



GRUPO DE ESTUDIO DE HEPATITIS
VÍRICAS - SEIMC



SOLICITUD DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1. Datos del proyecto:

Título del proyecto:

Búsqueda de factores genéticos relacionados con el metabolismo del colesterol implicados en la susceptibilidad a la infección por el Virus de la Hepatitis C.

Investigador principal: Luis Miguel Real Navarrete

Entidad Solicitante:

Pública Andaluza para la Gestión de la Investigación en Salud de Sevilla (Fisevi)

Responsable de la entidad: Sandra Leal González

Dirección: Avda Manuel Siurot s/n. Edificio de laboratorio, 6ª planta.

Ciudad: Sevilla

Tfno: +34 955 01 25 70

2. Resumen del proyecto:

Objetivos: Identificar factores genéticos relacionados con el metabolismo lipídico involucrados en la susceptibilidad a la infección por VHC.

Metodología:

Se realizará un estudio de asociación génica en tres fases: Descubrimiento, validación y confirmación. En la fase de descubrimiento se utilizarán los datos genotípicos de 108 variantes génicas relacionados con el metabolismo lipídico en 400 pacientes infectados por VHC procedentes de un estudio previo realizado por nuestro grupo y datos de un GWAS realizado por el investigador principal en 800 individuos representantes de la población española. Aquellas variantes que muestren diferencias significativas en la distribución alélica (poco representadas en la población de infectados) serán de nuevo estudiadas en otra población de 300 controles poblacionales y 300 individuos infectados. Las variantes que sean validadas (barridas de nuevo en la población de infectados) se analizarán en una población de 50 individuos resistentes a la infección por el VHC. Las variantes confirmadas (sobre-representadas en la población de resistentes) serán consideradas factores de resistencia. Se estudiará el efecto de las variables validadas sobre la expresión de los genes a los que se ligan mediante técnicas de RT-qPCR, así como la posibilidad de ser consideradas nuevas dianas terapéuticas en prevención/curación de la infección por VHC.

3. Memoria del proyecto:

Justificación, antecedentes y estado actual del tema (máximo tres páginas):

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa clínicamente muy variable, que afecta al 2-3% de la población mundial. En un 75% de los afectados, la infección se cronifica, pudiendo evolucionar a cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Actualmente, estas complicaciones derivadas de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) son la primera causa de trasplante hepático en Europa y Estados Unidos. La erradicación del VHC mediante el tratamiento antiviral es la única forma de prevenir estas patologías en los individuos infectados. Aunque el desarrollo de los nuevos agentes antivirales directos (AAD) ha mejorado considerablemente las perspectivas de curación en individuos con infección crónica, consiguiendo unas tasas de respuesta viral sostenida (RVS) del 75-90%, este tratamiento supone un coste por paciente muy alto, lo que, por una parte, constituye un problema considerable para el sistema público de salud, y por otra, imposibilita su aplicabilidad a todos los pacientes de forma global [1]. Esto, junto al hecho de que un alto porcentaje de pacientes infectados por el VHC desconoce que lo está, y al incremento de nuevos casos de infección por vía sexual en pacientes infectados por VIH que se ha observado en las últimas décadas en muchos países [2], sugiere que la infección por VHC puede necesitar décadas para ser controlada a nivel mundial.

Una proporción muy pequeña de los individuos expuestos al VHC no se infectan por el virus ni muestran seroconversión [3]. Estos individuos expuestos no infectados (ENI) parecen tener algún tipo de protección a la infección por VHC. Inicialmente, estos fenómenos se relacionaron con una baja dosis del inóculo viral, y/o con una eficiente respuesta inmune celular en detrimento de la humoral [4, 5]. Este tipo de respuesta inmune podría estar genéticamente determinada. De esta forma, se ha descrito una sobre-representación de ciertos alelos de KIR2DL3 y su ligando, HLA-C1, en pacientes expuestos al VHC pero seronegativos [6].

Otra posible explicación para este fenómeno de protección a la infección por VHC podría ser una baja susceptibilidad natural a la infección. Esto, podría estar también genéticamente determinado, tal como ocurre en los individuos ENI al VIH que presentan la mutación delta 32 en el gen *CCR5*. Existen pocos datos referentes a este aspecto en el campo de la infección por VHC [7]. No obstante, un estudio *in vitro* demostró que 3 polimorfismos naturales del gen *PPIA* (peptidyl-prolyl isomerase A) abolían la replicación del VHC [8]. Este gen codifica para la Ciclofilina A, un factor del huésped esencial para la replicación del VHC y, posiblemente, también para su ensamblaje. Estos polimorfismos (SNPs) desestabilizan la Ciclofilina A y promueven su degradación. A pesar de estas evidencias, no se han identificado individuos homocigotos para estos polimorfismos en una cohorte bien caracterizada de individuos ENI al VHC [9].

El proceso de infección por este virus ha sido relacionado con el metabolismo lipídico del huésped. Aunque todavía no se conocen en detalle los mecanismos moleculares implicados, hay pruebas de que el VHC se transporta por el suero del huésped en el interior de partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), haciendo inalcanzable la partícula viral a los anticuerpos y las proteínas del complemento [10]. Las partículas de VLDL son procesadas por la lipasa de lipoproteínas que hidrolizan los triglicéridos del núcleo de la partícula dando lugar a lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL). Una gran proporción (70%) de IDL pasa al interior de los hepatocitos a través de la interacción entre el receptor de LDL (LDLR) y la apolipoproteína E (ApoE) de las partículas de IDL. El resto de IDL en circulación es convertido a LDL por la lipasa hepática que reduce la cantidad de triglicéridos y permite la interacción entre LDLR y la apolipoproteína B (ApoB) de las partículas de LDL. De esta forma LDLR actuaría como puerta de entrada del VHC al hepatocito, junto con otras proteínas que han demostrado implicaciones en este proceso, tales como SRB1 (scavenger receptor class B1), CD-81 (Cluster of Differentiation 81), Claudina-1 (CLDN1) y ocludina (OCLN) [11].

Existen varias evidencias que apoyan el papel de LDLR en la entrada del VHC al hepatocito: i) células carentes de LDLR han mostrado resistencia al virus [12]; ii) la inhibición de LDLR mediante ARN interferente disminuye la infectividad del VHC [13]; iii) estudios de partículas virales de VHC han determinado que aquellas partículas de VHC recubiertas con apolipoproteínas B y E presentan una mayor infectividad [14]; iv) existe una correlación entre los niveles de ARN de VHC en el hepatocito y los niveles de ARNm de LDLR y la eficiencia de entrada de LDL [15], v) el LDLR soluble tiene un efecto inhibitorio sobre la infectividad del VHC [15]; y vi) el VHC estimula la expresión de LDLR e inhibe la expresión de PCSK9, una proteína que facilita la degradación de LDLR [16]. Además, el bloqueo con anticuerpos monoclonales de LDLR provoca un descenso de la replicación del virus sugiriendo un papel adicional de LDLR en las fases del ciclo de VHC posteriores a la entrada del virus [13].

Dada la probable asociación entre el metabolismo de lípidos mediado por LDLR y la infección por VHC, muchos estudios se han centrado en el posible efecto de alteraciones en este metabolismo y su relación con el desarrollo de la infección por VHC. De esta forma, nuestro grupo ha identificado una asociación entre el aumento de los niveles de LDL en plasma y una mayor probabilidad de RVS tras el tratamiento con Interferón-Pegilado (IFN-Peg) y ribavirina (RBV) [17]. Así mismo, nuestro equipo, y otros grupos, también han identificado polimorfismos en el gen LDLR asociados a niveles de LDL en plasma de pacientes infectados por VHC, que se asocian también a la RVS en pacientes tratados con IFN-Peg/RBV [17-20], al aclaramiento viral espontáneo [20] y a la carga viral [21].

A pesar de todos los estudios realizados con variantes de LDLR; el papel de este gen, y de otros relacionados con él, e implicados en el metabolismo lipídico

en general; nunca se han realizado estudios de asociación génica para determinar la posible implicación de los mismos en la susceptibilidad a la infección por VHC. La mejor aproximación para realizar estos estudios sería incluir una población bien caracterizada de individuos ENI. Sin embargo, la identificación de este fenotipo es difícil por dos causas: i) la probabilidad de haber estado expuesto al virus es complicada de estimar; y ii) estos individuos no acuden a las consultas al no tener síntomas de la enfermedad. A pesar de ello, es de esperar que una variante genética que esté relacionada con la protección a la infección tendría que estar presente en una muestra poblacional, mientras que se encontraría barrida en una muestra de pacientes infectados. Esta circunstancia permitiría realizar estudios de asociación génica para identificar estas variantes usando pacientes infectados y una muestra poblacional control. Esta fue la estrategia que se siguió para la confirmar el efecto protector frente a la infección por el VIH de la mutación delta 32 del gen CCR5 [22], y recientemente, también, para buscar otras variantes con efecto similar en la misma patología infecciosa [23].

El descubrimiento de factores genéticos asociados a una posible protección a la infección por este virus sería de vital importancia para desarrollar nuevas estrategias de prevención que ayuden a controlar la aparición de nuevos casos. Además, este conocimiento podría abrir nuevas estrategias de tratamiento que pudieran sustituir o complementar a las actuales. Todo ello limitaría la incidencia de enfermedades hepáticas derivadas de la infección por el VHC con el consiguiente beneficio para la salud pública.

Bibliografía (máximo una página):

1. Only just the beginning of the end of hepatitis C. *Lancet* 2014; 383:281.
2. Kirby T, *et al.* New HIV diagnoses in London's gay men continue to soar. *Lancet* 2013; 382:295.
3. Post JJ, *et al.* Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis* 2004; 189:1846-1855.
4. Werner JM, *et al.* Innate immune responses in hepatitis C virus-exposed healthcare workers who do not develop acute infection. *Hepatology* 2013; 58:1621-1631.
5. Cameron B, *et al.* Correlates and characteristics of hepatitis C virus-specific T-cell immunity in exposed uninfected high-risk prison inmates. *J Viral Hepat* 2013; 20:e96-106.
6. Knapp S, *et al.* Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus. *Hepatology* 2010; 51:1168-1175.
7. Mina MM, *et al.* Resistance to hepatitis C virus: potential genetic and immunological determinants. *Lancet Infect Dis* 2015; 15:451-460.
8. von Hahn T, *et al.* Hepatocytes that express variants of cyclophilin A are resistant to HCV infection and replication. *Gastroenterology* 2012; 143:439-447 e431.
9. Sugden PB, *et al.* Exploration of genetically determined resistance against hepatitis C infection in high-risk injecting drug users. *J Viral Hepat* 2014.
10. Bartenschlager R, *et al.* Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011; 19:95-103.
11. deLemos AS, *et al.* Hepatitis C treatment: an incipient therapeutic revolution. *Trends Mol Med* 2014; 20:315-321.
12. Agnello V, *et al.* Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:12766-12771.
13. Albecka A, *et al.* Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 2012; 55:998-1007.
14. Labonte P, *et al.* PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology* 2009; 50:17-24.
15. Molina S, *et al.* The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 2007; 46:411-419.
16. Syed GH, *et al.* Hepatitis C virus stimulates low-density lipoprotein receptor expression to facilitate viral propagation. *J Virol* 2014; 88:2519-2529.
17. Pineda JA, *et al.* Low-density lipoprotein receptor genotyping enhances the predictive value of IL28B genotype in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *Aids* 2011; 25:1415-1420.
18. Neukam K, *et al.* Variations at multiple genes improve interleukin 28B genotype predictive capacity for response to therapy against hepatitis C infection. *Aids* 2013; 27:2715-2724.
19. Mas Marques A, *et al.* Low-density lipoprotein receptor variants are associated with spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *Infect Genet Evol* 2009; 9:847-852.
20. Hennig BJ, *et al.* Association of low-density lipoprotein receptor polymorphisms and outcome of hepatitis C infection. *Genes Immun* 2002; 3:359-367.
21. Caruz A, *et al.* Association of low-density lipoprotein receptor genotypes with hepatitis C viral load. *Genes Immun* 2014; 15:16-24.
22. Samson M, *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; 382:722-725.
23. McLaren PJ, *et al.* Association study of common genetic variants and HIV-1 acquisition in 6,300 infected cases and 7,200 controls. *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003515.

Hipótesis:

Existen determinantes genéticos que condicionan una baja susceptibilidad a la infección por el VHC. Dada la estrecha relación que existe entre el metabolismo lipídico y la infección con este virus, planteamos la hipótesis de que deben existir alelos de genes implicados en este metabolismo que pueden condicionar la susceptibilidad para adquirir la infección por este agente en nuestra población.

Objetivos:**Primario:**

Identificar factores genéticos involucrados con la baja susceptibilidad a la infección por VHC.

Secundarios:

1) Analizar si los polimorfismos genéticos asociados a la baja susceptibilidad a la infección por VHC modifican los niveles de expresión de los genes a los que se asocian.

2) Crear una colección de muestras biológicas de pacientes expuestos a la hepatitis C no infectados en donde realizar estudios de asociación génica masiva para identificar factores genéticos relacionados con el fenotipo de resistencia.

Metodología: diseño, sujetos, variables, recogida y análisis de datos y limitaciones del estudio (máximo 3 páginas):

Diseño del estudio: Estudio transversal: estudio de asociación génica en tres fases: Descubrimiento, validación y confirmación.

Sujetos de estudio:

- Pacientes:

Utilizaremos los datos de genotipado de 400 pacientes infectados por VHC procedentes de un estudio previo realizado por nuestro grupo en donde se testaron 144 variables de 40 genes, la mayoría relacionados con el metabolismo lipídico (Neukam y cols. Aids 2013; 27:2715-2724, Real y cols. Liver Int 2014; 34:558-66). Además, se utilizarán 300 pacientes adicionales, elegidos de forma aleatoria, para la fase de validación, que procederán de la colección de muestras disponible en nuestra unidad (Ref ISCIII C.000311). Todos estos pacientes cumplen los siguientes criterios: i) ser caucásicos mayores de edad y seropositivos para el VHC, ii) haber firmado un consentimiento por escrito para participar en estudios genéticos relacionados con su enfermedad, iii) no presentar relación de parentesco con otros enfermos incluidos.

- Controles poblacionales:

Se utilizarán datos genotípicos de un GWAS realizado en 800 individuos representantes de la población española para la fase de descubrimiento (Gayan y cols. BMC Genomics 2010; 11:326-340, Real y cols. PlosOne 2014; 9:e101178). Para la fase de validación se utilizarán 300 muestras de controles poblacionales anonimizados y seleccionadas al azar procedentes del banco de sangre de varios hospitales andaluces.

- Individuos expuestos no infectados (ENI) para el VHC:

Para la fase de confirmación se recolectará, al menos, 30 muestras de individuos ENI para el VHC. Estos deberán cumplir con estos criterios: i) ser caucásico español mayor de edad que consienta en donar muestra para el proyecto, ii) No mostrar parentesco familiar con ninguno de los individuos seleccionados, iii) ser seronegativo para el VHC, iv) ser o haber sido drogadicto por vía parenteral y haber compartido jeringuillas durante al menos 3 meses.

- Controles sanos:

Para los estudios de expresión génica se reclutarán 100 individuos voluntarios del personal sanitario de hospital según los siguientes criterios: i) caucásicos, ii) consentimiento en participar en el presente proyecto, iii) no relacionados entre sí.

Variables de estudio:

- Variable principal: presencia de anticuerpos frente al VHC.

- Variables independientes: De las bases de datos clínicas existentes de los pacientes se extraerán las siguientes variables: Edad, sexo, consumo de drogas, índice de masa corporal, lípidos, infección por VHC y por VIH, genotipo del VHC, carga viral del VHC.

Extracción de ADN

El ADN genómico será aislado de muestras de sangre total utilizando el sistema Qiacube (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La concentración de ADN será calculada por espectrofotometría utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

Genotipación

Las muestras del grupo de descubrimiento ya están genotipadas. Las muestras de controles, pacientes e individuos ENI de las fases de validación y confirmación serán genotipadas para los SNPs seleccionados en el grupo de descubrimiento con el sistema Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Análisis de datos

- Extracción de datos de genotipado de bases de datos:

Para el análisis inicial de la fase de descubrimiento se utilizarán los datos de genotipado de 108 SNPs de genes relacionados con el metabolismo lipídico (*LDLR*, *LDLRAP*, *APOB*, *APOE*, *APOC1*, *PCSK9*, *SP110*, *LPL*, *VLDLR*, *HMGCR*, *DEGS1/NVL*, *LIPC*, *ABCA1*, *CETP* y *NPC1L1*) de pacientes infectados por VHC procedentes de un proyecto realizado previamente por nuestro grupo (Neukam y cols. *Aids* 2013; 27:2715-2724, Real y cols. *Liver Int* 2014; 34:558-66). Los datos genotípicos de controles poblacionales se obtendrán de un GWAS realizado en la población española. (Gayan y cols. *BMC Genomics* 2010; 11:326-340, Real y cols. *PlosOne* 2014; 9:e101178). La extracción de los datos genotípicos de estas bases de realizará con el software Plink (<http://pngu.mgh.harvard.edu/>).

- Controles de calidad de los datos de genotipación

Con el objetivo de detectar muestras de individuos emparentados, muestras contaminadas o duplicadas, tanto en la fase de descubrimiento como en la de validación, se aplicará el programa Graphical Representation of Relationships (GRR) (<http://csg.sph.umich.edu/abecasis/GRR>), descartando las muestras que se revelen como relacionadas. Aquellos SNPs que tengan una tasa de genotipado global menor del 80% en toda la población, una frecuencia del menor alelo menor del 1% y que no cumplan con el equilibrio Hardy-Weinberg ($p < 0.001$) en controles serán descartados. Además, serán descartadas aquellas muestras que tengan más de un 10% de SNPs no genotipados. Estos controles de calidad se realizarán con el software Plink.

- Estudios de asociación

La frecuencia alélica, genotípica, y las desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg en la población control estudiada, así como en los pacientes incluidos, se analizará con el software Plink. De igual forma, con el software Haploview (www.broadinstitute.org/haploview/haploview), se construirán haplotipos con las variantes genéticas que se encuentren en desequilibrio de unión y se estudiará su distribución en controles y casos. Los análisis de asociación entre estas variables génicas (SNPs o haplotipos) y la infección por VHC, se hará mediante Plink, Haploview y las herramientas bioinformáticas disponibles en la red basadas en los algoritmos de Sasieni, según corresponda. Se aplicarán correcciones por testado múltiple (corrección de Bonferroni) para establecer el valor de significación estadística.

Las variables no genéticas serán estudiadas empleando SPSS (IBM Corporation, Somers, NY, USA), llevando a cabo una estadística descriptiva y un análisis univariante de todas ellas tanto para la población control como para el grupo de infectados, analizando las diferencias observadas. Para variables cualitativas: se aplicará las pruebas de la Chi-cuadrado y exacta de Fisher (cuando sea necesario). Para variables cuantitativas se emplearán las pruebas de la t de Student y la U de Mann-Whitney. El nivel de significación estadística se establecerá en $p < 0,05$, y la magnitud de las asociaciones se expresará como odds ratio (OR) con intervalos de confianza al 95%.

Estudios funcionales

Para estudiar si los SNPs asociados a susceptibilidad/resistencia a VHC tienen un efecto en los niveles de expresión en la proteína a la que están asociados, estudiaremos la expresión de estos genes en individuos previamente genotipados para estos SNPs mediante RT-qPCR. Primero, identificaremos mediante genotipado aquellos donantes sanos portadores de los genotipos/haplotipos de riesgo y protección. A continuación se aislarán células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) usando un gradiente de Ficoll. La extracción de ARN se realizará utilizando el RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para evitar la degradación del ARN, el ADNc será inmediatamente sintetizado usando el QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) que incluye un tratamiento previo con DNase. Para evitar la amplificación de ADN, todos los oligos utilizados en la qPCR estarán localizados entre dos exones consecutivos. Los genes *B2M* y/o *RPLP0* serán usados como referencia. El

experimento se realizará por triplicado utilizando la media para calcular el nivel de expresión por el método $\Delta\Delta Cq$.

Para conseguir una potencia del 80% para detectar diferencias en el nivel de expresión de 1,5 veces entre los distintos grupos genotípicos mediante una Prueba T-Student bilateral, con un nivel de significación del 5%, y asumiendo que la desviación típica de ambos grupos es de 0.30 veces la media de la expresión génica, será necesario incluir 9 individuos en cada grupo genotípico. Suponiendo una frecuencia alélica de 0.2 para el alelo menor sería necesario genotipar al menos 100 individuos para asegurarnos la identificación de los 9 individuos homocigotos para el alelo menor. Para el resto de grupos genotípicos (heterocigotos u homocigotos del alelo más frecuente) se elegirán al azar 9 individuos por grupo de los 100 genotipados.

Limitaciones del estudio

El proyecto planteado tiene tres limitaciones a tener en cuenta:

1.- La frecuencia con la que aparecen falsos positivos en los estudios de asociación génica son un problema inherente a este tipo de trabajos. Para minimizar esta limitación, el estudio se ha diseñado con un grupo de validación en el que se deberán replicar todas aquellas asociaciones que se encuentren en el grupo de descubrimiento. Además, se incluye una fase de confirmación con pacientes ENI. Sólo aquellos SNPs asociados con la baja susceptibilidad a la infección a VHC en el grupo de descubrimiento, y que tengan la misma dirección y tamaño de efecto en el grupo de validación, y que sea coherente con lo observado en el grupo de confirmación serán considerados como asociadas al fenotipo de resistencia.

2.- El estudio planteado no utiliza una estrategia de GWAS (libre de hipótesis), por lo que no puede identificar genes insospechados que pueden estar implicados en el fenómeno de baja susceptibilidad a la infección por VHC. A pesar de ello, el estudio se centra en genes candidatos relacionados con una de las rutas metabólicas implicadas con el establecimiento y el mantenimiento de la infección.

3.- Los estudios de asociación planteados no utilizan como controles individuos ENI debido a su bajo número. Los pocos que ENI que se recolecten serán utilizados en una fase de confirmación. Por tanto, es posible que esta fase no tenga la potencia estadística suficiente para ver diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre infectados y ENI. Sin embargo, la observación de una sobre-representación de los alelos asociados a resistencia puede ser clave para dar credibilidad a los resultados que se obtengan de las fases anteriores. El hecho de no utilizar ENI en las fases de descubrimiento y validación limita las posibilidades de éxito a estudios con tamaños muestrales elevados siempre y cuando existan variantes con tamaño de efecto importantes. En un estudio previo en donde se describe un polimorfismo de *IL12B* asociado a protección a la infección con una OR=12 (Hagazy y cols. Clin Exp Immunol. 2008; 152:538-541), se observa una tendencia a la asociación cuando 105 controles poblacionales se comparan con 191 infectados. Teniendo en cuenta estos datos, y suponiendo tamaños de efecto elevados, sería posible descubrir factores genéticos asociados al fenotipo doblando el tamaño muestral del mencionado trabajo (300 infectados vs 300 controles). La existencia de tales variantes en genes del metabolismo lipídico nunca ha sido previamente estudiada, y es posible que estas sean de muy baja frecuencia en la población. La posibilidad de buscar variantes raras no está contemplada en el diseño del estudio por motivos económicos. Aún así, los genes que contengan polimorfismos con tendencia a la asociación y que dicha tendencia fuera replicada en los estudios de validación y confirmación, podrían ser objeto, en el seno de futuros proyectos, de estudios más profundos con técnicas de secuenciación para la identificación de tales posibles variantes raras. No obstante lo anterior, en caso de recolectar suficientes ENI (>100 individuos), los estudio de asociación se llevarían a cabo entre seropositivos y ENI, utilizando los controles para observar desviaciones de las frecuencias alélicas en los grupos de estudio.

5. Experiencia del equipo investigador sobre el tema (máximo una página):

El investigador principal del proyecto tiene una dilatada experiencia en estudios de asociación génica, tanto con abordajes de genes candidatos como con aquellos libres de hipótesis. Respecto a estos últimos, ha dirigido técnicamente las labores de genotipación de varios estudios GWAS, ha diseñado protocolos para la realización de controles bioinformáticos de calidad de los datos crudos generados por estas técnicas, y ha realizado análisis meta-GWAS en las siguientes patologías: esclerosis múltiple (Matesanz y cols. PlosOne 2012, 7: e36140), enfermedad de Alzheimer (Perez y cols. Genome Med. 2011, 3:33-40; Martinez-Mir y cols. J Alzheimers Dis. 2013, 35:403-12) y cáncer de colon (Real y cols, PlosOne 2014, 9:e101178). Además ha diseñado y ejecutado GWAS para terceros desde la empresa Biotecnológica Neocodex de la que fue Director técnico, en las siguientes patologías: Osteoporosis, respuesta a tratamientos en individuos infectados por el VHC, enfermedades cardiovasculares, y enfermedad de Parkinson. Parte de estos estudios permitieron llevar a cabo la primera descripción de la estructura genética de la población española (Gayán y cols. BMC Genomics 2010, 11:326-340). Por otra parte, ha contribuido al diseño de una de las primeras herramientas existentes para la identificación de epistasis a partir de datos de genotipación masiva (Gayán y cols. BMC Genomics 2008, 9:360-73), realizando uno de los primeros estudios de asociación digénica en la enfermedad de Parkinson (González-Pérez y cols. Neurogenetics 2009, 10:173-81). Además ha participado y dirigido estudios de genes candidatos a partir del análisis de datos de múltiples estudios de GWAS (Martinez-Mir y cols. J Alzheimers Dis. 2013, 35:403-12). En el campo de las enfermedades infecciosas ha realizado estudios sobre genes involucrados en la resistencia a la infección por VIH-1 (Real y cols, AIDS, 2015; 29:1895-7; Herrero y cols, Genes Immun. 2015, 16:134-41; Sironi y cols PlosOne 2014, 9:e106442) y sobre el efecto de ciertos polimorfismos en el riesgo a padecer enfermedades hepáticas relacionadas con la infección por VHC (Real y cols. Liver Int. 2014, 34:558-56; Macías y cols. AIDs 2015, 29:1927-35).

6. Capacidad del proyecto de fomentar sinergias en GEHEP. Beneficios esperados para el Grupo (máximo una página):

Una tarea importante programada en el proyecto consiste en recolectar individuos ENIs con el objetivo de llevar a cabo la fase de confirmación. Además, como objetivo secundario, se pretende crear una colección competitiva de ENIs que sirva de plataforma básica para el desarrollo de proyectos de investigación encaminados a entender todos los factores genéticos importantes implicados en el proceso infeccioso para poder desarrollar estrategias de prevención. Para ello, y debido al escaso número de estos individuos, será necesario la colaboración del mayor número posible de investigadores clínicos, por lo que se invitará a participar a cuantos miembros de GEHEP quieran hacerlo. Esta colección significará, por tanto, una ventaja competitiva para este grupo en este campo de investigación tanto en el ámbito nacional como en el internacional

7. Plan de difusión y divulgación (máximo una página):

La difusión de los resultados obtenidos en este proyecto se llevará a cabo principalmente mediante su publicación en revistas de prestigio en el campo de las Enfermedades Infecciosas, priorizando las correspondientes al primer cuartil. Se espera conseguir al menos 1 publicación de alto impacto. Asimismo, se presentarán los resultados obtenidos en reuniones y congresos. Se priorizarán uno o dos congresos internacionales (CROI y Congreso de la EASLD) y uno nacional (GEHEP).

Por otra parte, puesto que el conocimiento a generar puede, por una parte, servir para clasificar a los individuos según su riesgo de ser infectados, y, por otra, ser la base para el establecimiento de nuevas estrategias terapéuticas, se priorizará la protección de este conocimiento mediante patente en caso de éxito.

Por otra parte, las expectativas de descubrir genes humanos “drogables” con repercusión real en la inhibición del establecimiento de la infección abre la posibilidad de desarrollos farmacológicos que pueden derivar en el establecimiento de planes de negocios asociados a iniciativas “Spin-off” o a la transferencia de los resultados, bajo licencia o acuerdos de colaboración, a empresas farmacéuticas interesadas en su desarrollo.

8. Presupuesto solicitado. Justificación detallada de las diferentes partidas:

Desglose presupuestario:

- 1. Gastos de Personal.....
- 2. Gastos de Ejecución
 - A) Adquisición de bienes y contratación de servicios
 - B) Gastos de Viajes
 - Asistencia a congreso Nacional 1000 euros
 - Asistencia a congreso internacional 5000 euros

Subtotal
Costes indirectos.....
Total.....

Justificación:

9. Aplicabilidad del proyecto. Antecedentes del investigador principal y del equipo investigador en la aplicación de resultados de proyectos anteriores (máximo 1 página):

La identificación de los factores genéticos asociados a la protección natural frente a la infección por el VHC es esencial para que entendamos el mecanismo por el que se produce la infección de este virus y, en consecuencia, para conocer cómo es posible evitarla. En este sentido, los hallazgos potenciales de una acción de este tipo, son transferibles y orientables en el futuro a la salud del ciudadano. Efectivamente, la caracterización de estos factores podría llevar a sentar las bases para identificar nuevas dianas para el diseño de vacunas contra la hepatitis C. Igualmente, conocer cómo se evita la infección de nuevas células por el VHC podría ayudar a buscar nuevas estrategias terapéuticas que complementen a las actuales. Así, las herramientas terapéuticas actualmente disponibles se basan en interferir la replicación del VHC una vez ha infectado al hepatocito. Abordajes que impidan la infección de nuevas células podrían ayudar o sustituir a éstos. Además, la identificación de SNPs que permitan estratificar el riesgo de infección de individuos concretos dentro de colectivos específicos, como los usuarios de drogas parenterales o las parejas sexuales de individuos infectados, puede tener también interés práctico, en el caso de adoptar medidas de prevención, tales como vacunas, que por su coste o limitada disponibilidad no fueran aplicables a la población global. En este sentido, la estratificación del riesgo con ayuda de SNPs es una estrategia aplicable en un gran número de centros asistenciales de forma rápida y sin necesidad de grandes inversiones por parte del sistema público de salud.

El investigador principal tiene una experiencia de más de 15 años en el campo de la genética de las enfermedades complejas, siendo coautor de 6 patentes y más de 75 artículos científicos. Además ha sido IP de 2 proyectos financiados en convocatorias competitivas en los últimos 5 años. Fruto de esta actividad es el descubrimiento de dianas terapéuticas para obesidad, Alzheimer y cáncer que han suscitado el interés de la industria farmacéutica promoviendo la creación de la compañía Landsteiner GenMed S.L. para el desarrollo de prefármacos en estas enfermedades. Actualmente la compañía tiene un fármaco para obesidad en preclínica regulatoria y tiene programado la obtención del permiso para ensayos clínicos en humanos en menos de dos años.

El grupo de investigación al que pertenece el IP tiene una dilatada experiencia en el diseño y ejecución de proyectos de investigación relacionados con las infecciones por el VIH y el VHC, tal y como viene avalado por su curriculum vitae.

Anexo 1. Informe del comité ético de referencia:



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

ÁREA HOSPITALARIA DE VALME

INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN SEVILLA SUR

D. BERNARDO SANTOS RAMOS

Secretario del Comité de Ética de la Investigación Sevilla Sur del Hospital Universitario de Valme de Sevilla

CERTIFICA:

Que este Comité a evaluado los aspectos éticos sobre el proyecto titulado:

“Exploración de las bases genéticas de la resistencia a la infección por el virus de la hepatitis C” VHCRES.

CODIGO INTERNO: 0422-N-16

Cuyo investigador principal es:

D^a. Luis Miguel Real Navarrete.

Aunque se le informa que el modelo de consentimiento informado aprobado es el modelo nº 2.

Lo que firmo en Sevilla a 29 de marzo de 2016.


Fdo.: Bernardo Santos Ramos
Secretario del Comité de Ética de la
Investigación Sevilla Sur

Anexo 2. Copia del consentimiento informado:

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

La infección por el VIH es una enfermedad causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que destruye el sistema inmunitario de forma gradual, lo cual hace que para el cuerpo sea más difícil combatir las infecciones.

La Hepatitis Vírica es una enfermedad infectocontagiosa producida por infección con el Virus de la Hepatitis (VH). Afecta al hígado, provocando su inflamación y mal funcionamiento.

Para lograr una mejora de los tratamientos actuales y futuros, así como de la calidad de vida de las personas afectadas por esta patología es fundamental disponer de muestras biológicas de pacientes para que a partir de ellas se puedan investigar y estudiar las causas implicadas en la infección y el desarrollo de esta enfermedad. Se entienden como muestras biológicas cualquier material biológico de origen humano susceptible de conservación, incluyendo los que pueda albergar información sobre la dotación genética característica de una persona

En relación al seguimiento de la cohorte de pacientes infectados por VIH y/o virus de las hepatitis (V H) que se lleva a cabo en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario de Valme, que el Dr..... le ha explicado, se le solicita su participación colaborando con la cesión de su material biológico.

Si usted decide participar, coincidiendo con otras analíticas que tenga que hacerse en el hospital, se le extraerán 3 ml de sangre, para el almacenamiento de la misma y de sus productos derivados (suero, células mononucleares de sangre periférica y sangre total) en la Colección de muestras biológicas de origen humano con fines de investigación biomédica de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario de Valme. Esta Colección, cuyo responsable es el Dr. Juan Antonio Pineda Vergara, está situada en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Virgen de Valme (Sevilla) y contiene muestras biológicas de diversa índole. Las muestras almacenadas se utilizan en proyectos de investigación sobre la infección por el VIH y los VH, previamente aprobados por el comité de Ética y por el comité de Investigación del Hospital Universitario Virgen de Valme. Su material biológico permanecerá en la colección hasta su utilización en proyectos. En caso necesario, si hubiera entrada o salida de las muestras de la Colección estas seguirían lo estipulado en la normativa actual vigente, protegiendo los datos de carácter personal del individuo y garantizando la confidencialidad de los datos.

Del suero y de sus células se podrán estudiar las características del VIH y de los VH que causan su infección. Por otro lado, de sus células se podrá extraer ADN, que se utilizará para investigar las características de su persona que puedan explicar el curso y desarrollo de su enfermedad causada por el VIH y los VH. Las diferencias entre el ADN de unas personas y otras podrían explicar las diferencias en el desarrollo de la infección por el VIH y los VH. El análisis del ADN permite determinar las características físicas personales, de modo que a partir de él se puede obtener información acerca de su salud.

La toma de muestras de sangre se llevará a cabo de forma similar a otros análisis que le hayan sido realizados. Como probablemente sabrá, la extracción puede provocar una molestia en el punto en que se introduce la aguja en la piel, y a veces puede ocasionar un pequeño hematoma que suele desaparecer en pocos días. Ocasionalmente, puede producir mareo.

Las muestras biológicas almacenadas en esta Colección podrán utilizarse para la investigación biomédica en los términos que prescribe la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y se custodiarán.

Se le pide su consentimiento para que con su sangre se realice:

1. Un almacenamiento de material biológico (suero, células mononucleares de sangre periférica o sangre total) por un tiempo indefinido.
2. Análisis y estudios en dichas muestras, entre ellos los análisis de ADN, también llamados de carácter genético.

La cesión de estas muestras tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta investigación. En todo caso, usted renuncia a cualquier beneficio económico que pudiera corresponderle en el futuro y que sea, lógicamente, renunciable. Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo como resultado de su participación en esta Colección. Sin embargo, todos los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de sus muestras y de las de muchas otras personas participantes en esta Colección, supondrán una fuente valiosa de información que revertirá en un mejor conocimiento de su patología, con el consiguiente avance médico y la mejora del cuidado de los pacientes afectados por esta enfermedad.

Los datos obtenidos de las muestras no le serán comunicados, excepto en el caso de que los hallazgos tengan una implicación significativa en su salud y exista una posibilidad real de mejora. En este caso, tendrá derecho a conocer todo tipo de datos, incluidos los genéticos, que se obtengan a partir de sus muestras. Los resultados serán analizados por grupos de investigadores y expertos. A partir de los datos derivados de sus muestras se puede obtener información sobre su salud, y usted tiene derecho a decidir sobre la comunicación de estos resultados y, si usted lo desea, ejercitar su potestad de no ser informado. No obstante, cuando esta información, según criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a su representante, previa consulta del comité de ética asistencial. En cualquier caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para esta finalidad. Si concurrieran las circunstancias y así fuera necesario, en el caso de necesitarse la cesión de datos de carácter personal a terceros ajenos a la actuación medico-asistencial o a una investigación biomédica, se le requerirá el consentimiento expreso y por escrito.

Su participación es voluntaria y usted es libre de solicitar la retirada de sus muestras de la Colección, siempre y cuando éstas no hayan sido anonimizadas y por tanto sean imposibles de identificar o se hayan incorporado a proyectos de investigación ya iniciados. La solicitud de retirada de sus muestras puede llevarse a cabo por cualquier motivo, sin tener que dar ninguna explicación y sin que repercuta negativamente sobre su tratamiento futuro. Para solicitarla retirada de sus muestras comunique esta decisión a su médico. En este caso, se procedería a la destrucción de las muestras. Sin embargo, esta destrucción no se hará extensible a los datos de las investigaciones que ya se hayan realizado previamente con las muestras.

Los datos personales que se registren sobre usted, serán confidenciales y se tratarán conforme a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y el resto

de legislación sanitaria y relativa a la investigación biomédica vigente, tratándose únicamente de acuerdo con los objetivos descritos en el presente comunicado.

Cualquier relación entre la muestra y su identidad personal tiene carácter estrictamente confidencial. Asimismo, se le informa de que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle, manteniéndose en todo momento su confidencialidad. El responsable de esta Colección garantizará la trazabilidad y seguridad de las muestras biológicas almacenadas, asegurando las normas de calidad y seguridad y respetando el deber de confidencialidad y lo dispuesto en la LOPD 15/1999.

De esta *Hoja de Información y Consentimiento Informado* se expedirán dos ejemplares firmados: uno para usted y otro para su médico que lo guardará en su historia clínica. Se contempla la posibilidad de que personal acreditado por las Autoridades Sanitarias Españolas y/o representantes del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital puedan realizar una auditoria de las muestras pertenecientes a pacientes participantes en esta Colección para comprobar que su recopilación se está llevando a cabo de forma correcta desde el punto de vista ético y científico, siempre dentro de la más estricta confidencialidad. No dude en recabar más información o en hablar con su médico para aclarar cualquier duda, tanto al inicio del estudio como en cualquier momento a lo largo del mismo.

CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA SU PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO EN LA COLECCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DE ORIGEN HUMANO

YO,

Declaro que:

1. He leído la Hoja de Información que me ha sido entregada.
2. He podido hacer preguntas sobre la obtención de material biológico, su almacenamiento y el análisis de las muestras.
3. He hablado y he aclarado las dudas con el Dr.....
4. Entiendo que mi participación es voluntaria.
5. Comprendo que puedo solicitar la destrucción de mis muestras en cualquier momento, sin tener que ofrecer explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos futuros.

Por favor, firme donde proceda:

- Doy mi consentimiento para que se me realice la extracción de material biológico y el almacenamiento de sus componentes en la Colección de muestras biológicas de origen humano con fines de investigación biomédica.

Fecha:

Nombre del participante:

Firma del participante:

- Si usted desea incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras, indíquelo a continuación.

.....

- Quiero ejercer mi derecho a no ser informado de los resultados obtenidos con os estudios realizados con mis muestras, incluso cuando los hallazgos tengan una implicación significativa en mi salud y exista una posibilidad real de mejora (firmar sólo si procede) .

Firma:

Nombre del participante:

Firma del participante:

(A firmar por el personal que informa al participante. Firma y cumplimentación obligatoria)

Fecha:

Nombre del investigador que informa:

Firma del investigador:

Miembros del equipo investigador:		
Investigador principal		
Nombre y apellidos: Luis Miguel Real Navarrete	Centro de trabajo H.U. Valme	Firma: 
Resto de investigadores		
Nombre y apellidos:	Centro de trabajo	Firma
Nombre y apellidos:	Centro de trabajo	Firma
Nombre y apellidos:	Centro de trabajo	Firma
Nombre y apellidos:	Centro de trabajo	Firma
Nombre y apellidos:	Centro de trabajo	Firma
Nombre y apellidos:	Centro de trabajo	Firma
Nombre y apellidos:	Centro de trabajo	Firma
Nombre y apellidos:	Centro de trabajo	Firma

*** Se adjuntaran los curricula vitae en formato FIS o generados mediante el editor de CVN de FECYT.**