



Máster en biotecnología avanzada.

Curso académico 2016-2017

Cuantificación del ADN mitocondrial en plasma en pacientes con infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Quantification of mitochondrial DNA in plasma in Human Immunodeficiency Virus (HIV) infected patients.

Sofía Ortún Capellán

A Coruña, 27 de enero de 2017

Trabajo de Fin de Master dirigido por la Dra. Eva Poveda López





Facultad donde se presenta el trabajo de final de máster: Universidade da Coruña.

Empresa donde se realizó el trabajo de final de máster: Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

Dra. Eva Poveda López en calidad de tutora de este trabajo de final de máster autoriza su presentación ante el Tribunal Evaluador.

Firma:

A Coruña, 27 de enero de 2017.



CONTENIDO:

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS	IV
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	VII
PALABRAS CLAVE.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
KEY WORDS	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. GENERALIDADES DEL VIH.....	1
1.1.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	1
1.1.2. Estructura del virus del VIH.....	1
1.1.3. Ciclo viral del VIH.....	3
1.1.4. Epidemiología molecular y variabilidad genética del VIH	4
1.2. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIH	4
1.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VIH.....	6
1.4. TRAMIENTO ANTIRRETROVIRAL.....	6
1.5. MITOCONDRIA	7
1.5.1. Estructura y función	7
1.5.2. Daño mitocondrial.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. Sujetos de estudio.....	10
3.2. Obtención y procesado de las muestras.....	10
3.3. Extracción del ADNmt.....	11
3.4. Cuantificación del ADNmt.....	12
3.5. Análisis estadístico.....	13
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSIÓN.....	18
6. CONCLUSIONES.....	21
AGRADECIMIENTOS	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23
• Artículos:.....	23
• Páginas Web:.....	26
ANEXOS.....	27
ANEXO I.- Modelo de Consentimiento Informado.....	27
ANEXO II: Hoja de recogida de datos.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del virus del VIH.	2
Figura 2: Estructura y organización del genoma del VIH.	2
Figura 3: Ciclo viral del VIH.	3
Figura 4: Historia natural de la infección por VIH.	5
Figura 5: Estructura y organización del genoma mitocondrial..	8
Figura 6. Técnica de centrifugación diferencial con Ficoll.	11
Figura 7: Proceso de extracción de ácidos nucleicos en un sistema de columnas sílica gel.	11
Figura 8: Comparación de los niveles de ADNmt entre pacientes VIH.	15
Figura 9: Correlación entre los niveles de ADNmt y los niveles de ARN-VIH y el recuento de linfocitos T-CD4+	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Datos epidemiológico globales de SIDA en 2015	6
Tabla II: Características basales de la población estudiada.	14
Tabla III: Niveles de ADNmt según recuento de linfocitos T-CD4+ y régimen de TAR.	16

LISTADO DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ARN	Ácido ribonucleico
ARN-VIH	Carga viral del Virus de la Inmunodeficiencia Humana
ATP	Adenosín trifosfato
CHUAC	Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña
CRFs	Forma recombinante circular (<i>Circulating recombinant form</i>)
C _T	Ciclo umbral
DNQ	Detectable no cuantificable
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE.UU.	Estados Unidos
HBsAg	Antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
IE	Inhibidores de entrada
IIN	Inhibidores de la integrasa
IN	Integrasa
IP	Inhibidores de la proteasa
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos
ITINAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos
LTR	Repetición Terminal Larga (<i>Long Terminal Repeat</i>)
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	MiliMolar
mm ³	Milímetro cúbico
ND	No detectable ni cuantificable
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONUSIDA	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA
pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate saline buffer</i>)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PR	Proteasa

RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa inversa
SERGAS	Servicio Gallego de Salud
SIDA	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida
TAR	Tratamiento Antirretroviral
URFs	Formas Recombinantes Únicas (<i>Unique Recombinant Forms</i>)
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
μL	Microlitro

RESUMEN

Objetivos: Evaluar los niveles de ADN mitocondrial (ADNmt) circulante en plasma en pacientes con infección por VIH y su posible implicación como biomarcador del estado inmunológico-viroológico.

Métodos: Estudio observacional realizado en una cohorte de pacientes con infección crónica por VIH, en seguimiento clínico en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). El ADNmt se aisló a partir de plasma usando *DNAeasy blood & tissue kit*. Los niveles de ADNmt se midieron empleando un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real analizando el número de copias de gen ribosómico 12S mitocondrial. Además, se evaluó la carga viral del VIH (ARN-VIH) y el recuento de linfocitos T-CD4+ de cada una de las muestras. Se incluyeron variables epidemiológicas y clínicas de los pacientes para el análisis.

Resultados: Se incluyeron 235 pacientes con infección por VIH. El 31,9% eran naïve a tratamiento antirretroviral (TAR) mientras que el resto de los pacientes recibían TAR. Dentro de este último grupo presentaban: el 20,9% niveles de ARN-VIH entre 20-200 copias/mL, el 23% niveles inferiores a 20 copias/mL (detectable no cuantificable, DNQ) y el 24,2% viremia no detectable (ND). Los niveles de ADNmt en los diferentes grupos de pacientes fueron: 217 ± 656 copias/ μ L en pacientes naïve, 149 ± 440 copias/ μ L en pacientes con ARN-VIH entre 20-200 copias/mL, 265 ± 723 copias/ μ L en DNQ y 643 ± 1310 copias/ μ L en ND ($p = 0,045$). Los niveles plasmáticos de ADNmt entre los pacientes ND y los naïve presentaron diferencias significativas ($p = 0,010$). Los niveles de ADNmt se asociaron de forma inversa con los niveles de ARN-VIH (*Spearman's rho* -0,191, $p = 0,003$) y de forma directa con el recuento de linfocitos T-CD4+ (*Spearman's rho* 0,131, $p = 0,046$).

Conclusión: Los pacientes VIH que habían alcanzado la supresión virológica con TAR tenían niveles más altos de ADNmt que los pacientes naïve. Por otra parte, los niveles plasmáticos elevados de ADNmt se asociaron con menores niveles de ARN-VIH y mayor recuento de linfocitos T-CD4+. Estos datos sugieren que los niveles de ADNmt podrían ser un marcador de la replicación del VIH.

PALABRAS CLAVE

ADN mitocondrial, infección VIH, bajos niveles de viremia, linfocitos T-CD4+.

ABSTRACT

Objective: To evaluate plasma mitochondrial DNA (mtDNA) levels among HIV-patients and its potential role as biomarker of immune-virological status.

Methods: An observational study performed in a cohort of patients with chronic HIV infection in follow-up at the Hospital Complex of A Coruña. DNA was isolated from plasma using DNAeasy blood&tissue kit (Qiagen, Germany) and mtDNA levels were assessed using a quantitative Real-Time PCR assay by measuring the copy number of mitochondrial 12S ribosomal RNA gene. In addition, HIV-RNA and lymphocytes T-CD4+ counts were evaluated in the same blood sample.

Results: A total of, 235 HIV-patients were included. Overall, 31,9% were naïve while the remaining patients were under ART: 20,9% with 20-200 copies/mL of HIV-RNA, 23% had HIV-RNA <20 copies/mL (detected not quantified-DNQ) and 24,2% had HIV-RNA not-detected (ND). Mean plasma mtDNA was 149±440 copies/μL for 20-200 copies/mL of HIV-RNA, 217±656 copies/μL for naïve, 265±723 copies/μL for DNQ, and 643±1310 copies/μL for ND (p=0,045). In addition, differences were observed between plasma mtDNA levels among ND HIV-patients compared with naïve (p=0,010) and also with 20-200 copies/mL of HIV-RNA under ART (p=0,057). Interestingly, mtDNA levels were inversely associated with HIV-RNA levels (Spearman's rho -0,191, p=0,003) and directly associated with lymphocytes T-CD4+ count (Spearman's rho 0,131, p=0,046).

Conclusions: HIV-patients with a complete virological suppression under ART had significant higher mtDNA levels than naïve patients. Moreover, Increased plasma mtDNA levels are associated with lower HIV-RNA levels and higher lymphocytes T-CD4+ count. These data suggest that plasma mtDNA levels could be a surrogate marker of HIV replication.

KEY WORDS

Mitochondrial DNA, HIV infection, low level viremia, lymphocytes T-CD4+.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.GENERALIDADES DEL VIH

1.1.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus* y fue identificado como el agente etiológico del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) por Barré-Sinoussi y Luc Montagnier (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983), trabajo por el cual obtuvieron el Premio Nobel de Medicina en 2008.

La infección por VIH se caracteriza por un deterioro progresivo del sistema inmunológico como consecuencia de un descenso paulatino del nivel de linfocitos T-CD4+, la principal diana de este virus (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Popovic, 1983). A medida que evoluciona la infección se produce un deterioro progresivo del sistema inmunológico que favorece la aparición de infecciones por microorganismos patógenos u oportunistas.

1.1.2. Estructura del virus del VIH

Morfológicamente, los viriones del VIH son esféricos con un diámetro que varía entre 80-110 nm (**Figura 1**). Estructuralmente los viriones se dividen en varias capas. La envuelta viral es una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula huésped en la que se insertan las glucoproteínas gp120 y gp41 implicadas en la interacción del virus con los linfocitos T-CD4+. A continuación, se dispone la matriz, constituida por la proteína p17 (MA o de la matriz), seguida de la cápside formada por la proteína p24 (CA o de la cápside) y por la proteína p6. La cápside contiene en su interior una nucleocápside que alberga el material genético del virión, las enzimas necesarias para el ciclo viral [transcriptasa inversa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PR)] y las proteínas reguladoras Vif, Vpr y Nef. (Emerman *et al.*, 1998; Varmus, 1998; Seelamgari *et al.*,2004)

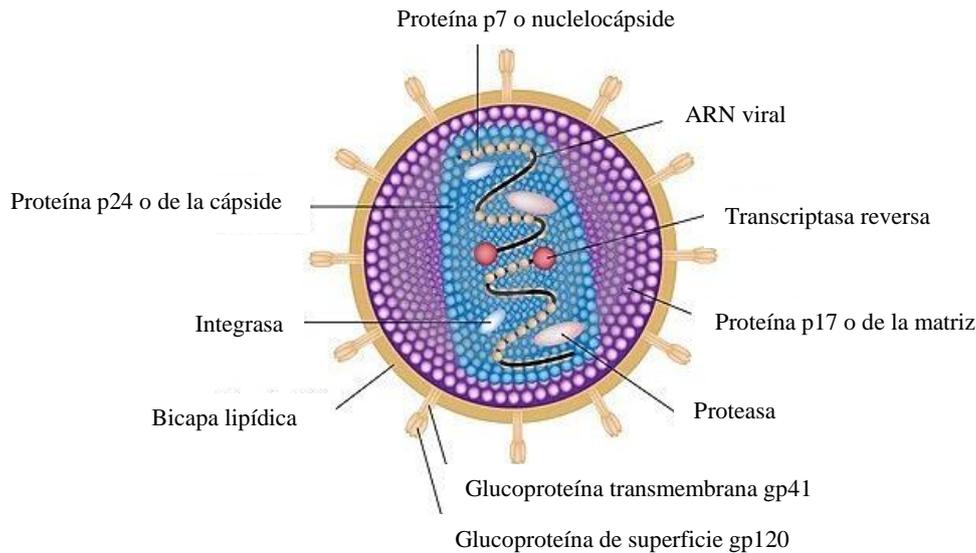


Figura 1: Estructura del virus del VIH. Tomada y modificada de es.dreamstime.com.

El genoma del VIH está formado por dos cadenas idénticas monocatenarias de ARN lineales, no segmentadas y de polaridad positiva que tienen aproximadamente 9800 nucleótidos de longitud (Frankel & Young, 1998). Estas moléculas de ARN están unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno en sus extremos 5', siendo así, los únicos virus animales cuyo genoma es diploide.

Estructuralmente, el genoma consta de tres genes estructurales y siete reguladores (**Figura 2**). Los genes estructurales son comunes a todos los retrovirus y se denominan Gag, Pol y Env. Gag y Env codifican las proteínas estructurales, mientras que Pol codifica las enzimas virales esenciales para el ciclo replicativo. Los genes reguladores son Tat, Rev, Vpr, Vif, Vpu, Nef y Vpt. Tienen varias funciones entre las cuales destacan la regulación del periodo de latencia o la expresión del material genético viral. Además, el genoma del VIH se encuentra franqueado en ambos extremos 5' y 3' por las regiones LTR (Repetición Terminal Larga o *Long Terminal Repeat*) las cuales desempeñan un papel importante en la replicación del genoma viral, así como en su integración al genoma de la célula huésped (Karpas, 2004).

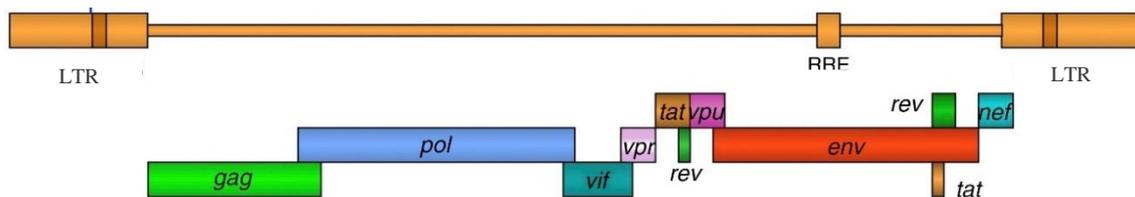


Figura 2: Estructura y organización del genoma del VIH. Tomada y modificada de Rafael, 2011.

1.1.3. Ciclo viral del VIH

El ciclo viral del VIH (**Figura 3**) comienza con la entrada del virus en la célula diana mediante la unión de las glucoproteínas virales gp120 y gp41 con receptores celulares de los linfocitos T-CD4+ (Sundquist & Kräusslich, 2012). Esta unión junto con otras interacciones promueve cambios conformacionales que conducen a la fusión de las membranas viral y celular y a la liberación de la cápside viral en el interior de la célula diana, donde es degradada (descapsidación).

El material genético derivado del proceso de descapsidación, es retrotranscrito por la enzima RT que genera una doble hebra de ADN (ADN proviral). Este proceso es auxiliado por las proteínas virales Vif y Nef. El ADN proviral es transportado al núcleo donde se integra al genoma del huésped por acción de la enzima IN.

Tras su integración en el genoma celular, el VIH puede permanecer latente durante largos periodos de tiempo o bien, iniciar su replicación masiva con el consiguiente efecto citopático. La replicación del ADN se inicia con la síntesis de ARN mensajero que es transportado de nuevo al citosol y que mediante la maquinaria de la célula diana, darán lugar a la formación de proteínas virales. Estas proteínas una vez han sido sintetizadas y procesadas, se ensamblan con las moléculas de ARN, formando nuevos viriones que abandonan la célula por procesos de gemación. Una vez liberado el virión, se activa la enzima PR para formar la partícula viral madura.

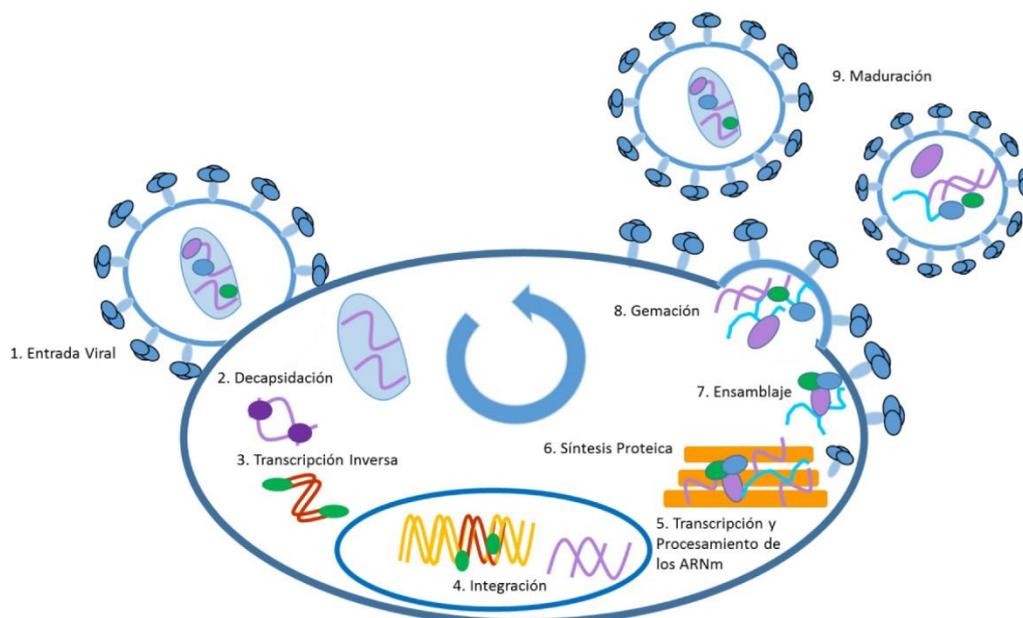


Figura 3: Ciclo viral del VIH.

1.1.4. Epidemiología molecular y variabilidad genética del VIH

El VIH presenta una gran variabilidad genética derivada de una elevada tasa de mutación del orden de $3,4 \cdot 10^5$ mutaciones por base y por ciclo viral (Coffin, 1995), la ausencia de mecanismos de reparación de errores y una alta tasa de replicación del virus (10^{10} viriones/día). Por otra parte, además, esta diversidad puede aumentar debido a los procesos de recombinación viral (Nájera *et al*, 2002), que permiten que el virus intercambie información genética entre dos moléculas de ARN diferentes. De esta manera, en un organismo infectado por el VIH pueden convivir diferentes variantes virales muy parecidas entre sí pero no idénticas. Wain-Hobson fue el primero en poner de relevancia la estructura en cuasiespecies (el conjunto de todas las variantes) y sus implicaciones clínicas y biológicas (Wain-Hobson, 1989).

Existen dos tipos de VIH, el VIH-1 y el VIH-2, originados por transmisiones zoonóticas independientes. Las variantes del VIH-1 han sido clasificadas filogenéticamente, en función de la homología de su secuencia, (Paraskevis & Hatzakis, 1999) en cuatro grupos: el grupo M (*major* o principal), el grupo O (*outlier* o extraño), el grupo N (*new*) y el grupo P (*putative*). El grupo M es el más prevalente en el mundo y está dividido a su vez en 9 subtipos diferentes denominados con letras (A, B, C, D, F, G, H, J, K). Por otra parte, existen fenómenos de recombinación entre subtipos, dando lugar a CRFs (Formas Recombinantes Circulantes o *Circulating Recombinant Form*) y URFs (Formas Recombinantes Únicas o *Unique Recombinant Forms*).

Esta elevada variabilidad genética que caracteriza a la infección por VIH puede tener impacto en la transmisión, diagnóstico, progresión de la enfermedad y respuesta al tratamiento. Así, la elevada variabilidad ha provocado que, en la actualidad no exista una vacuna efectiva para tratar la infección por VIH.

1.2.HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIH

La infección por VIH es un proceso dinámico caracterizado por una replicación viral persistente, y en el que la mayoría de las manifestaciones clínicas son el resultado del progresivo deterioro del sistema inmune. La gran variabilidad genética y la posibilidad de entrar en fase de latencia le permiten evadir de forma continuada al sistema inmune. A nivel clínico, los niveles de linfocitos T-CD4+ reflejan la intensidad del daño en el sistema inmune mientras que la carga viral (ARN-VIH) traduce la replicación del virus.

En la historia natural de la infección por este virus se pueden diferenciar tres fases (Touloumi & Hatzakis, 2000; Sabin & Lundgren, 2013) (**Figura 4**).

- La primera de ellas se denomina infección aguda o primoinfección. En este periodo se produce una replicación masiva del virus, lo que conlleva altos niveles de ARN-VIH en plasma, acompañado de una caída de la cifra de linfocitos T-CD4+. Esta fase tiene una duración de 1 a 3 semanas y en la mayoría de los casos suele ser asintomática, si bien se puede manifestar como un cuadro clínico similar al de la mononucleosis infecciosa (erupciones, fiebre, adenopatías). Durante esta fase no se encuentran anticuerpos específicos contra el VIH. (Daar *et al.*, 1991)
- La segunda fase se denomina periodo de latencia y coincide con la aparición de la respuesta inmune del huésped. Los niveles de ARN-VIH tienden a estabilizarse mientras se produce una disminución gradual en el número de linfocitos T-CD4+. La duración de esta fase es variable, pero puede prolongarse durante años.
- La última fase se denominada fase SIDA y se produce cuando la cifra de linfocitos T-CD4+ es inferior a 200 células/mm³. Se produce un incremento en los niveles de ARN-VIH. En esta situación de inmunosupresión, el paciente puede desarrollar diversas infecciones oportunistas y/o cánceres asociados a la infección.

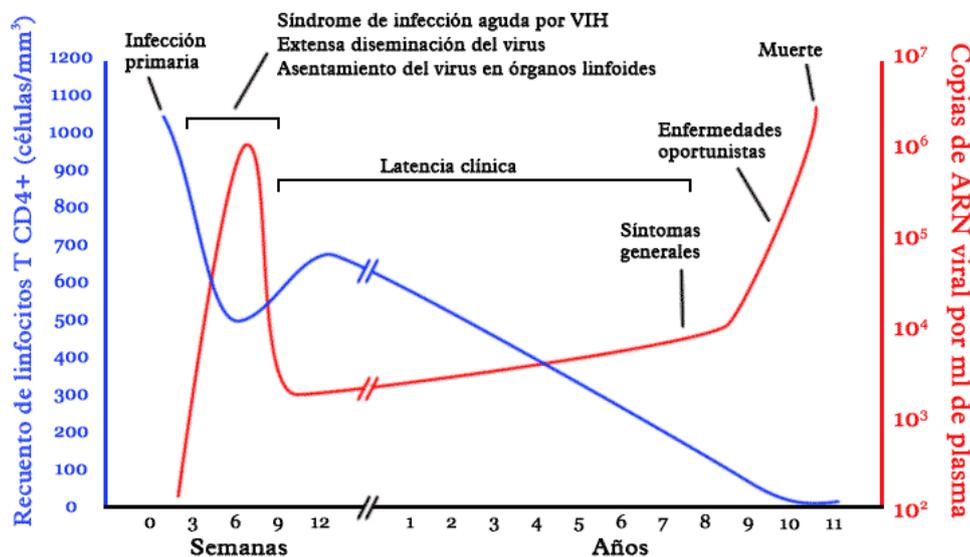


Figura 4: Historia natural de la infección por VIH. Tomada y modificada de www.infectologia.net

Tras el diagnóstico de SIDA la supervivencia es variable, aunque en ausencia de tratamiento no suele superar los 3 años. La introducción del TAR ha disminuido de manera significativa la morbimortalidad de los pacientes infectados por VIH al controlar la replicación viral.

A pesar de que el uso de TAR mejora el estado inmuno-virológico del paciente, en muchos casos, persiste un estado inflamatorio crónico que puede conducir al desarrollo de enfermedades definitorias de SIDA y no definitorias de SIDA, o incluso a la muerte (Lauring *et al.*, 2012).

1.3.EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VIH

La epidemia de VIH/SIDA ha sido uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial durante los últimos 30 años con una distribución muy cosmopolita. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) son los principales organismos encargados de recopilar y publicar anualmente los datos epidemiológicos referentes a la infección por VIH. En 2015, se estima que casi 37 millones de personas estaban infectadas por el VIH en todo el mundo (OMS, 2016) (**Tabla I**).

Tabla I: Datos epidemiológico globales de SIDA en 2015 (OMS, 2016)

Resumen global de la epidemia de SIDA		
Personas viviendo con infección por VIH	Total	36,9 millones
	Adultos	34,3 millones
	Niños (<15 años)	2,6 millones
Nuevos diagnósticos	Total	2,0 millones
	Adultos	1,8 millones
	Niños (<15 años)	200 000
Muertes por SIDA	Total	1,2 millones
	Adultos	1,0 millones
	Niños (<15 años)	150 000

*VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana; SIDA: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida

En España la tasa de nuevos diagnósticos de VIH es similar a la de los demás países de la Unión Europea (10 casos/día). A pesar de que la cifra de nuevos diagnósticos ha disminuido en los últimos años, alrededor del 50% de estos nuevos diagnósticos siguen siendo detectando de forma tardía.

1.4.TRAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

El TAR es la única herramienta terapéutica de la que se dispone actualmente para controlar la infección por VIH. Las guías actuales recomiendan la administración de TAR a todos los pacientes con infección por VIH.

Los regímenes de TAR se dividen en cinco familias en función de su diana en el ciclo viral: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN), inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN), inhibidores de la proteasa (IP), inhibidor de la entrada (IE) e inhibidor de la integrasa (IIN) (AIDSinfo, 2016). La elevada variabilidad del virus hace necesario el uso combinado de varias familias de fármacos para un control óptimo de la infección, evitando la aparición de mutaciones de resistencia (de Mendoza *et al.*, 2007a) que puedan comprometer la eficacia del tratamiento al aumentar el riesgo de fracaso virológico.

A pesar de que las combinaciones de TAR actuales suprimen la replicación del VIH durante largos periodos de tiempo y aumentan la supervivencia del paciente, en muchos casos persiste un estado inflamatorio crónico (Lauring *et al.*, 2012). Esta inflamación parece influir en el desarrollo de eventos definitorios de SIDA y eventos no definitorios de SIDA (Tenorio *et al.*, 2014).

1.5.MITOCONDRIA

1.5.1. Estructura y función

La mitocondria es el orgánulo celular encargado de la producción de energía a través del proceso de fosforilación oxidativa (Pinti *et al.*, 2012). Este sistema consiste en la transformación de las calorías consumidas por el organismo a adenosín trifosfato (*Adenosine triphosphate*, ATP), la moneda de intercambio energético celular, por medio de un proceso en el que se genera calor y especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*, ROS) y nitrógeno (*Reactive nitrogen species*, RNS). (Andreyev *et al.*, 2005). Además de la producción energética, las mitocondrias están implicadas en la regulación de los procesos apoptóticos, la termogénesis, la homeostasis de calcio celular, diversas rutas de biosíntesis (grupo hemo, colesterol, fosfolípidos) (Wallace, 2005) y en la respuesta inmune innata frente a infecciones virales. (Tal & Iwasaki, 2011)

Una particularidad de las mitocondrias, que deriva de su origen bacteriano-endosimbiótico (Margulis, 1975), es la presencia de su propio material genético, el ADNmt, que se hereda exclusivamente por vía materna. El genoma mitocondrial humano es una molécula bicatenaria circular de ADN de 16.569 pb que codifican 37 genes (Anderson *et al.*, 1981), entre los que se encuentran algunos que son necesario para la síntesis de los componentes catalíticos del sistema de fosforilación oxidativa (**Figura 5**).

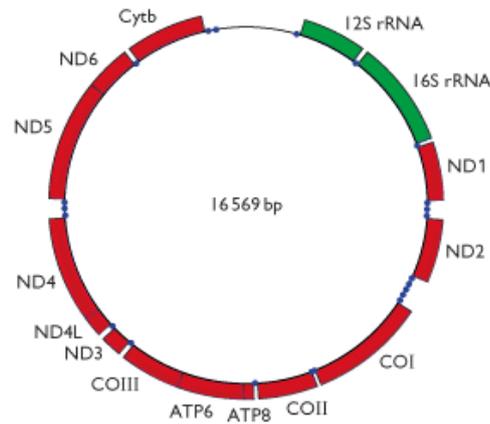


Figura 5: Estructura y organización del genoma mitocondrial. Tomada y modificada de Lauring *et al.* 2012.

La mayoría de las células cuentan con varios cientos de mitocondrias y cada una de ellas incluye de 2 a 10 moléculas de ADNmt por lo que, el número de copias de ADNmt en cada célula puede llegar a ser de varios miles, aunque su número y forma cambian constantemente en respuesta a las demandas de energía.

1.5.2. Daño mitocondrial

Una de las características más destacadas del ADNmt es su alta tasa de mutación, entre 5 y 10 veces mayor que la del ADN nuclear, debida a: mecanismos de corrección y reparación de errores de la polimerasa deficientes, una elevada replicación y la exposición a radicales libres procedentes del metabolismo oxidativo (Weimin *et al.*, 2014).

Las mutaciones de secuencia o alteraciones en el número de copias del ADNmt conllevan cambios en la eficiencia energética de la mitocondria, incrementando la producción de ROS durante el metabolismo aeróbico e influyendo sobre los propios mecanismos de apoptosis de la mitocondria.

El daño mitocondrial ha sido implicado en procesos de envejecimiento y patologías, como la carcinogénesis y la inflamación (Knez *et al.*, 2016). Estudios actuales en este campo han postulado el posible papel del ADNmt como potencial biomarcador en procesos asociados con estrés oxidativo e inflamación. (Zhou *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016; Tin *et al.*, 2016). En el caso del VIH, el estrés metabólico derivado de la replicación viral puede resultar en daño mitocondrial y agotamiento del ADNmt. Así, ciertos estudios han evaluado el posible impacto del VIH en los niveles de ADNmt y su posible uso como biomarcador inflamatorio y del estado inmuno-virológico del paciente (Huang *et al.*, 2016,).

2. OBJETIVOS

La infección por VIH se caracteriza por una activación inmune crónica que se asocia a la progresión de la enfermedad. La introducción del TAR ha disminuido de manera significativa la morbimortalidad de los pacientes VIH al controlar la replicación viral. Esta supresión virológica alcanzada con el TAR ha disminuido el grado de disfunción inmune, si bien, se ha descrito un estado proinflamatorio crónico en muchos casos. El estrés metabólico derivado de la replicación del VIH puede dar lugar a daño mitocondrial con la consiguiente repercusión en los niveles de ADNmt.

El objetivo de este estudio es evaluar los niveles de ADNmt circulante en plasma en pacientes con infección por VIH y su potencial uso como biomarcador del estado inmunológico-virológico del paciente.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Sujetos de estudio

Se realizó un estudio observacional en una cohorte de 235 pacientes infectados por VIH, en seguimiento clínico en la Unidad de VIH y Hepatitis del Servicio de Medicina Interna B del CHUAC, integrado en la red del Servicio Gallego de Salud (SERGAS). Todos los pacientes incluidos firmaron el consentimiento informado correspondiente a la línea de investigación de Enfermedades Infecciosas (**Anexo I**).

Se recogieron variables sociodemográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de cada uno de los pacientes incluidos (**Anexo II**). Con estos parámetros, se elaboró una base de datos, en colaboración con un clínico especialista de la Unidad de VIH. Durante todo el proceso se cumplió la garantía de confidencialidad de la información según la Ley 14/2007, de investigación biomédica y la Ley Orgánica 15/1999, de protección de datos de carácter personal.

Para llevar a cabo los análisis, los sujetos seleccionados fueron agrupados en 4 grupos: pacientes naïve a TAR (aquellos que en el momento de la muestra aún no habían iniciado tratamiento), pacientes con valores de ARN-VIH comprendidos entre 20-200 copias/mL, pacientes con niveles de ARN-VIH inferiores a 20 copias/mL (detectable no cuantificable, DNQ) y pacientes con ARN-VIH no detectable ni cuantificable (ND). Los pacientes de los 3 últimos grupos se encontraban bajo TAR en el momento del estudio.

3.2. Obtención y procesado de las muestras

Para este estudio fue necesario aislar el material genético (ADNmt) circulante en plasma de cada uno de los pacientes. El material biológico de partida fueron 8mL de sangre periférica total almacenada en tubo con ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylene diamine tetraacetic acid*, EDTA). El aislamiento del plasma se realizó por medio de una centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (*Lymphocytes Isolation Solution*, Rafer, España). El Ficoll permite separar los componentes de la sangre en función de su densidad debido a la migración diferencial de los mismos durante la centrifugación. Así, tras el proceso de centrifugado a 2000rpm durante 30 minutos se forman las fases descritas en la **Figura 6**.

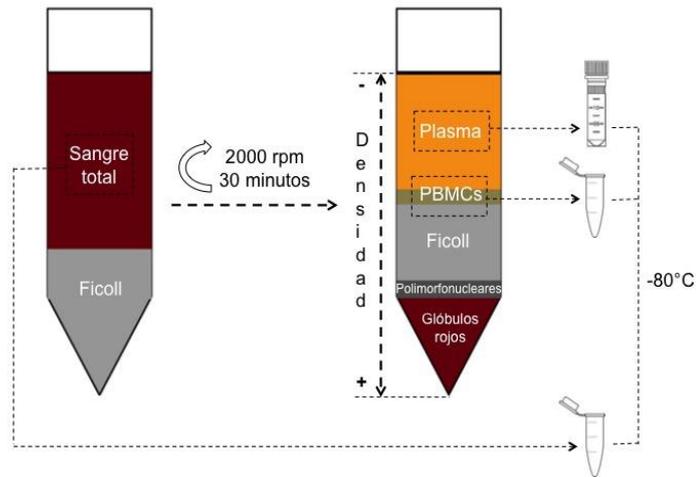


Figura 6. Técnica de centrifugación diferencial con Ficoll.

El plasma se separó mediante una pipeta pasteur y se almacenó en crioviales a -80°C en el Biobanco de A Coruña. El Biobanco de A Coruña es un biobanco hospitalario que tiene como finalidad gestionar, bajo criterios de calidad, seguridad, confidencialidad y trazabilidad, las muestras biológicas humanas y la información clínica asociada a las mismas (INIBIC, 2016).

3.3.Extracción del ADNmt

Actualmente, existen disponibles diversos métodos comerciales de extracción de ácidos nucleicos. En nuestro caso, el ADNmt se aisló a partir de las muestras de plasma, previamente obtenidas, utilizando columnas de sílica gel y por medio del kit *DNAeasy blood & tissue kit* (Qiagen, Alemania). El principio de extracción consiste en una lisis seguida de una unión específica del ADN a una membrana de sílica gel inmovilizada en una columna, mientras el resto de los contaminantes (cationes divalentes y proteínas) pasan a través de la misma, permitiendo aislar y recuperar el material genético por afinidad. Este proceso aparece recogido de forma esquemática en la **Figura 7**.

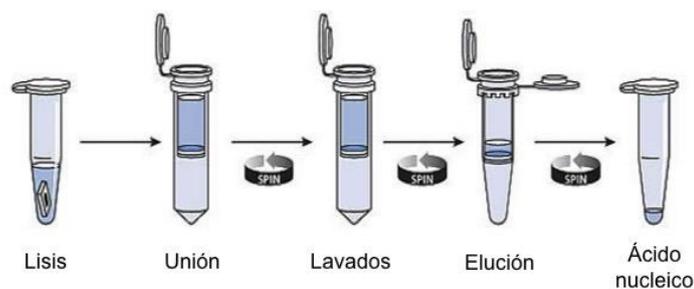


Figura 7: Proceso de extracción de ácidos nucleicos en un sistema de columnas sílica gel.

Se seleccionaron las muestras, previamente almacenadas en el Biobanco, y tras ser descongeladas, se mezclaron 400µL de muestra (plasma homogeneizado) con 400µL de PBS (tampón fosfato salino o *phosphate buffered saline*) estéril y se centrifugaron a 16.000g durante 15 minutos a 4°C, para eliminar posibles restos celulares que podrían dar lugar a un cambio significativo de los resultados. A continuación, se recogieron 200µL del sobrenadante para la posterior extracción del ADNmt. El proceso de extracción se llevó a cabo de forma automatizada en el QIAcube (Qiagen, Alemania), de acuerdo al protocolo del fabricante. El ADNmt extraído se eluyó a un volumen final de 100µL en tampón AE (10mM Tris-Cl; 0,5mM; pH 9,0). La automatización del proceso permite una extracción más eficiente, de mayor calidad y una mayor reproducibilidad de los resultados.

3.4. Cuantificación del ADNmt

La cuantificación de los niveles de ADNmt en las muestras obtenidas tras el proceso de extracción, se llevó a cabo midiendo el número de copias del gen del ARN ribosómico 12S, uno de los genes presentes en el ADNmt, mediante un ensayo de PCR cuantitativa o en tiempo real (*Real Time PCR*).

La PCR cuantitativa es una variante de la PCR convencional, que permite amplificar y cuantificar de forma simultánea la cantidad de material genético presente en una muestra por medio de la detección y medición de la fluorescencia emitida por un fluoróforo añadido en la reacción. En este caso, se empleó el fluoróforo inespecífico, *SYBR Green* (Roche, EE.UU.) y la reacción fue llevada a cabo en el termociclador *LightCycler480 II* (Roche, EE.UU.). Los cebadores empleados para la amplificación y cuantificación del gen mitocondrial 12S fueron: 5'-CCACGGGAAACAGCAGTGAT-3' para el cebador directo (*primer forward*) y 5'-CTATTGACTTGGGTAAATCGTGTGA-3' para el cebador reverso (*primer reverse*).

La reacción de PCR cuantitativa se generó a un volumen final de 20 µL para cada muestra, tras añadir 10µL de *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche, EE.UU.), 0.15 µL de cebador directo, 0.15 µL de cebador reverso, 4,7 µL de agua Mill-Q autoclavada libre de DNasas y RNasas y 5 µL de ADNmt previamente extraído.

El programa empleado para la amplificación y cuantificación fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos; 45 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, una hibridación a 62°C durante 1 minuto y una elongación a 72°C durante 5 segundos. La cuantificación de la fluorescencia emitida por el fluoróforo fue medida durante la fase de elongación. Además, para comprobar la

especificidad de la reacción se llevó a cabo un análisis de las curvas de fusión (análisis de *melting*). El programa de *melting* consistió en un ciclo de 95°C durante 5 segundos, 65°C durante 60 segundos seguidos de un aumento gradual de la temperatura hasta 97°C.

Todas las muestras se analizaron por duplicado. Se asumieron como válidas, aquellas muestras con desviaciones del valor del ciclo umbral (*threshold cycle*, C_T) inferiores a 0,5. En cada placa se incorporó un control negativo y un control positivo. Como control positivo, se empleó el ADNmt extraído de una línea celular inmortalizada (TC28a2) de concentración conocida, $6,7 \cdot 10^6$. Además, para comprobar la variabilidad entre placas, se incorporó una muestra de la placa anterior.

Los niveles de ADNmt fueron cuantificados de forma absoluta por medio de una recta patrón, previamente elaborada por la Plataforma de Genómica del INIBIC, que permite correlacionar el valor del C_T de una muestra con una concentración de ADNmt. El programa informático utilizado fue *LightCycler 480 Software release 1.5.0 SP4* (Roche, EE.UU.).

Los valores aportados por el programa fueron corregidos y expresados en copias/ μ L de plasma atendiendo a la siguiente formula (Qin C. *et al.*, 2015):

$$C=Q \times V_{ADN} / V_{PCR} \times 1/V_{ext}$$

donde: C es la concentración de ADNmt plasmático (copias/ μ L); Q es la cantidad de ADN medida en la PCR cuantitativa; V_{ADN} es el volumen total de ADNmt plasmático obtenido de la extracción (100 μ L); V_{PCR} es el volumen de ADNmt plasmático para la PCR cuantitativa (5 μ L); y V_{EXT} es el volumen de plasma usado para la extracción (400 μ L).

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático SPSS V19.0 (IBM, EE.UU.). Las variables categóricas se presentaron como número de casos y porcentaje y se compararon con la prueba de Chi cuadrado (χ^2) o la prueba exacta de Fisher, según la normalidad de las variables. Las variables continuas se expresaron como media \pm desviación estándar y se compararon mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, según fue apropiado. Las correlaciones entre los niveles de ADNmt y los parámetros relacionados con el VIH (niveles de linfocitos T-CD4+ y ARN-VIH) se determinaron mediante el análisis de correlación de Spearman. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05 para todos los análisis.

4. RESULTADOS

En total, se incluyeron 235 pacientes con infección por VIH. De ellos, el 83,3% eran hombres con una edad media de 44±11 años. Las principales vías de transmisión del VIH fueron: la vía sexual y usuarios de drogas por vía parenteral (73% y 23,5% respectivamente). Dentro de la vía sexual, la más frecuente resultó ser hombres que tienen sexo con hombre (HSH) (43%). Un 40,7 % de los pacientes presentó un nadir de linfocitos T-CD4+ inferior a 200 células/mm³. Además, un 15,3% habían presentado una enfermedad definitoria de SIDA. En cuanto a la presencia de coinfecciones, el 4,7% de los pacientes presentaban antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg) y el 26,7% anticuerpos frente al virus de la Hepatitis C (VHC) (**Tabla II**).

Tabla II: Características basales de la población estudiada.

Características	N=235
Sexo (masculino)	195 (83,3)
Edad (años)	44,6 ±11
Procedencia	
España	198 (86,5)
Latinoamérica	21 (9,2)
Vía de transmisión	
HSH	95 (43)
Heterosexual	73 (33)
Usuarios de drogas intravenosas	52 (23,5)
Recuento de linfocitos T-CD4+(células/mm ³)	383±277
Nadir de linfocitos T-CD4+ ≤200 células/mm ³	94 (40,7)
ARN-VIH (log copias/mL)	4,88 ±0,83
Enfermedad definitoria de SIDA	36 (15,3)
HBsAg positivo	11 (4,7)
Anticuerpos VHC	62 (36,7)

*Los datos se expresan como n (%) o como media±desviación estándar. HSH: hombres que tienen sexo con hombres; mm³: milímetro cúbico; mL: mililitro; ARN-VIH: carga viral del Virus de la Inmunodeficiencia Humana; SIDA: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida HBsAg: Antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B; VHC: Virus de la Hepatitis C.

El 31,9% eran pacientes naïve a TAR (media de ARN-VIH de 4,46±0,64 log copias/mL), mientras que el resto de pacientes recibían TAR. Dentro de este último grupo, el 20,9%

presentaban niveles de ARN-VIH entre 20-200 copias/mL, el 23% niveles inferiores a 20 copias/mL (DNQ) y el 24,2% viremia no detectable (ND).

Los niveles medios de ADNmt circulante en plasma para los mismos grupos de pacientes fueron de: 217 ± 656 copias/ μ L para pacientes naïve a TAR, 149 ± 440 copias/ μ L para pacientes con ARN-VIH entre 20-200 copias/mL, 265 ± 723 copias/ μ L en el grupo DNQ y 643 ± 1310 copias/ μ L en el grupo ND. De forma global los niveles medios de ADNmt circulante en plasma presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,045$). Además, se observaron diferencias en los niveles de ADNmt en plasma entre los pacientes naïve y pacientes con ARN-VIH ND ($p=0,010$). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($p=0,057$) cuando se compararon los niveles entre el grupo de pacientes con ARN-VIH ND y aquellos con ARN-VIH entre 20-200 copias/mL (**Figura 8**).

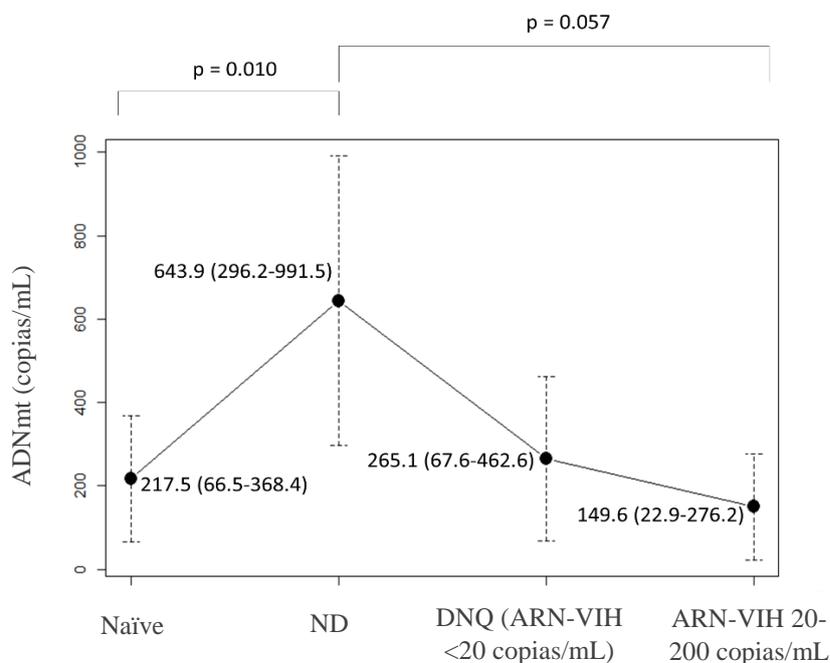


Figura 8: Comparación de los niveles de ADNmt entre pacientes VIH. Los niveles de ADNmt se expresan como media (con un intervalo de confianza del 95%). TAR: tratamiento antirretroviral; ADNmt: ADN mitocondrial; ND: no detectable ni cuantificable; DNQ: detectable no cuantificable; mL: mililitros.

La **Tabla III** muestra los niveles de ADNmt según el recuento de linfocitos T-CD4+ y el régimen de TAR utilizado. En función de la pauta de TAR no se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de ADNmt ($p=0,808$).

Tabla III: Niveles de ADNmt en función del recuento de linfocitos T-CD4+ y del régimen de TAR.

	ADNmt (medida±DS)	P
Recuento de linfocitos T-CD4+		0,164
≤200 células/mm ³	60,1±64,3	
201-350 células/mm ³	270,8±803,6	
351-500 células/mm ³	278,8±622	
>500 células/mm ³	417,8±1075,2	
Régimen de TAR		0,808
2 ITIAN+ITINAN	552,9±1308,2	
2 ITIAN+IP	165,6±287,4	
2 ITIAN+IIN	279,9±605,2	

*Los datos de ADNmt se expresan como media±desviación estándar. mm³: milímetro cúbico; TAR:

Tratamiento Antirretroviral; ITIAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos;

ITINAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IP: Inhibidores de la proteasa;

IIN: Inhibidores de la integrasa.

Atendiendo al estado inmunológico (**Tabla III**), los niveles medios de ADNmt se distribuyeron de la siguiente forma: 60,1±64,3 copias/μL en pacientes con un nivel de linfocitos T-CD4+ menor o igual a 200 células/mm³; 270,8±803,6 copias/μL en pacientes con un nivel de linfocitos T-CD4+ entre 201-305; 278,8±622 copias/μL en pacientes con un nivel de linfocitos T-CD4+ entre 351-500 y 417,8±1075,2 copias/μL en pacientes con un nivel de linfocitos T-CD4+ mayores de 500celulas/mm³. De forma global, no se observaron diferencias significativas entre estos grupos (p=0,164).

Además de lo indicado, los niveles de ADNmt se asociaron de forma inversa con los niveles de ARN-VIH (Spearman's rho -0,191, p=0,003) y de forma directa con el recuento de linfocitos T-CD4+ (Spearman's rho 0,131, p=0,046) como se muestra en la **Figura 9**.

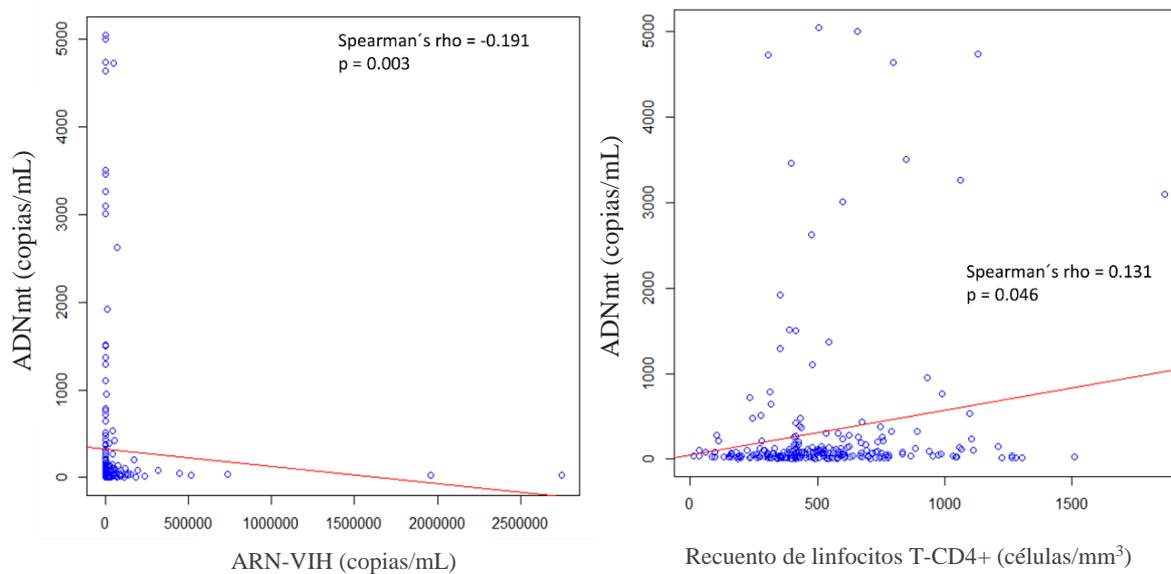


Figura 9: Correlación entre los niveles de ADNmt (copias/ μ L) y los niveles de ARN-VIH (copias/mL) y el recuento de linfocitos T-CD4+ (células/mm³). ADNmt: ADN mitocondrial; mL: mililitro; ARN-VIH: Carga viral del Virus de la Inmunodeficiencia Humana; mm³: milímetro cúbico; μ L: microlitro.

5. DISCUSIÓN

Este estudio evaluó los niveles plasmáticos de ADNmt en una cohorte de pacientes infectados por VIH y su potencial papel como biomarcador del estado inmuno-virológico del paciente. Este trabajo describe por primera vez que los pacientes con supresión virológica completa (ND) presentaron niveles de ADNmt significativamente más altos que los pacientes naïve a TAR e incluso que aquellos con bajos niveles de ARN-VIH (20-200 copias/mL). Por otra parte, se observó que el aumento de los niveles de ADNmt circulante en plasma estaba asociado con menores niveles de ARN-VIH y un mayor recuento de linfocitos T-CD4+.

Estos datos sugieren que los niveles de ADNmt en plasma podrían ser un marcador relacionado con la replicación del VIH, al asociarse con el daño mitocondrial producido como consecuencia de un control inadecuado de la replicación del VIH.

La variación en el número de copias del ADNmt ha sido observada en diversas patologías como la enfermedad renal crónica, la insuficiencia cardiaca o algunos cánceres (Zhou *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016; Tin *et al.*, 2016). En el campo de la infección crónica por VIH, algunos estudios han demostrado alteraciones de los niveles del ADNmt en comparación con controles VIH negativos (Cote *et al.*, 2002; Chiappini *et al.*, 2004; Miro *et al.*, 2004; de Mendoza *et al.*, 2004; Casula *et al.*, 2005; Maagaard *et al.*, 2006) con resultados controvertidos. Así, Luring y colaboradores no observaron diferencias en los niveles de ADNmt entre pacientes con VIH con supresión virológica, controladores de elite, pacientes naïve y pacientes VIH negativos (Luring *et al.*, 2012); mientras que otros estudios como el de Cossarizza y colaboradores describieron niveles de ADNmt plasmático más altos en pacientes con infección aguda por VIH o pacientes con diagnóstico tardío en comparación con individuos sanos (Cossarizza *et al.*, 2011). Esta heterogeneidad en los resultados puede deberse a sesgos derivados de la población de estudio y de la metodología empleada.

La correlación existente entre el ADNmt con el recuento de linfocitos T-CD4+ y los niveles de ARN-VIH no ha sido completamente evaluada en los estudios realizados hasta el momento (Cote *et al.*, 2002; Chiappini *et al.*, 2004; Miro *et al.*, 2004; Maagaard *et al.*, 2006). En este contexto, nuestro estudio mostró una correlación positiva entre los niveles de ADNmt y el recuento de linfocitos T-CD4+ y una correlación negativa con los niveles de ARN-VIH tanto en pacientes naïve como en pacientes bajo TAR. Esta observación también

fue descrita por Miura y colaboradores en una cohorte de pacientes infectados por VIH naïve a TAR (Miura *et al.*, 2003).

La incorporación del TAR en el tratamiento de la infección por VIH ha permitido, que hoy en día, la mayor parte de los pacientes alcancen y mantengan la viremia indetectable durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, ciertos grupos de pacientes tratados, han presentado episodios de baja viremia intermitente o persistente (<200 copias/mL) tras haber alcanzado la supresión virológica. La presencia de estos episodios ha sido asociada con una mayor probabilidad de presentar virus con mutaciones de resistencia y un mayor riesgo de fracaso virológico (Pernas *et al.*, 2016). En nuestro estudio, los pacientes con niveles de ARN-VIH entre 20-200 copias/mL presentaron unos niveles de ADNmt significativamente inferiores que aquellos pacientes con ARN-VIH ND.

Los altos niveles de ADNmt observados en pacientes con ARN-VIH ND pueden ser debidos al estado de activación inmune persistente causado por la infección por VIH y el daño de este en la mitocondria. En este sentido, la inflamación continuada derivada de la respuesta del huésped a la infección viral puede conducir a un aumento de la producción de ROS. Altos niveles de ROS han sido relacionados con efectos en la integridad del ADNmt incluyendo mutaciones y deleciones que pueden desembocar en daño mitocondrial y la depleción del ADNmt. (Miura *et al.*, 2003; de Mendoza *et al.*, 2004; Casula *et al.*, 2005; de Mendoza *et al.*, 2007b; Cossarizza *et al.*, 2011; Pernas *et al.*, 2016). Además, se ha sugerido que ciertas proteínas del VIH como Vpr afectarían negativamente a la integridad mitocondrial (Jacotot *et al.*, 2001).

Históricamente se ha descrito que el uso prolongado de ITIAN particularmente de combinaciones que incluían estavudina y/o didanosina, provocaban toxicidad mitocondrial (de Mendoza *et al.* 2004; Pernas *et al.* 2016). En este sentido, estudios recientes han observado diferencias significativas en los niveles de ADNmt en función del régimen de TAR utilizado; sin embargo, en nuestro estudio estas diferencias no fueron observadas (Lauring *et al.*, 2012). Cabe destacar que el potencial efecto toxico de los regímenes con estavudina y/o didanosina no ha podido ser evaluado debido a que estos fármacos no están actualmente disponibles.

Este estudio presenta ciertas limitaciones. A pesar de no haberse realizado comparaciones con pacientes VIH negativos, el gran número de pacientes con infección por VIH incluidos y los diferentes niveles de ARN-VIH, permiten una evaluación detallada del impacto de la

replicación del VIH en los niveles de ADNmt. Por otro lado, las técnicas utilizadas para cuantificar los niveles de ADNmt no están estandarizadas lo que dificulta extrapolar nuestros resultados a otras poblaciones descritas en la bibliografía que utilizan otra metodología.

En conclusión, los resultados de este trabajo son coherentes con el concepto de que la infección por el VIH puede ser responsable de la alteración de los niveles del ADNmt. Se observaron niveles más altos de ADNmt asociados a un mayor recuento de linfocitos T-CD4+ en pacientes con ARN-VIH ND en comparación con pacientes naïve o con ARN-VIH entre 20-200 copias/mL, sugiriendo un posible papel como biomarcador del estado inmunológico-virológico en pacientes infectados por el VIH. Se necesitarán más estudios para determinar el papel de la cuantificación del ADNmt en el seguimiento clínico de los pacientes VIH.

6. CONCLUSIONES

- Los pacientes infectados por el VIH con TAR y supresión virológica completa (<20 copias/mL y ARN-VIH ND) tuvieron niveles de ADNmt significativamente más altos que los pacientes naïve, e incluso que los pacientes con viremia de bajo nivel (20-200 copias/mL).
- Los niveles de ADNmt fueron más elevados en los pacientes con mayores recuentos de linfocitos T-CD4+ y menores niveles de ARN-VIH.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mis más sinceros agradecimientos a todos los miembros del grupo de investigación de Virología Clínica, en especial a la directora de este trabajo, la Dra. Eva Poveda López, por haberme acogido como uno más del grupo y haberme introducido en el campo de la investigación. De la misma manera, agradecer a los investigadores predoctorales Marta Grandal Fustes y Andrés Tabernilla García, por hacer que todo este trabajo haya podido salir adelante y por enseñarme todas y cada una de las técnicas empleadas en este trabajo. Por último, pero no menos importante, a la clínico especialista Dra. Berta Pernas Souto, quien me ha ayudado en la recogida de cada una las variables clínicas, a entender la terminología más específica de este campo y a solventar mis dudas a la hora de redactar este trabajo de final de máster.

También quería agradecer toda la ayuda brindada por el grupo de Genómica del INIBIC, sin la cual este trabajo no podría haber sido llevado a cabo, al equipo del Biobanco de A Coruña, por facilitarnos toda la gestión de las muestras empleadas en este proyecto, por cedernos sus instalaciones y tratarnos como uno más de su equipo, y a la unidad de enfermedades infecciosas del Servicio de Medicina Interna por facilitarnos la recogida de muestras de pacientes, sin las que este trabajo no podría haberse realizado. No me olvido de dar las gracias al resto de grupos del INIBIC y docentes del Máster en Biotecnología Avanzada, quienes han guiado y ayudado en los primeros pasos de lo que espero sea mi carrera profesional. Para finalizar, agradecer a mi familia todo el esfuerzo, ayuda y apoyo a lo largo de estos años, sin los cuales no hubiera llegado hasta aquí. Gracias.

BIBLIOGRAFÍA

- **Artículos:**

1. Aberg J.A., Gallant J.E., Ghanem K.G., Emmanuel P., Zingman B.S., Horberg M.A.(2014) Primary care guidelines for the management of persons infected with HIV: 2013 update by the HIV medicine association of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*:58:e1-34.
2. Asboe D., Aitken C., Boffito M., Booth C., Cane P., Fakoya A., Geretti A.M., Mackie N., Muir D., Murphy G., Orkin C., Post F., Rooney G., Sabin C., Sherr L., Smit E., Tong W., Ustianowski A., Valappil M., Walsh J., Williams M., Yirrell D. (2012) British HIV Association guidelines for the routine investigation and monitoring of adult HIV-1-infected individuals 2011. *HIV Med*:13:1-44.
3. Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E., Staekov A.A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry Biokhimiia*:70(2): 200-14.
4. Anderson S., Bankier A.T., Barrel B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R. Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roen B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*:290 (5806): 457-65.
5. Ashar F.N., Moes A., Moore A.Z., Grove M.L., Chaves P.H., Coresh J., Newman A.B., Matteini A.M., Bandeen-Roche K., Boerwinkle E., Walston J.D., Arking D.E. (2015) Association of mitochondrial DNA levels with frailty and all-cause mortality. *J Mol Med (Berl)*:93: 177-186.
6. Barré-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vézinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*:220(4599):868-71.
7. Casula M., Bosboom-Dobbelaer I., Smolders K., Otto S., Bakker M., de Baar M.P., Reiss P., de Ronde A. (2005) Infection with HIV-1 induces a decrease in mtDNA. *J Infect Dis*:191: 1468-1471.
8. Chiappini F., Teicher E., Saffroy R., Pham P., Falissard B., Barrier A., Chevalier S., Debuire B., Vittecoq D., Lemoine A. (2004) Prospective evaluation of blood concentration of mitochondrial DNA as a marker of toxicity in 157 consecutively recruited untreated or HAART-treated HIV-positive patients. *Lab Invest*:84: 908–914.
9. Coffin J. (1995) HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation pathogenesis, and therapy. *Science*:267: 483-9.
10. Cossarizza A., Pinti M., Nasi M., Gibellini L., Manzini S., Roat E., de Biasi S., Bertoncelli L., Montagna J.P., Bisi L., Manzini L., Tranti T., Borghi V., Mussini C.(2011) Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: a new role for mitochondrial damage-associated molecular patterns during inflammation. *Mitochondrion*:11: 750-755.
11. Cote H.C., Brumme Z.L., Craib K.J., Alexander C.S., Wynhoven B., Ting L., Wong H., Harris M., Harrigan P.R., O'Shaughnessy M.V., Montaner J.S. (2002) Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients. *N Engl J Med*:346: 811-820.

12. Daar E., Moudgil T., Meyer R., Ho D.D. (1991) Transient high levels of viremia in patients with primary HIV type 1 infection. *N Engl J Med*:324: 961-4.
13. de Mendoza C., de Ronde A., Smolders K., Blanco F., Garcia-Benayas T., de Baar M., Fernández-Casas P., González-Lahoz J., Soriano V. (2004) Changes in mitochondrial DNA copy number in blood cells from HIV-infected patients undergoing antiretroviral therapy. *AIDS Res Human Retroviruses*:20: 271-273.
14. de Mendoza C., Garrido C., Corral A., Ramírez-Olivencia G., Jiméénez-Nacher I., Zahonero N., Gonzalez-Lahoz J., Soriano V. (2007a) Changing rates and patterns of drug resistance mutations in antiretroviral-experienced HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*:23:879-85.
15. de Mendoza C., Martin-Carbonero L., Barreiro P., de Baar M., Zahonero N., Rodriguez-Nova S., Benito J.M., Gonzalez-Lahoz J., Soriano V. (2007b) Mitochondrial DNA depletion in HIV-infected patients with chronic hepatitis C and effect of pegylated interferon plus ribavirin therapy. *AIDS*: 21: 583-588.
16. Emerman M., and Malim M.H. (1998). HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*:280(5371):1880-4.
17. Frankel A.D. and Young J.A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*:67: 1-25.
18. Huang J, Tan L, Shen R, Zhang L., Zuo H., Wang D.W. (2016) Decreased peripheral mitochondrial DNA copy number is associated with the risk of heart failure and long-term outcomes. *Medicine (Baltimore)*:95: e3323.
19. Jacotot E., Ferri K.F., El Hamel C., Brenner C., Druillennec S., Hoebeke J., Rustin P., Metivier D., Lenoir C., Geuskens M., Vieira H.L., Loeffler M., Belzacq A.S., Briand J.P., Zamzami N., Edelman L., Xie Z.H., Reed J.C., Roques B.P., Kroemer G. (2001) Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J Exp Med*:193: 509-519.
20. Karpas, A. (2004) Human retroviruses in leukaemia and AIDS: reflections on their discovery, biology and epidemiology. *Biol Rev Camb Philos Soc*:79(4): 911-33.
21. Knez J, Winckelmans E, Plusquin M, Thijs L., Cauwenberghs N., Gu Y., Staessen J.A., Nawrot T.S., Kuznetsova T. (2016). Correlates of peripheral blood mitochondrial DNA content in a general population. *Am J Epidemiol*:183: 138-146.
22. Lauring A.S., Lee T.H., Martin J.N, Hunt P.W., Deeks S.G., Busch M. (2012) Lack of evidence for mtDNA as a biomarker of innate immune activation in HIV infection. *PLOS One*:7: e50486.
23. Maagaard A., Holberg-Petersen M., Kvittingen E.A., Sandvik L., Bruun J.N. (2006) Depletion of mitochondrial DNA copies/cell in peripheral blood mononuclear cells in HIV-1-infected treatment-naïve patients. *HIV Med*:7: 53-58.
24. Margulis L. (1975) Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symposia of the Society for Experimental Biology*:29: 21-38.
25. Miro O., López S., Martínez A., Pedrol E., Milinkovic A., Deig E., Garrabou G., Casademont J., Gatell J.M., Cardellach F. (2004) Mitochondrial effects on HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals. *Clin Infect Dis*:39: 710-716.

26. Miura T., Goto M., Hosoya N., Odawara T., Kitamura Y., Nakamura T., Iwamoto A. (2003) Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy. *J Med Virol*:70: 497-505.
27. Nájera R., Delgado E., Pérez-Álvarez L., Thomson M.M. (2002) Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS*:16: Suppl 4: 3-16.
28. Paraskevis, D. and Hatzakis A. (1999) Molecular epidemiology of HIV-1 infection. *AIDS Rev*:1: 238-49.
29. Pernas B., Grandal M., Pertega S., Cañizares A., Castro-Iglesias A., Mera A., Rodríguez-Osorio I., Tabernilla A., Pedreira J.D., Poveda E. (2016) Any impact of blips and low-level viraemia episodes among HIV-infected patients with sustained virological suppression on ART? *J Antimicrob Chemother*:71: 1051-1055.
30. Pinti M., Mussini C., Cossarizza A. (2012) Mitochondrial DNA: a proinflammatory “enemy from within” during HIV infection? *Cell Death Dis*:3: 307.
31. Popovic, M., Sarin P.S., Robert-Gurroff M., Kalyanaraman V.S., Mann D., Minowada J., Gallo R.C. (1983). Isolation and transmission of human retrovirus (human t-cell leukemia virus). *Science*:219(4586):856-9.
32. Qin C, Liu R, Gu J, Li Y., Qian H., Shi Y., Meng W. (2015) Variation of perioperative plasma mitochondrial DNA correlate with peak inflammatory cytokines caused by cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Surg*:10:85.
33. Rafael D. (2011) Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Elsevier Doyma:29(1): 58-65.
34. Sabin C. A. and Lundgren J.D. (2013) The natural history of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*:8(4): 311-17.
35. Seelamgari A., Maddukuri A., Berro R., de la Fuente C., Kehn K., Deng L., Dadgar S., Bottazzi ME., Ghedin E., Pumfery A., Kashanchi F. (2004). Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci*:9: 2388-413.
36. Sundquist W. I. and Kräusslich H. G. (2012) HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor Perspect Med*:2(7):a006924.
37. Tal M.C. and Iwasaki A. (2011) Mitoxosome: a mitochondrial platform for cross-talk between celular stress and antiviral signaling. *Immunological review*:243(1): 215-34.
38. Tenorio A.R., Zheng Y., Bosch R.J., Krishnan S., Rodriguez B., Hunt P.W., Plants J., Seth A., Wilson C.C., Deeks S.G., Lederman M.M., Landay A.L. (2014) Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. *J Infect Dis*:210: 1248-1259.
39. Tin A., Grams M.E., Ashar F.N., Lane J.A., Rosenberg A.Z., Grove M.L., Boerwinkle E., Selvin E., Coresh J., Pankratz N., Arking D.E. (2016). Association between mitochondrial DNA copy number in peripheral blood and incident CKD in the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol*:27: 2467-2473.
40. Touloumi G. and Hatzakis A. (2000) Natural history of HIV-1 infection. *Clin Dermatol*:18(4): 389-99.

41. Varmus H., and Nathanson N. (1998) Science and the control of AIDS. *Science*:280(5371):1815.
42. Wain-Hobson S. (1989) HIV genome variability in vivo. *AIDS*:3 Suppl 1: 13-8.
43. Wallace D.C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual review of genetics*:39: 359-407.
44. Weimin Z., Zhu M., Gui M., Huang L., Long Z., Wang L., Chen H., Yin Y., Jiang X., Dai Y., Tang Y., He L., Zhong K. (2014) Peripheral blood mitochondrial DNA copy number is associated with prostate cancer risk and tumor burden. *PLOS One*:9(10): e109470.
45. Zhou W., Zhu M., Gui M., Huang L., Long Z., Wang L., Chen H., Yin Y., Jiang X., Dai Y., Tang Y., He L. (2014) Peripheral blood mitochondrial DNA copy number is associated with prostate cancer risk and tumour burden. *PLOS One*:9: e109470

- **Páginas Web:**

1. Instituto de Investigación Biomedica de A Coruña (INIBIC). (2016). Biobanco. Recuperado el 20 de diciembre de 2016 de www.inibic.es/biobanco/presentacion.html.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). VIH/SIDA. Recuperado el 15 de diciembre de 2016 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/es/>.
3. AIDSinfo. (2016) Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. Recuperado el 20 de diciembre de 2016 de <https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf>.
4. Panel de expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el SIDA. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Recuperado el 15 de diciembre de 2016 de www.gesida-seimc.org/contenidos/quiasclinicas/2015/gesida-guiasclinicas-2015-tar.pdf.

ANEXOS

ANEXO I.- Modelo de Consentimiento Informado



HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

TITULO: COLECCIÓN DE MUESTRAS PARA LA INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

IDENTIDAD RESPONSABLE: DR. JOSÉ DOMINGO PEDREIRA ANDRADE.

SERVICIO MÉDICO / GRUPO DE INVESTIGACIÓN: SERVICIO DE MEDICINA INTERNA DEL COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO A CORUÑA (CHUAC) - XERENCIA XESTION INTEGRADA A CORUÑA (XXIAC). INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE A CORUÑA (INIBIC)

D. / Dña.:.....

(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)

INTRODUCCIÓN.-

Le proponemos participar en la creación de una colección de muestras para su uso en la investigación de las enfermedades infecciosas.

Toda investigación biomédica sobre enfermedades requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad, para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar. Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma.

Este documento se le proporciona con el fin de darle información suficiente para que pueda entender los posibles riesgos y beneficios derivados de su participación en esta línea de investigación, decidiendo si desea ser incluido o no en la misma. Antes de tomar su decisión, lea atentamente este documento y haga tantas preguntas como desee hasta asegurarse de que lo ha entendido y desea participar.

Su participación en esta Línea de Investigación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura.

El objetivo principal de la Colección de Muestras para la Investigación de Enfermedades Infecciosas es poder utilizar estas muestras en los distintos proyectos de investigación en los que participe el responsable de la misma, el Dr. José Domingo Pedreira Andrade y cualquier otro personal adscrito o colaborador del Grupo de Investigación del Servicio de Medicina Interna del CHUAC – XXIAC y/o del INIBIC; siempre y cuando, dichos estudios se enmarquen en el análisis de las enfermedades infecciosas en general, y particularmente aquellas enfermedades infecciosas causadas por virus.

Debe saber que la realización de todos estos proyectos de investigación en los que se utilicen estas muestras, será previamente autorizada por el Comité de Ética competente.

La finalidad principal de esta colección de muestras y de las investigaciones en las que se participe, es progresar en el conocimiento de la patología a estudiar y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento, tanto médico como quirúrgico. Para ello y, dentro de la propia labor asistencial que realizamos con pacientes como usted, obtendremos diferentes muestras biológicas para analizar y estudiar. Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios. Sin embargo, hay ocasiones en que estas muestras sobrantes son insuficientes y es necesario obtener alguna pequeña muestra adicional.

Lo que le solicitamos es AUTORIZACIÓN para ubicar, en la colección que le hemos descrito:

- **MUESTRAS** (Indicar las muestras que se van a obtener en el supuesto particular), que se le han obtenido durante su atención sanitaria en este centro hospitalario y que ya no es necesario utilizarlas para la finalidad por la que se obtuvieron, y que siguiendo la normativa de eliminación de residuos biológicos, serían destruidas.
- **INFORMACIÓN CLÍNICA** que nos permita analizar conjuntamente los resultados clínicos y los resultados derivados de las técnicas con las que se analicen las muestras.
Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario obtener datos clínicos relativos al donante de las muestras, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información que será conservada junto a la muestra.
Las condiciones de conservación y uso de dicha información serán las indicadas en el apartado de Confidencialidad de este documento.

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras líquidas y/o tejidos) para realizar los estudios de investigación biomédica dentro del área de las enfermedades infecciosas, sin que este hecho le cause molestias adicionales al propio proceso asistencial. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán

en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones del CHUAC - XXIAC, bajo la responsabilidad del la **Dr. José Domingo Pedreira Andrade**.

Es muy importante subrayar que, **para la obtención de dicha muestra, no se le someterá a ninguna prueba ni riesgo adicional al inherente al proceso asistencial al que va a ser sometido.**

La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles.

RIESGOS.-

La obtención de las muestras antes descritas se realizará como parte del proceso asistencial que se le proporciona en este centro. Usted no sufrirá ningún riesgo adicional por donar estas muestras a investigación.

COMPENSACIÓN Y BENEFICIOS.-

Usted no obtendrá ningún beneficio económico directo por su participación en los estudios de investigación que se lleven a cabo con sus muestras, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica.

La posibilidad de estudiar sus muestras, puede beneficiar en el futuro a pacientes con las enfermedades que se van a estudiar dentro de esta línea de investigación o enfermedades relacionadas con la misma. No obstante, dado que las investigaciones pueden durar años, es posible que usted no obtenga un beneficio directo de los resultados.

CONFIDENCIALIDAD.-

Toda la información que se obtenga de analizar sus muestras, así como toda la información clínica referente a usted utilizada en esta línea de investigación, será considerada confidencial y tratada en consecuencia, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD), la Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM) y las normas de desarrollo de ambas leyes.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde su entrada en esta ***Colección de Muestras para la Investigación de Enfermedades Infecciosas, del Grupo de Investigación del Servicio de Medicina Interna del CHUAC-XXIAC, INIBIC***, con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad, quedará custodiada por el personal autorizado del Grupo de Investigación del Servicio de Medicina Interna del CHUAC-XXIAC, INIBIC, en una base de datos de gestión de información que cumple todos los requisitos legales exigidos, tanto por la LOPD como por la LIBM y las normativas que las desarrollan. En base a todo ello, le informamos que se adoptarán todas las medidas necesarias para que tal información, no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el **deber legal de guardar secreto**. De esta manera podemos asegurar que cualquier

información que se obtenga a partir de sus muestras, permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos, por si fuera información de interés clínico.

Es importante que entienda, que es posible que sus muestras y los datos asociados a las mismas sean cedidas a otros investigadores, nacionales o internacionales, que colaboren en nuestras investigaciones; o que algunas de las técnicas necesarias para el análisis de sus muestras se realicen en otros centros colaboradores, ubicados en ocasiones en territorio nacional y en otras en el extranjero. En todo caso, le informamos que dichas **cesiones siempre se efectuarán de un modo no identificable, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos (sexo, patología, peso, edad,...) y codificados, que evitarán que el receptor de la muestra pueda conocer su identidad.** A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española de protección de datos de carácter personal, y que, nos proporcionen información referente a la trazabilidad de la muestra y, nos notifiquen la destrucción o devolución de la muestra sobrante, una vez finalizados los estudios que a ellos les correspondan hacer. Usted puede autorizarnos o no a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja de firma del consentimiento informado.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar en este estudio de investigación, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones.

Puede ejercitar los **DERECHOS ACCESO, RECTIFICACIÓN, CANCELACIÓN Y/O OPOSICIÓN (DERECHOS ARCO)** que le reconoce la normativa española de protección de datos, dirigiendo su solicitud por escrito junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:

- **ENTREGA EN PERSONA**, en la *Consulta* del Servicio de Medicina Interna del CHUAC, a la atención de Dr. José Domingo Pedreira Andrade
- **CORREO POSTAL:**
Dr. José Domingo Pedreira Andrade
Servicio de Medicina Interna. Planta 9, Hospital A Coruña.
Complejo Hospitalario Universitario A Coruña – Xerencia Xestión Integrada A Coruña
As Xubias, 84. A Coruña. 15006

Si usted decide **REVOCAR SU CONSENTIMIENTO**, deberá hacernos llegar al Servicio de Medicina Interna del CHUAC, a la atención de Dr. José Domingo Pedreira Andrade la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada que aparece al final de este documento.

Una vez cubiertos todos los campos puede hacérsela llegar de cualquiera de las maneras descritas anteriormente.

INFORMACIÓN ADICIONAL.- Usted puede contactar con el médico responsable de este estudio, si le surge cualquier duda sobre su participación en esta línea de investigación o sobre sus derechos como paciente, en el **Teléfono: 981 178189**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

HALLAZGOS Y RESULTADOS.-

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, diagnósticos, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado la investigación.

Usted debe saber que, en cumplimiento de la LIBM, tiene derecho a conocer o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.

En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.

DESTINO DE LA MUESTRA UNA VEZ FINALIZADO EL PROYECTO DE INVESTIGACION.-

En una segunda fase, cuando así lo estime conveniente el investigador responsable de la custodia de su muestra, **Dr. José Domingo Pedreira Andrade**, y siempre en el supuesto de que las muestras no se hubiesen agotado, el remanente será almacenado en el **Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC – XXIAC)**.

El Biobanco es un banco de almacenamiento de muestras de origen humano bajo criterios de calidad, para su utilización en investigaciones nacionales o internacionales dentro del campo de la biomedicina. Su funcionamiento se centra en gestionar, bajo criterios de seguridad, calidad y eficiencia; la recepción, procesamiento, almacenamiento y posterior cesión de muestras a los investigadores solicitantes, para que utilicen las mismas en sus proyectos de investigación; siempre y cuando, éstos cumplan todos los requisitos éticos y legales exigibles para este tipo de prácticas, tal y como establece la LIBM y la normativa que la complementa.

El remanente de sus muestras será enviado al Biobanco-C.H.U.A.C, para ser almacenadas en las instalaciones de dicho Banco de Muestras y, posteriormente, ser cedidas a los investigadores que hayan pasado la aprobación del Comité de Ética y del Comité Científico del Biobanco. A los estudios de investigación para los que se quieran utilizar las muestras almacenadas en el Biobanco-C.H.U.A.C, se les exigirá tener la aceptación del Comité de Ética correspondiente, tal y como se establece en la normativa aplicable. Las cesiones de muestras para su utilización en un proyecto de investigación

internacional se realizarán siguiendo las pautas establecidas para estos supuestos en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal y en el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad, su muestra sólo irá identificada desde su entrada en el Biobanco con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por el personal autorizado del Biobanco en una base de datos de gestión de información que cumple todos los requisitos legales exigidos tanto por la LOPD como por la LIBM y las normativas que las desarrollan, en base a todo ello le informamos que se adoptarán todas las medidas necesarias para que tal información no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el deber legal de guardar secreto. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos por si fuera información de interés clínico.

Es importante que entienda que la cesión de las muestras a los investigadores que nos las soliciten, siempre se efectuará de un modo no identificable, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos (sexo, patología, peso, edad,...) y codificados que evitarán que el investigador receptor de la muestra pueda conocer su identidad. . A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española de protección de datos de carácter personal, y que, nos proporcionen información referente a la trazabilidad de la muestra y, nos notifiquen la destrucción o devolución de la muestra sobrante, una vez finalizada la investigación para la que se le autorizó a usar la muestra. Usted puede autorizarnos o no a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja de firma del consentimiento informado.

La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles.

RESTRICCIONES DE USO.-

Usted puede indicarnos si quiere establecer algún tipo de restricción sobre sus muestras y datos, en relación a su posible uso en determinados proyectos de investigación o en cuanto a determinadas cesiones. Para ello dispone de un apartado específico en la hoja de firma del consentimiento informado.

INFORMACIÓN DISPONIBLE PARA EL PARTICIPANTE.-

El Biobanco y/o la persona responsable de la colección o proyecto de investigación tendrán a disposición de los participantes la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras y datos.

En determinadas circunstancias el Comité de Ética competente podrá decidir si es necesario contactar con el participante para facilitarle información de manera individualizada.

De producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en la página web del CHUAC www.hospitalcoruna.es y en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica del Instituto de Salud Carlos III (ISC III), con página web www.isciii.es, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD

FECHA FIRMA CONSENTIMIENTO: _____

Yo,..... (Nombre del participante) confirmo que,

-He leído la información que se me ha entregado.

-He recibido suficiente información sobre la **Colección de Muestras para la Investigación de Enfermedades Infecciosas**

-He podido hacer preguntas sobre la misma.

-He hablado de ello con..... (Nombre del médico que obtiene la muestra)

-Comprendo que mi participación es voluntaria.

-Comprendo que puedo retirar mi consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

3º. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

-Presto libremente mi conformidad para participar en esta Colección de muestras para investigación.

-Autorizo a que obtengan las muestras antes indicadas en la Hoja de Información que me han facilitado: NO SI

-Autorizo a que consulten y obtengan información de mis datos clínicos: NO SI

-Acepto que contacten conmigo cuando sea necesario: NO SI
TELÉFONO:.....

-Quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud:
NO SI TELÉFONO:.....

-Autorizo a que mis muestras y datos sean cedidas, en las condiciones indicadas, a centros colaboradores:

- Nacionales NO SI
- Internacionales NO SI

RESTRICCIONES DE USO: No autorizo a utilizar mis muestras en investigaciones que

.....

.....

.....

-Autorizo a que el remanente de mis muestras sea depositado en el **Biobanco-CHUAC** cuando lo considere oportuno el investigador responsable de mis muestras: NO SI

Firma del participante

Sr. /Sra.....

/Sra.....

Médico

Sr.

Firma del tutor o representantes legales

(Tachar lo que no proceda)

Sr. /Sra.....

/Sra.....

Sr.

Firma en aquellos casos en los que el participante no tenga capacidad legal.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD ANTE TESTIGOS

(Firmar en aquellos supuestos en los que el participante, con capacidad suficiente para dar su autorización, no pueda escribir)

FECHA FIRMA CONSENTIMIENTO: _____

Yo, _____ (*nombre del acompañante del participante*), con
DNI: _____ y en calidad de _____ (*parentesco con el
donante*) certifico que a _____ (*nombre del participante*)

-Se le ha leído la información que se le ha entregado.

-Ha recibido suficiente información sobre la ***Colección de Muestras para la Investigación de Enfermedades Infecciosas.***

-Ha podido hacer preguntas sobre la misma.

-Ha hablado de ello con..... (*Nombre del médico que obtiene la muestra*)

-Comprende que su participación es voluntaria.

-Comprende que puede retirar su consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

3º. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

-Presta libremente su conformidad para participar en esta Colección de muestras para investigación.

-Autoriza a que obtengan las muestras antes indicadas en la Hoja de Información que le han
facilitado: NO SI

-Autoriza a que consulten y obtengan información de sus datos clínicos: NO SI

-Acepta que contacten con él/ella cuando sea necesario: NO SI

TELÉFONO:.....

-Quiere ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para su salud:

NO SI TELÉFONO:.....

-Autoriza a que sus muestras y datos sean cedidos, en las condiciones indicadas, a centros
colaboradores:

- Nacionales NO SI
- Internacionales NO SI

RESTRICCIONES DE USO: No autoriza a utilizar sus muestras en investigaciones que

.....

.....

.....

-Autoriza a que el remante de sus muestras sea depositado en el **Biobanco-CHUAC** cuando lo considere oportuno el investigador responsable de sus muestras: NO SI

Me autoriza a firmar en su nombre.

Firma del testigo

Sr. /Sra.....

/Sra.....

Médico

Sr.



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña.....con DNIrevoco el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20..... Y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.
- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

Yo, D./Dña.....con DNI.....

Como representante legal de D/Dña....., con DNI.....,

Revoco el consentimiento prestado en fecha.....de.....de 20.....y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE SUS DATOS PERSONALES.
- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE SUS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

ANEXO II: Hoja de recogida de datos.

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS			
Código identificación del paciente			
Año de nacimiento			
País de origen			
Sexo	<input type="checkbox"/> Hombre	<input type="checkbox"/> Mujer	<input type="checkbox"/> Transexual
Etnia			
Peso			
Altura			
Fumador	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Ex-fumador
En caso afirmativo especificar nº cigarrillos/día			
Consumo alcohol >30gr/día	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Ex-bebedor
Consumo activo de drogas (especificar)			
Comorbilidad	<input type="checkbox"/> Ósea	<input type="checkbox"/> Toxicidad renal	
En caso afirmativo indicar que tipo de comorbilidad	<input type="checkbox"/> Cardiovascular	<input type="checkbox"/> Neuropsiquiátrica	
	<input type="checkbox"/> Diabetes	<input type="checkbox"/> Digestiva	
Coinfecciones	<input type="checkbox"/> VHB	<input type="checkbox"/> VHD	
	<input type="checkbox"/> VPH	<input type="checkbox"/> Otros _____	
Infección por VIH	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
Fecha de diagnóstico			
Vía de transmisión			
Nivel de linfocitos T-CD4 basales (células/mm³)			
Nivel de linfocitos T-CD4 en el momento de la cuantificación del ADNmt (células/mm³)			
Nivel ARN-VIH basal (copias/mL)			
Nivel ARN-VIH en el momento de la cuantificación del ADNmt (copias/mL)			
SIDA	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
En caso afirmativo definir evento			
Nadir de linfocitos T-CD4+			
TAR	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
En caso afirmativo indicar familia de fármacos	ITIAN	IP	IIN
	ITINAN		
Indetectable	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
En caso afirmativo definir fecha			

*Nadir de linfocitos T-CD4+: la cifra más baja de recuento de linfocitos T-CD4+ que alcanza un paciente.