH1	REPARACION DEL ADN
PMS1	REPARACION DEL ADN
EXO1	REPARACION DEL ADN
NUDT1	REPARACION DEL ADN
ERCC2	REPARACION DEL ADN
REV1	REPARACION DEL ADN
MAP2K7	RESPUESTA AL ESTRES OXIDATIVO
MAPK8	RESPUESTA AL ESTRES OXIDATIVO
HOXA11	HOX
HOXB6	HOX
MALAT1	HOX
RPS24	HOX

Tabla 2S. Genes diferencialmente expresados con un $p < 0.0001$ únicamente en pacientes con CHC > 33 años

GEN	GRUPO
MAPK3	RESPUESTA AL ESTRES OXIDATIVO
AXIN1	RESPUESTA AL ESTRES OXIDATIVO

Tabla 3S. Genes diferencialmente expresados con un $p < 0.0001$ únicamente en pacientes con CHC VHB+ < 33 años

GEN	GRUPO
PTIP	REPARACION DEL ADN
HRAS	RESPUESTA AL ESTRES OXIDATIVO

Tabla 4S. Genes diferencialmente expresados con un $p < 0.0001$ únicamente en pacientes con CHC VHB+ > 33 años

GEN	GRUPO
APEX2	REPARACION DEL ADN
SRXN1	RESPUESTA AL ESTRES OXIDATIVO

Tabla 5S. Variables cualitativas que caracterizan a los grupos definidos mediante el agrupamiento jerárquico

GRUPO	VARIABLES	CATEGORIA	INDIVIDUOS QUE PERTENECE AL CLUSTER (%)	INDIVIDUOS DEL CLUSTER PRESENTES EN CATEGORIA (%)	INDIVIDUOS QUE PERTENECEN A ESTA CATEGORIA	VALOR DE p	V.TEST
I	nPCR.VHB	POSITIVO	59.46	100.00	80.43	0.0012	3.242
		NEGATIVO	0.00	0.00	19.57	0.0012	-3.242
	MUERTE	NEGATIVO	60.00	95.45	76.09	0.0036	2.911
		POSITIVO	9.09	4.55	23.91	0.0036	-2.911
	AgHBs	POSITIVO	71.43	68.18	45.65	0.0043	2.855
		NEGATIVO	28.00	31.82	54.35	0.0043	-2.855
II	nPCR.VHB	POSITIVO	40.54	100.00	80.43	0.0183	2.360
		NEGATIVO	0.00	0.00	19.57	0.0183	-2.360
	MUERTE	POSITIVO	63.64	46.67	23.91	0.0199	2.329
		NEGATIVO	22.86	53.33	76.09	0.0199	-2.329
III	nPCR.VHB	NEGATIVO	100.00	100.00	19.57	9.08E-10	6.125
		POSITIVO	0.00	0.00	80.43	9.08E-10	-6.125
	AgHBs	NEGATIVO	32.00	88.89	54.35	2.43E-02	2.252
		POSITIVO	4.76	11.11	45.65	2.43E-02	-2.252

Tabla 6S. Variables cuantitativas que caracterizan a los grupos definidos mediante el agrupamiento jerárquico

GRUPOS	VARIABLES	RPROMEDIO EN EL CLUSTER	PROMEDIO EN EL TOTAL DE INDIVIDUOS EVALUADOS	VALOR DE p	V.TES T
I	RPS24.CHC	7.44	5.82	0.016	2.410
	REV3L.CHC	4.67	3.70	0.017	2.387
	PMS1.CHC	7.48	5.94	0.019	2.342
	PROX1.CHC	4.42	3.37	0.022	2.283
	PTEN.CHC	3.15	2.67	0.023	2.270
	TDG.CHC	7.83	6.30	0.026	2.226
	MEG3.CHC	16.48	10.31	0.030	2.167
	XRCC1.CHC	6.48	5.31	0.033	2.130
	MAPK8.CHC	4.66	3.94	0.036	2.092
	APEX1.CHC	7.31	5.84	0.039	2.061
	HOXB6.CHC	5.65	4.61	0.044	2.010
	COX.CHC	5.94	4.11	0.045	2.008
	MYCL.CHC	3.24	4.93	0.039	-2.065
	PDZK1IP1.NT	2.63	6.16	0.020	-2.334
	CDKN1.NT	1.24	2.06	0.006	-2.774
EDAD	21.45	41.61	0.000	-5.514	
II	EDAD	62.20	41.61	0.000	4.093
	BMP2.CHC	17.22	9.51	0.010	2.593
	PDZK1IP1.CHC	188.69	69.80	0.015	2.437
	AQP7.NT	2.18	1.60	0.033	2.135
	GLUL.CHC	6.14	3.78	0.049	1.969
III	GSTP1.CHC	12.46	5.17	0.007	2.691
	HOXA3.NT	1.16	0.61	0.009	2.594
	COX.NT	5.25	2.92	0.026	2.221
	MYCL.CHC	8.44	4.93	0.027	2.208
	TAMAÑO.TUMOR	18.43	14.57	0.028	2.191
	SRXN1.CHC	9.85	4.84	0.034	2.115
	EDAD	56.56	41.61	0.035	2.107
	SLC11A1.NT	3.89	2.45	0.043	2.022
	PTEN.CHC	1.84	2.67	0.046	-1.991
	AQP9.NT	0.99	1.68	0.043	-2.023
	ATM.CHC	2.25	3.35	0.037	-2.085
	NRF2.CHC	1.92	3.54	0.035	-2.103
	MGMT.NT	1.01	1.57	0.019	-2.355