

CONVOCATORIA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
MEMORIA DE SOLICITUD

Expediente N°
PI18/01436

DATOS DEL INVESTIGADOR/A PRINCIPAL (IP)

APELLIDOS RODRIGUEZ FRIAS	NOMBRE FRANCISCO
DNI/NIE: 36962868M	FECHA NACIMIENTO (DD/MM/AAAA): 15/01/1958
SEXO (V/M): V	
TELEFONO/S: 932746897/629672738	ORCID: 0000-0002-9128-7013

FORMACION ACADEMICA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

LICENCIATURA/INGENIERIA/GRADO	CENTRO	FECHA
CIENCIAS QUIMICAS	UNIVERSIDAD DE BARCELONA	1981
DOCTORADO	CENTRO	FECHA
MEDICINA CIRUGIA	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA	1994

SITUACIÓN PROFESIONAL DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

POSICION ACTUAL	FECHA INCORPORACION
FACULTATIVO ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA	1991
ORGANISMO INSTITUT CATALÀ DE LA SALUT (DEPARTAMENT SALUT, GENERALITAT CATALUNYA)	
CENTRO/FACULTAD/ESCUELA/INSTITUTO: HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRO	
DEPT./UNIDAD/SECC.: UNITAT PATOLOGIA HEPATICA, LABORATORIS CLINICS (BOQUIMICA I MICROBIOLOGIA)	
CORREO/S ELECTRONICO/S: frarodri@vhebro.net ; frarodri@gmail.com	
VINCULACIÓN LABORAL	☐ FUNCIONARIO/A ☒ ESTATUTARIO/A ☐ LABORAL FIJO O INDEFINIDO ☐ LABORAL TEMPORAL ☐ EMÉRITO

ACTIVIDADES ANTERIORES DE CARÁCTER CIENTÍFICO O PROFESIONAL

AÑOS INICIO-FINAL	PUESTO	INSTITUCIÓN
1976-1981	AUXILIAR ADMINISTRATIVO	CANESA
1982-1983	SERVICIO MILITAR	EJERCITO
1983-1984	PROFESOR ENSEÑANZA SECUNDARIA	ACADEMIA COM. CATALANA
1984-1987	PROFESOR ENSEÑANZA SECUNDARIA	REAL MONASTERIO STA.ISABEL
1987-1991	FORMACION COMO ESPECIALISTA BIOQUIM. QIR	ICS HOSP.VALL HEBRON
1991-2005	FACULTATIVO ESPECIALISTA BIOQ. INTERINO	ICS HOSP.VALL HEBRON
2005-2018	FACULTATIVO ESPECIALISTA BIOQ. ESTATUTARIO	ICS HOSP.VALL HEBRON
1991-2003	PROFESOR ASOCIADO ESCUELA UNIVERSITARIA.	ESC. ENFERMERIA HOSP VALL HEBRON
2015-2018	PROFESOS ASOCIADO FAC CIENCIAS Y MEDICINA	UNIVERSITAT AUTONOMA BARCELONA

Expediente Nº
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
CAPACIDAD FORMATIVA DEL IP Y COIP

- **Relación de Tesis doctorales o de Máster dirigidas en los últimos 5 años: Referencie: doctorando; título; año; Universidad/Institución.**
- **Relación de Recursos Humanos obtenidos como jefe de grupo en convocatorias nacionales o internacionales en los últimos 5 años: Referencie: programa (ej.: Ramón y Cajal; Miguel Servet; Río Hortega; Marie Curie ...); investigador contratado; agencia financiadora; duración desde ... hasta ...**

(Ajustese al espacio disponible)

TESIS DOCTORALS DIRIGIDAS Y PRESENTADAS: (Nota: UAB: Universitat Automa Barcelona; UB: Universitat Barcelona)

1- M Homs Riba; " Analysis of the natural evolution of the hepatitis B quasispecies in the precore/ core regions and treatment effects using conventional techniques and ultra-deep pyrosequencing", 20/06/2012; Univ Autònoma Barcelona (.
2-D Taberner Caellas; "Estudi de la composició de la quasispecies del virus de la hepatitis B a les regions codificants de les proteïnes de l'envolta i la polimerasa viral per sequenciació massiva: associació de les seves variants genètiques amb el tractament antiviral de la hepatitis B crònica amb anàlegs de nucleòsids /nucleòtids.; 11/12/2015; UAB
3-A Caballero Garralda; "Complejidad de la cuasispecie del virus de la hepatitis B en la region X/preCorre: asociación con la evolución de la infección con y sin tratamiento antiviral"; 28/11/2016 ; UAB
4-I Belmonte Mula; "Actualización del diagnóstico in vitro del déficit de alfa uno antitripsina: Estudio de la variante minoritaria Mmalton y desarrollo de un algoritmo integral en suero/plasma; 29/09/2017, UAB
MASTER DIRIGIDOS Y PRESENTADOS:
1-M Mosquera Parrado; "Virus Hepatiis B en cultiu de cel.lules HUH7: Estudi de la capacitat replicativa de la mutant deficitaries sW172stop"; Julio 2012; UAB
2-C Ramirez; "Validació de la tecnologia de Ultrapirosequenciació (FLX-454) com a tecnica quantitativa: Comparació de les proporcions de variants del VHB per clonatge"; Julio 2012; UAB
3-S Sopena; "Cuantificación de la proporción de genomas editados y sin editar del virus de la hepatitis Delta mediante secuenciación masiva y clonage molecular (Master en Recerca Clinica, Especialitat Microbiologia)"; 29/06/2016; UB(Biologia)
4-M Llorens; "Estudi de la dinàmica de la quasispècies viral durant la reinfecció endògena en pacients amb infecció crònica pel virus de l'Hepatitis C després del transplantament"; Sep 2016; UAB
5- M Yll Picó; "Variabilidad de las quasispecies virales del gen X del VHB en pacientes con hepatocarcinoma: aproximación mediante secuenciación masiva (Master: investigación biomédica translacional"; Julio 2017; UAB
6-S Píriz Ruzo; "Epidemiological study of patients with hepatitis E virus infection in Catalonia: translational study o genotype 3 subtypes"; 13/09/2017; UABAutónoma de Barcelona (Veterinaria):
RECURSOS HUMANOS : GLD17/00276, evaluada Instituto Carlos III : contratos parciales E Vargas Accarino y Sofia Piriz Ruzo

CAPACIDAD Y LIDERAZGO EN PROGRAMAS INTERNACIONALES DE I+D+I DEL IP Y COIP

Expediente N°
PI18/01436

TITULO: Estudio de la quasispecies del gen X en ARN circulante del virus de la hepatitis B (ARN-VHB): en búsqueda de nuevos factores pronósticos y dianas para terapia génica

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

CO-INVESTIGADOR/A PRINCIPAL:

TIPO DE PROYECTO: ☒ INDIVIDUAL ☐ COORDINADO ☐ MULTICÉNTRICO

NOMBRE DEL IP COORDINADOR:

(Cumplimentar sólo en caso de proyectos coordinados)

DURACION: ☒ 3 AÑOS

RESUMEN (Objetivos y Metodología del Proyecto)

(Ajustese al espacio disponible)

Objetivos: (1) Estudiar la quasispecies del ARN-VHB circulante en la región del gen X: a. Grado de complejidad y variantes más prevalentes; b. Nivel de conservación; y compararla con la de ADN-VHB circulante. (2) Analizar la ratio de los transcritos del gen X (tanto canónicos como cortos) respecto a los otros transcritos virales, relacionando sus niveles con el grado de daño hepático. (3) Establecer un modelo de cultivo *in vitro* que permita a. Confirmar fenotípicamente los resultados basados en los datos de quasispecies de ARN-VHB circulante; b. Testar la producción de transcrito corto del gen X y evaluar la contribución al daño celular de la proteína que codifica; c. Probar *in vitro* una estrategia basada en terapia génica utilizando siRNA específicos de secuencias híper-conservadas del gen X. **Metodología:** Se incluirán retrospectiva y prospectivamente 160 pacientes infectados por VHB en distintos estadios clínicos: **A.** 80 con hepatitis crónicas y lesión hepática moderada, **B.** 20 con hepatitis crónicas y lesión hepática avanzada, **C.** 20 con carcinoma hepatocelular, **D.** 40 con infección crónica HBeAg negativa. En todos se analizará el ARN-VHB circulante total y, en aquellos que tengan niveles adecuados, la complejidad, variantes y conservación de la quasispecies obtenidos, junto con la proporción relativa de transcritos canónicos y cortos del gen X, se correlacionarán con su estado clínico y nivel de daño hepático. Esta relación, así como la función de la proteína X corta, se estudiará *in vitro* a fin de buscar posibles marcadores predictivos de la evolución de la enfermedad hepática. Asimismo, se evaluará *in vitro* la posible utilidad de las secuencias conservadas como dianas de un sistema de terapia génica con siRNAs específicos.

TITLE: Study of the X gene quasispecies in circulating hepatitis B virus RNA (HBV-RNA): in search of new prognostic factors and targets for gene therapy

ABSTRACT (Objectives and Methodology of the project)

(Please only use the space provided below)

Objectives: (1) To study the circulating HBV-RNA quasispecies in the region of the X gene: a. Degree of complexity and more prevalent variants; b. Conservation level; and compare it with those of circulating HBV DNA. (2) To analyze the ratio of the X gene transcripts (both canonical and short) with respect to the other viral transcripts, relating their levels with the degree of liver injury. (3) To establish an *in vitro* culture model that allows a. Phenotypically confirm the results obtained on the quasispecies of circulating HBV-RNA; b. Test the production of the short transcript of the X gene and evaluate the encoded protein contribution to cellular injury; c. Test *in vitro* a strategy based on gene therapy with specific siRNAs of hyper-conserved sequences of the X gene. **Methodology:** 160 HBV-infected patients in different clinical stages will be included retrospectively and prospectively: **A.** 80 with chronic hepatitis and moderate liver injury, **B.** 20 with chronic hepatitis and advanced liver injury, **C.** 20 with hepatocellular carcinoma, **D.** 40 with chronic HBeAg negative infection. The total circulating HBV-RNA will be analyzed in all patients and the complexity, variants and conservation of the quasispecies in the X region, together with the relative proportion of both canonical and short transcripts of the X gene, will be analyzed in those showing adequate HBV-RNA levels. The data obtained will be correlated with patient's clinical status and the level of liver injury. This relationship, as well as the function of the short X protein, will be studied *in vitro* in order to look for possible predictive markers of liver disease evolution. Likewise, the possible usefulness of conserved regions as targets of a gene therapy system based on specific siRNAs will be evaluated *in vitro*.

Expediente Nº
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Finalidad del proyecto, antecedentes y estado actual de los conocimientos científico-técnicos, grupos nacionales o internacionales que trabajan en la línea específica del proyecto o en líneas afines.

Citar las referencias en el apartado siguiente: Bibliografía más relevante.

Máximo 3 páginas (15.700 caracteres)

FINALIDAD DEL PROYECTO

La finalidad de este proyecto es identificar nuevos factores pronósticos y nuevas dianas terapéuticas en pacientes con infección por el virus de la hepatitis B, a través del análisis de las quasiespecies del ARN-VHB circulante en la región del gen X.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 257 millones de personas en el mundo viven con una infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB), y se calcula que entorno al 15-40% de estos pacientes desarrollarán cirrosis hepática, fallo hepático o carcinoma hepatocelular (CHC) con una tasa de mortalidad alrededor del 15-25%[1]. A pesar de la disponibilidad de una vacuna, su cobertura no es total (fracaso del 5-10%, principalmente en las regiones endémicas)[2 -4]. Incluso, disponiéndose de tratamientos antivirales de alta eficiencia, estos tan solo inhiben la replicación viral pero no consiguen la curación de la infección [5] Todo esto reafirma la necesidad de explorar nuevas estrategias de intervención sobre esta infección que se considera un problema de salud pública global.

El virus de la hepatitis B pertenece a la familia *Hepadnaviridae*. Este pequeño virus tiene un genoma formado por una molécula de ADN parcialmente bicatenario con una cadena completa y una incompleta (ADN "circular relajado" - ADNcr). Una vez que el virus entra en las células hepáticas, en el núcleo celular el ADNcr es convertido en una molécula de ADN circular covalentemente cerrado (cccADN), que, empaquetándose tanto con proteínas celulares (histonas) como virales (proteína del core y X), formará un "minicromosoma" que permanecerá en la células infectadas[6] durante toda la vida de las mismas. A partir de este cccDNA se producirán los transcritos que codifican las proteínas virales: HBcAg (proteína del core), HBeAg, HBx (proteína X), P (polimerasa), L-, M- y S-HBsAg (proteínas de la envuelta). Entre los transcritos, el ARN pregenómico (ARNpg) se retro-transcribe, por parte del dominio RT (retrotranscriptasa) de la polimerasa viral, en el interior de las cápsidas neo-formadas dando lugar a nuevas moléculas de ADNcr, cosa que permite al virus replicar de manera "escondida" del posible reconocimiento por la respuesta innata celular.

En la infección por VHB, además del virion completo (partícula Dane), se han descrito otras partículas: las denominadas partículas Sub-virales (filamentosas y esféricas) formadas de proteínas de la envuelta en un gran exceso sobre los viriones (>10.000 veces) [7, 8], y otras partículas con cápsida y envuelta pero sin genoma (viriones vacíos) o incluso con ARN-VHB en su interior[9] formando el conjunto de los "transcritos virales circulantes".

Hasta la fecha, existen dos tipos de tratamientos aprobados contra la infección crónica por VHB. El tratamiento inmunomodulador basado en interferón-alfa pegilado (pegIFN- α), el cual es poco utilizado por su baja eficacia antiviral y sus efectos secundarios severos [10]. El tratamiento más ampliamente utilizado es la terapia oral con análogos de nucleot(s)idos (ANs) que inhiben la acción de la polimerasa viral en la transcripción inversa de ARNpg a ADNcr, reduciendo la replicación del VHB y la infección de nuevos hepatocitos en 80-90% de los pacientes tratados. Los protocolos de tratamiento actuales basados en los ANs, permiten controlar la infección por VHB, permitiendo la cura funcional de la infección (definida como el mantenimiento de niveles de ADN-VHB y HBsAg indetectables con o sin seroconversión)[5], y por ese motivo el uso de estos medicamentos está ampliamente extendido. Sin embargo, estos dos tratamientos no garantizan la no-progresión de la enfermedad hepática[11, 12]. En la infección por VHB, el riesgo acumulativo de desarrollar CHC (aunque sea en ausencia de carga viral detectable) a los 5 y 10 años se ha estimado en el 1,6-5,9% respectivamente, más alto en pacientes cirróticos, varones y con más de 50 años de edad[13]. En pacientes caucásicos, aunque inferior a los asiáticos, el riesgo de desarrollar CHC durante el tratamiento permanece relevante, manteniéndose <1% en pacientes no-cirróticos y entre 1,8-5,2% en pacientes cirróticos [14]. De hecho, los ANs no interfieren en la expresión del

cccADN (y del ADN viral integrado en el genoma de las células) que persiste en el núcleo de los hepatocitos. No obstante en ausencia de replicación viral debida al tratamiento, la transcripción del mismo se mantiene, siendo así fuente de replicación viral residual y producción de antígenos virales, contribuyendo a la progresión de la enfermedad hepática [5, 11, 15]. La cuantificación de los niveles de ADNccc intrahepático y su nivel de actividad transcripcional serían herramientas valiosas para la estimación del riesgo de desarrollar CHC [16 -18] pero requieren practicar una biopsia hepática, que es una técnica invasiva. Por ello, es relevante la búsqueda de biomarcadores plasmáticos que permitan estudiar la evolución de la población viral, especialmente en pacientes que presentan una viremia indetectable, a fin de poder controlar la progresión de la enfermedad hepática.

El ARN-VHB circulante representa una alternativa válida para el seguimiento de pacientes incluso en fase de viremia indetectable. Este ARN viral viaja en forma encapsidada y se especula que su origen depende de una alteración en el proceso de retrotranscripción [19], siendo una evidencia directa de la actividad transcripcional en los hepatocitos infectados. Se ha descrito su presencia tanto en pacientes HBsAg-positivos como pacientes seroconvertidos [20]. Recientemente se ha sugerido que el ARN viral circulante podría ser un predictor precoz de seroconversión del HBeAg en pacientes en tratamiento con ANs[21]. Además, en presencia de tratamiento, el nivel de ARN-VHB decae más lentamente que el de ADN-VHB, siendo, así, un posible predictor de rebote viral como consecuencia de la interrupción del tratamiento[19]. Recientemente, se ha propuesto el ARN circulante como marcador de la actividad de cccADN[22], puesto que es una evidencia directa de la transcripción del mismo. Además, se ha evidenciado que el ARN-VHB circulante está relacionado con el ARN-intrahepático (incluso más que con el ADN circulante) tanto cuantitativamente como en términos de complejidad de las quasiespecies (definida como el conjunto de variantes genéticas, similares aunque no idénticas, que constituyen la población viral que infecta un paciente)[23]. Estas evidencias apuntan al ARN-VHB circulante como un valioso marcador plasmático de la expresión intrahepática del virus y el estudio de la complejidad de su quasiespecies. En este sentido el estudio de la quasispecies del ARN-VHB circulante permitiría evidenciar las variantes más relevantes asociadas con la progresión de la enfermedad, permitiendo, por un lado, el estudio de la evolución viral incluso en pacientes con niveles indetectables de ADN circulante (sin tener que recurrir al estudio de biopsias), y por otro lado, evidenciar posibles variantes pronósticas del desarrollo de cirrosis o CHC.

Entre las proteínas virales, la HBx tiene un papel determinante en la progresión de la enfermedad. Esta proteína, codificada por el gen X, es parte constituyente del mismo cccADN y regula su transcripción a través de modificaciones epigenéticas[6]. Debido a su multifuncionalidad, puede interferir con la actividad celular de múltiples maneras [24 -26], constituyendo la principal proteína viral asociada a CHC. En nuestro proyecto PI15/00856 se ha estudiado complejidad y conservación de la quasiespecies viral en la región 5'-terminal del gen HBX (que codifica por la proteína homónima), evidenciado dos regiones híper-conservadas que podrían ser posible dianas para terapia génica a través del sistema del "small interference RNA" (siRNA). En la fase final de dicho proyecto se ha diseñado un siRNA en base a estas regiones cuya funcionalidad está, en la actualidad, en fase de validación experimental con la colaboración de la dra. Gloria Gonzalez (CIMA- Universidad Navarra). Teniendo en cuenta la importancia de los transcritos virales circulantes como marcadores de expresión viral, confirmar la conservación vista a nivel de ADN-VHB también a nivel del ARN-VHB circulante nos permitiría validar este posible tratamiento también en presencia de viremia indetectable. Además, los niveles del ARN circulante permitirían evaluar la eficacia del tratamiento con siRNA en estos pacientes. Además con el estudio de la conservación de las quasiespecies del ARN-VHB, se podrían también evidenciar otras regiones conservadas, ofreciendo así otras posible dianas de terapia génica.

Se ha descrito que la cápside viral puede contener en su interior tanto ARN pregenómico como otras formas de ARN tanto viral como celular dependiendo del estado de fosforilación de la región carboxi-terminal de las proteínas core, que pueden encapsidar moléculas de ARN inespecíficamente [9, 27]. Hace años se identificaron formas completas y más cortas de ARN circulantes [20]. En el último Congreso internacional de la asociación europea para el estudio del hígado (EASL), el grupo de Fletcher S.P. (Beran et al. SAT-182, EASL 19-23 Abril 2017) ha descrito la presencia de ARN del gen X en el sobrenadante de hepatocitos primarios infectados y en el plasma de pacientes crónicamente infectados por el virus de la hepatitis B, sugiriendo que la expresión precoz de la proteína X en el momento de la infección dependa de la presencia a nivel extracelular de tal transcrito [28]. En este sentido no podemos olvidar que en una infección crónica se están produciendo continuas "infecciones iniciales de hepatocitos" debido a las nuevas partículas virales que se producen y se liberan de las células infectadas y que infectarán a los hepatocitos cercanos. Además, en el estudio de Beran et al. se ha evidenciado la presencia de una población de transcritos del X más cortos. Estos transcritos podrían originarse en un promotor alternativo que se encuentra en la región codificante la proteína [29].

GRUPOS NACIONALES O INTERNACIONALES.

- A nivel nacional no hay otros grupos que hayan publicado estudios sobre el ARN circulante del VHB
- A nivel internacional destacan los estudios sobre el ARN circulante del grupo de la doctora Dandri M (Hamburg, Alemania), del doctor Berg T (Lipzig, Alemania), del doctor Fletcher (Foster City, EU), del doctor Lu F (Beijing, China) y del doctor Zaaijer HL (Amsterdam, Países Bajos).

Expediente N°
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD SECCIÓN ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Citar las referencias incluidas en el apartado anterior: Antecedentes y Estado actual.

(Máximo 1 página)

1. Lavanchy D, Kane M: **Global Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection**. In *Hepatitis B Virus in Human Diseases*. Edited by Liaw Y, Zoulim F. Humana Press, Cham; 2016:187 -203.
2. Tajiri K, Shimizu Y: **Unsolved problems and future perspectives of hepatitis B virus vaccination**. *World J Gastroenterol* 2015, **21**:7074 -7083.
3. Lai M, Lin T, Tsao K, Huang C, Hsiao M, Liang K, Yeh C: **Increased Seroprevalence of HBV DNA With Mutations in the S Gene Among Individuals Greater Than 18 Years Old After Complete Vaccination**. *Gastroenterology* 2012, **143**:400 -407.
4. Wu T-W, Lin HH, Wang L-Y: **Chronic hepatitis B infection in adolescents who received primary infantile vaccination**. *Hepatology* 2013, **57**:37 -45.
5. Testoni B, Levrero M, Zoulim F: **Challenges to a Cure for HBV Infection**. *Semin Liver Dis* 2017, **37**:231 -242.
6. Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, Raimondo G, Levrero M: **Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:19975 -19979.
7. Grimm D, Thimme R, Blum HE: **HBV life cycle and novel drug targets**. *Hepatol Int* 2011, **5**:644 -53.
8. Lesmana CRA, Jackson K, Lim SG, Sulaiman A, Pakasi LS, Gani R a, Hasan I, Sulaiman AS, Lesmana L a, Hammond R, Revill P, Locarnini S, Bowden SD: **Clinical significance of hepatitis B virion and SVP productivity: relationships between intrahepatic and serum markers in chronic hepatitis B patients**. *United Eur Gastroenterol J* 2014, **2**:99 -107.
9. Hu J, Liu K: **Complete and incomplete hepatitis B virus particles: Formation, function, and application**. *Viruses* 2017, **9**:1 -17.
10. Zoulim F, Durantel D: **Antiviral Therapies and Prospects for a Cure of Chronic Hepatitis B**. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015, **5**:a021501 -a021501.
11. Gounder PP, Bulkow LR, Snowball M, Negus S, Spradling PR, Simons BC, McMahon BJ: **Nested case-control study: hepatocellular carcinoma risk after hepatitis B surface antigen seroclearance**. *Aliment Pharmacol Ther* 2016, **43**:1197 -1207.
12. Cheung K-S, Seto W-K, Wong DK-H, Lai C-L, Yuen M-F: **Relationship between HBsAg, HBcrAg and hepatocellular carcinoma in patients with undetectable HBV DNA under nucleos(t)ide therapy**. *J Viral Hepat* 2017, **24**:654 -661.
13. Kim GA, Lee HC, Kim MJ, Ha Y, Park EJ, An J, Lee D, Shim JH, Kim KM, Lim YS: **Incidence of hepatocellular carcinoma after HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients: A need for surveillance**. *J Hepatol* 2015, **62**:1092 -1099.
14. Papatheodoridis G V, Lik H, Chan -Yuen, Hansen BE, Janssen HLA, Lampertico P: **Risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: Assessment and modification with current antiviral therapy**. 2015.
15. Boyd A, Lacombe K, Lavocat F, Maylin S, Mialhes P, Lascoux-Combe C, Delaugerre C, Girard PM, Zoulim F: **Decay of ccc-DNA marks persistence of intrahepatic viral DNA synthesis under tenofovir in HIV-HBV co-infected patients**. *J Hepatol* 2016, **65**:683 -691.
16. Bourne EJ, Dienstag JL, Lopez VA, Sander TJ, Longlet JM, Hall JG, Kwiakowski RW, Wright T, Lai CL, Condreay LD: **Quantitative analysis of HBV cccDNA from clinical specimens: correlation with clinical and virological response during antiviral therapy**. *J Viral Hepat* 2007, **14**:55 -63.
17. Takkenberg B, Terpstra V, Zaaijer H, Weegink C, Dijkgraaf M, Jansen P, Beld M, Reesink H: **Intrahepatic response markers in chronic hepatitis B patients treated with peginterferon alpha-2a and adefovir**. *J Gastroenterol Hepatol* 2011, **26**:1527 -1535.
18. Bai F, Yano Y, Fukumoto T, Takebe A, Tanaka M, Kuramitsu K, Anggorowati N, Rinonce HT, Widasari DI, Saito M, Hirano H, Hayakumo T, Seo Y, Azuma T, Ku Y, Hayashi Y: **Quantification of pregenomic RNA and covalently closed circular DNA in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma**. *Int J Hepatol* 2013, **2013**:849290.
19. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, Zhang R, Chen R, Li T, Zhang T, Yuan Q, Li PC, Huang Q, Colonna R, Jia J, Hou J, McCrae MA, Gao Z, Ren H, Xia N, Zhuang H, Lu F: **Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound**. *J Hepatol* 2016, **65**:700 -710.
20. Su Q, Breitzkreutz R, Schröder CH, Edler L, Su Q, Wang SF, Chang TE, Hennig H, Takegoshi K: **Circulating hepatitis B virus nucleic acids in chronic infection: Representation of differently polyadenylated viral transcripts during progression to nonreplicative stages**. *Clin Cancer Res* 2005, **7**:2005 -2015.
21. van Bömmel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Krüger DH, Berg T, Edelmann A: **Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors**. *Hepatology* 2015, **61**:66 -76.
22. Giersch K, Allweiss L, Volz T, Dandri M, Lütgehetmann M: **Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity**. *J Hepatol* 2016, **66**:460 -462.
23. Wang J, Yu Y, Li G, Shen C, Meng Z, Zheng J, Jia Y, Chen S, Zhang X, Zhu M, Zheng J, Song Z, Wu J, Shao L, Qian P, Mao X, Wang X, Huang Y, Zhao C, Zhang J, Qiu C, Zhang W: **Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients**. *J Hepatol* 2017, xxx.
24. Chemin I, Zoulim F: **Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma**. *Cancer Lett* 2009, **286**:52 -59.
25. Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, Zoulim F, Hantz O, Protzer U: **Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection**. *J Hepatol* 2011, **55**:996 -1003.
26. Tarocchi M: **Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis**. *World J Gastroenterol* 2014, **20**:11630.
27. Su P-Y, Yang C-J, Chu T-H, Chang C-H, Chiang C, Tang F-M, Lee C-Y, Shih C: **HBV maintains electrostatic homeostasis by modulating negative charges from phosphoserine and encapsidated nucleic acids**. *Sci Rep* 2016, **6**:38959.
28. Niu C, Livingston CM, Li L, Beran RK, Daffis S, Ramakrishnan D, Burdette D, Peiser L, Salas E, Ramos H, Yu M, Cheng G, Strubin M, Delaney WE, Fletcher SP: **The Smc5/6 Complex Restricts HBV When Localized to ND10 without Inducing an Innate Immune Response and Is Counteracted by the HBV X Protein Shortly after Infection**. *PLoS ONE* 2017, **12**:e01696648.
29. Altinel K, Hashimoto K, Wei Y, Neuveut C, Gupta I, Suzuki AM, Dos Santos A, Moreau P, Xia T, Kojima S, Kato S, Takikawa Y, Hidaka I, Shimizu M, Matsura T, Tsubota A, Ikeda H, Nagoshi S, Suzuki H, Michel M-L, Samuel D, Buendia MA, Faivre J, Carninci P: **Single-Nucleotide Resolution Mapping of Hepatitis B Virus Promoters in Infected Human Livers and Hepatocellular Carcinoma**. *J Virol* 2016, **90**:10811 -10822.

Expediente Nº
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

(Ajustese al espacio disponible)

HIPÓTESIS

1. Teniendo en cuenta la relación del ARN-VHB circulante con la transcripción viral intra-hepática, el análisis de su quasispecies en distintos grupos clínicos podría aportar informaciones útiles para predecir la evolución del daño hepático. Además, este nuevo marcador virológico es detectable en ausencia de replicación viral debida a la terapia antiviral, por lo que su estudio podría ser una herramienta útil para monitorizar pacientes con baja carga viral, especialmente en los casos en que se evidencia una progresión de la enfermedad hepática (hasta carcinoma hepatocelular, CHC) a pesar de la supresión de la viremia.
2. Entre los diferentes transcritos del VHB, los del gen X codifican la proteína X, multifuncional y polimórfica, que juega un papel clave en la replicación viral y en la progresión del daño hepático, siendo factor determinante en el desarrollo de CHC. Por este motivo, estos transcritos podrían estar relacionados con el grado de severidad de lesión hepática y por lo tanto constituir marcadores útiles para predecir la evolución de la enfermedad. Además, recientemente se ha descrito la producción de transcritos cortos del gen X que codifican una proteína X también más corta. El nivel de transcritos del gen X, tanto canónicos como cortos, podría variar entre las diferentes fases de la enfermedad (infecciones crónicas y hepatitis crónicas VHB) o en el período de supresión de la replicación viral.
3. En el proyecto PI15/00856 se evidenciaron dos regiones conservadas en la porción 5' del gen X. Confirmar esta conservación también a nivel de los transcritos circulantes permitiría garantizar la eficacia de un sistema de ARN interferentes también en pacientes con viremia indetectable. Además, se podrán identificar nuevas regiones conservadas que podrían contener potenciales dianas terapéuticas para un sistema de *small interference RNA* (siRNA).

OBJETIVOS

1. Estudio de la quasispecies del ARN-VHB circulante en la región del gen X, que es común en todas las formas de ARN viral:
 - a. Grado de complejidad (Entropía de Shannon, índice de Gini-Simpson, frecuencia de mutación, diversidad nucleotídica, etc.) y variantes (cambios de aminoácido, inserciones o deleciones) más prevalentes en los distintos grupos de pacientes.
 - b. Nivel de conservaciónLos resultados obtenidos se correlacionarán con la quasispecies de ADN circulante en los casos en que esto sea analizable (niveles de ADN-VHB suficientes para su amplificación).
2. Analizar la ratio del ARN mensajero del gen X respecto a los otros transcritos virales, mediante técnicas basadas en amplificación de diferentes regiones del genoma del VHB, en los distintos grupos clínicos y relacionar sus niveles con el grado de daño hepático:
 - a. Para los transcritos canónicos del gen X
 - b. Para las otras formas de transcritos del gen X
3. Establecer un modelo de cultivo *in vitro*, basado en la transfección de las líneas celulares HepG2 e infección de la línea celular HepG2-NTCP, que permita:
 - a. Confirmar fenotípicamente los resultados basados en los datos de quasispecies de ARN-VHB circulantes obtenidos por secuenciación masiva. Las variantes más prevalentes se estudiarán *in vitro* por mutagénesis dirigida y transfección/infección de células susceptibles a fin de evaluar la capacidad replicativa de las variantes mediante la cuantificación del HBsAg, HBcrAg y HBV DNA (extracelular e intracelular asociado a capsido) y la presencia de alteraciones de la actividad celular (estrés oxidativo y ciclo proliferativo o apoptosis).
 - b. Testar la producción de transcrito corto del gen X y la función de la proteína que este codifica, a fin de evaluar su contribución al daño celular, silenciando el promotor canónico para que solo se produzca la forma corta del transcrito del X. La contribución al daño celular se evaluará mediante marcadores de estrés oxidativo y ciclo proliferativo/apoptosis.
 - c. Probar *in vitro* una estrategia basada en terapia génica dirigida con siRNA contra dianas hiper-conservadas previamente detectadas en el gen X y confirmadas en sus transcritos, así como contra otras regiones hiper-conservadas evidenciadas durante este proyecto.

**Expediente N°
PI18/01436**

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

**MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN PROYECTOS COORDINADOS**

En caso de Proyectos Coordinados, el COORDINADOR deberá indicar:

- Objetivos globales del proyecto coordinado, la necesidad de dicha coordinación y el valor añadido que se espera obtener de la misma.
- Objetivos específicos de cada subproyecto (deben estar recogidos además en la memoria de cada subproyecto)
- Interacción entre los distintos objetivos, actividades y subproyectos.
- Los mecanismos de coordinación previstos para la eficaz ejecución del proyecto. **Máximo 3 páginas (15.700 caracteres)**

Expediente N°
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN METODOLOGÍA

Diseño, sujetos de estudio, variables, recogida y análisis de datos y limitaciones del estudio.

Máximo 3 páginas (15.700 caracteres)

Diseño:

Estudio retrospectivo/prospectivo que incluye 160 pacientes con infección crónica por VHB en diferentes estadios de la infección.

Criterios de inclusión:

- Pacientes adultos con infección crónica por VHB (HBsAg positivo durante más de 6 meses).
- Pacientes con hepatitis crónicas HBeAg positivo y negativo (inmunoreactivos HBeAg positivos y con hepatitis crónica HBeAg negativo) y con infecciones crónicas HBeAg negativo (portadores inactivos).
- Con diferentes niveles de lesión hepática, desde ausencia de fibrosis hasta fibrosis avanzada, cirrosis y CHC.

Criterios de exclusión:

- Coinfección con el virus de la hepatitis D (VHD) y C (VHC) y virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH).
- Trasplante hepático y/o inmunosupresión.

Para hacer posible la obtención de las muestras en el periodo de desarrollo del proyecto, se procesaran indistintamente muestras retrospectivas (disponibles en seroteca) o prospectivas, que incluirán 1 muestra de suero/plasma obtenida durante el año anterior a su inclusión y 3 muestras de suero/plasma al inicio del tratamiento, 6 meses y un año después (4 muestras por paciente).

Durante el seguimiento de estos pacientes se recogerán los siguientes parámetros:

- Datos demográficos (Edad, sexo, etnia, estado clínico en el momento de la inclusión en el estudio o antecedentes clínicos de interés).
- Datos de evolución clínica: progresión de la lesión hepática y/o desarrollo de CHC, evaluado mediante pruebas de imagen (ecografía, con o sin biopsia) o elastografía de transición, cuando sean solicitadas por el facultativo que realiza su seguimiento clínico. Signos de descompensación hepática (ascitis, hemorragia digestiva, encefalopatía hepática, etc.).
- Datos analíticos (AST, ALT, coagulación, plaquetas y albúmina).
- Marcadores serológicos (HBsAg cuantitativo y cualitativo, HBeAg, anti-HBe).
- Marcadores virológicos de replicación viral (ADN-VHB).

En todas las muestras se evaluarán:

- Complejidad y conservación de las quasiespecies virales tanto en el ARN como el ADN circulantes de VHB.
- Niveles de ARN-VHB circulante total y proporción relativa de los transcritos del gen X respecto a las otras formas del ARN-VHB circulante.

En muestras con niveles de ARN-VHB circulante total [determinados por *reverse transcription* (RT)-PCR a tiempo real] adecuados para su amplificación, los datos de complejidad, conservación y variantes principales de la quasiespecies de ARN virales circulantes, obtenidos por secuenciación masiva, serán correlacionados con los datos de evolución clínica, datos analíticos, marcadores serológicos y marcadores virológicos. Estos datos se comparan con los datos de complejidad y conservación del ADN circulante en la misma muestra (siempre que sus niveles sean adecuados para su amplificación). Las variantes más prevalentes observadas por secuenciación masiva, se estudiarán *in vitro* a fin de evaluar fenotípicamente sus efectos sobre la replicación del VHB y en la actividad celular (estrés oxidativo, ciclo celular y apoptosis). Además se testará *in vitro*, mediante transfección de células susceptibles, la producción del transcrito del gen X más corto, modificando por mutagénesis la función del promotor canónico del gen, y la actividad de la proteína resultante de la traducción de este transcrito. Finalmente, se estudiará, también *in vitro*, la eficiencia de un sistema de siRNAs dirigidos a las regiones conservadas ya descritas o encontradas a lo largo del proyecto en RNA circulante.

La proporción relativa de los transcritos del gen X (tanto canónicos como cortos) se analizará en las muestras con niveles de ARN-VHB circulante total detectable en todos los pacientes, por PCR a tiempo real en diferentes regiones del genoma viral que permitirá diferenciar los niveles de diferentes transcritos del gen X. En los pacientes con lesión hepática y/o con CHC, se estudiará la relación de esta proporción con la aparición de la lesión (en la muestra retrospectiva recogida antes de su diagnóstico) y en todos los pacientes con su evolución clínica a lo largo del periodo de seguimiento retrospectivo/prospectivo de este estudio.

Sujetos:

Grupo A: Hepatitis crónicas con lesión hepática moderada:

80 pacientes con hepatitis crónica B y grado de fibrosis < F3. De éstos se recogerá una muestra al inicio del tratamiento antiviral. A partir de ahí se recogerá una muestra anterior (alrededor de 6 meses) y 2 muestras de seguimiento (6 meses y 1 año). Estos pacientes se subclasificarán en:

A1. Pacientes con hepatitis crónica HBeAg positiva:

20 pacientes HBeAg positivo con ADN-VHB > 10000 UI/mL y/o niveles de ALT > 50 UI/L.

A2. Pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativa:

60 pacientes HBeAg negativo con ADN-VHB > 2000 UI/mL y niveles de ALT > 50 UI/L.

Grupo B: Hepatitis crónicas con lesión hepática avanzada

20 pacientes con hepatitis crónica B, HBeAg positiva o negativa, con o sin tratamiento y grado de fibrosis > F3. Estos pacientes se incluirán en el momento en que se evidencie la lesión hepática por pruebas de imagen (ecografía con o sin biopsia), donde se recogerá una muestra. A partir de ahí se obtendrá una muestra anterior y 2 muestras de seguimiento (6 meses y 1 año después de la evidencia de la lesión).

Grupo C: Pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC)

20 pacientes con hepatitis crónica B HBeAg positiva o negativa y evidencia de CHC por pruebas de imagen (ecografía con o sin biopsia), con o sin tratamiento. Las muestras se recogerán como se ha descrito en el grupo B.

Grupo D: Infección crónica HBeAg negativa (portadores inactivos)

40 pacientes con infección crónica por VHB y niveles de ADN-VHB < 20000 UI/mL, niveles de ALT < 50 UI/L y sin evidencias de lesión hepática por pruebas de imagen (ecografía con o sin biopsia) antes de la inclusión en este estudio. Las muestras de estos pacientes se incluirán prospectivamente desde el inicio del estudio y durante un periodo de seguimiento de 2 años.

Variables

- 1. Datos demográficos:** a) edad (fecha de nacimiento); b) sexo; c) etnia d) estado clínico (asintomático, signos de descompensación hepática, etc.) En todos los pacientes.
- 2. Evolución clínica:** a) progresión de la lesión hepática: aumento de la fibrosis valorado por elastografía de transición y/o ecografía o descompensación (aparición de ascitis, hemorragia digestiva, encefalopatía hepática, etc.) y/o desarrollo de CHC; b) datos analíticos (AST, ALT, coagulación, plaquetas y albúmina). En todos los pacientes.
- 3. Parámetros virológicos:** a) marcadores de replicación viral (niveles de ADN-VHB circulante) en todos los pacientes; b) El genotipo del VHB, determinado en la región preS del genoma viral en el ADN-VHB circulante, en aquellos pacientes con muestras con niveles adecuados para su amplificación; c) niveles de ARN-VHB circulante total en todos los pacientes; d) proporción relativa del transcrito del gen X circulantes, solo en muestras con niveles de ARN-VHB detectables.
- 4. Parámetros de variabilidad y conservación de las quasiespecies del ARN circulante:** Se analizará la quasiespecie viral en la región entre los nucleótidos 1250 y 1921 en muestras con niveles de ARN-VHB adecuados para su amplificación, donde se determinará en las secuencias obtenidas del ARN-VHB; a. La frecuencia de las variantes con cambios de aminoácido, inserciones y/o deleciones, en relación a la secuencia consenso del genotipo asignado; b. La complejidad de la quasiespecie mediante el cálculo de: entropía de Shannon, índice de Gini-Simpson, diversidad nucleotídica y frecuencia de mutación; c. La conservación de la región estudiada mediante análisis del contenido de información. Los resultados obtenidos serán comparados con las mismas variables determinadas en el ADN-VHB circulante, en aquellas muestras con niveles adecuados para su amplificación.
- 5. Parámetros para los estudios *in vitro*:** la replicación y niveles de expresión génica viral *in vitro* se evaluará a través de: a. La cuantificación del ADN y ARN-VHB en el sobrenadante; b. La cuantificación de las proteínas virales (HBsAg y HBcrAg); c. Relación entre las variantes más relevantes o la presencia de una proteína X más corta y el daño celular evaluada con a) análisis de marcadores de daño oxidativo; b) alteraciones del ciclo proliferativo celular; c) apoptosis.

Recogida de datos:

- Los datos de demográficos y de evolución clínica de los pacientes se recogerán en el momento de su inclusión y durante el seguimiento de los que se estudien prospectivamente, por revisión de su historia clínica.
- Los datos analíticos y resultados serológicos y virológicos se obtendrán en cada muestra de suero/plasma recogida, a partir de las analíticas solicitadas por el facultativo que realiza el seguimiento clínico de los pacientes. El genotipo del VHB se determinará por secuenciación Sanger de la región preS del genoma viral. Los niveles de ARN-VHB total y la proporción de diferentes transcritos del gen X se determinarán por RT-PCR a tiempo real *in-house*.
- La complejidad/conservación de las quasiespecies de VHB se determinará por secuenciación masiva en todas las muestras de suero/plasma a partir del ARN y/o ADN-VHB circulantes.
- Todos los datos demográficos, clínicos y virológicos y sobre la complejidad y conservación de las quasiespecies del VHB, serán incluidos en una base de datos anonimizada.
- La replicación *in vitro* de las variantes de VHB de interés o en presencia del transcrito más corto de la proteína X, se medirá en las células infectadas y/o transfectadas mediante la cuantificación de ADN-VHB (tanto en el sobrenadante como a nivel intracelular asociado a cápside) por PCR a tiempo real, HBsAg y HBcrAg por técnicas de quimioluminiscencia automatizadas y ARN-VHB extracelular por RT-PCR a tiempo real *in-house*. El mismo tipo de datos se evaluará tanto en ausencia como presencia de siRNAs dirigidos contra las regiones conservadas identificadas en los transcritos virales. Se realizarán un mínimo de tres experimentos independientes por lo menos en duplicado.
- La actividad celular de las células infectadas y/o transfectadas con las variantes virales de interés o en presencia del transcrito más corto del X, se evaluará mediante el estudio de marcadores de daño oxidativo o alteración del ciclo proliferativo celular mediante citometría y/o microscopía de fluorescencia.

Análisis de datos:

- En todas las muestras se analizarán los niveles de ARN-VHB circulante y en aquellas con niveles detectables, se analizará la proporción de diferentes transcritos del gen X por RT-PCR a tiempo real en diferentes regiones del genoma viral, normalizando los niveles obtenidos en las diferentes regiones y calculando la diferencia entre ellos.
- A partir del ARN-VHB y ADN-VHB circulantes, se evaluará la variabilidad/complejidad del VHB por secuenciación masiva, mediante los algoritmos de análisis bioinformático desarrollados en anteriores proyectos de investigación en salud (PS09/0899, PI11/01973, PI12/01893, PI14/01416, PI15/00856), adaptados para este proyecto. Estos algoritmos ya han sido utilizados con éxito para analizar el bucle antigénico de las proteínas de superficie y la retrotranscriptasa de la polimerasa del VHB (Rodríguez-Frías F, et al. PLoS ONE 2012;7:e37874), la región

preCore/Core (Homs M et al. Nucleic Acids Res 2011; 39:8457) y la región preS (Casillas R et al. World J Gastroenterol 2018;24(6): 680).

- Los datos de complejidad de las quasiespecies del ARN-VHB circulante o los niveles ARN-VHB y de transcritos del gen X en los distintos grupos de pacientes y sus datos clínicos [incluyendo estado de fibrosis y datos analíticos (niveles de biomarcadores bioquímicos y hematológicos)] y demográficos, serán analizados por regresión estadística a fin de evaluar su valor pronóstico. Además los datos de complejidad se correlacionarán estadísticamente con la complejidad evidenciada en el ADN-VHB.
- A partir de las secuencias obtenidas de los transcritos virales circulantes por secuenciación masiva, se analizará el contenido de información a fin de confirmar las regiones conservadas identificadas en el proyecto PI15/00856 e identificar otras regiones conservadas que puedan ser posibles dianas de terapia génica con siRNA. Este sistema se probará *in vitro*, a fin de evaluar su posible utilidad en una futura terapia antiviral.
- Las variantes más relevantes identificadas por secuenciación masiva se testarán *in vitro* en modelos de transfección/infección de células susceptibles a fin de evaluar cómo estas variantes pueden afectar la replicación viral y la actividad celular (daño oxidativo, ciclo proliferativo y apoptosis), para relacionar experimentalmente las variantes con la evolución clínica de la patología.
- Asimismo, la función del transcrito corto del X, y de la proteína que codifica, se estudiará en modelos de cultivo *in vitro*, a fin de evaluar tanto su capacidad de transactivación de la replicación viral como su influencia en la actividad celular.

Limitaciones del estudio

Este proyecto se basa en la cuantificación y análisis de la población de transcritos circulantes del VHB y requiere el diseño y optimización de una metodología sensible y repetible de extracción y detección de este tipo de moléculas, sin embargo, en la actualidad todavía no existe una metodología estandarizada que permita hacerlo.

El estudio de las quasiespecies del VHB por secuenciación masiva supone una elevada complejidad técnica y un alto coste económico de cada experimento. No obstante, el alto rendimiento de estas tecnologías permite analizar cuantitativamente las quasiespecies del VHB con una elevada sensibilidad independientemente de los conocimientos previamente establecidos, como se ha demostrado en anteriores proyectos de investigación en salud desarrollados por nuestro grupo de investigación (PI09/0899, PI11/01973, PI12/01893, PI14/01416 y PI15/00856). Así mismo durante el desarrollo del proyecto más reciente (PI15/00856) se ha podido optimizar el coste por muestra en cada experimento mediante una metodología de universalización que permite la inclusión de diversos pools de muestras en un único experimento. Todo ello justifica el uso de las tecnologías de secuenciación masiva en este proyecto.

La comprobación *in vitro* del efecto de la variabilidad de las quasiespecies del VHB sobre la replicación del VHB y su efecto en la actividad celular también supone una elevada complejidad técnica y coste económico debido a:

- La puesta a punto de un sistema de cultivo celular capaz de soportar la infección y la replicación del VHB en presencia de variantes virales.
- No ser posible simular *in vitro* las quasiespecies virales evidenciadas en cada paciente. Por eso, el proyecto se focalizará en el estudio de las variantes más relevantes identificadas.
- El estudio de un sistema siRNA que utilice como diana las regiones conservadas evidenciadas por secuenciación masiva supone un incremento adicional del coste económico del proyecto, pero admisible teniendo en cuenta la utilidad terapéutica que podría comportar. Un estudio piloto similar se ha efectuado dentro del proyecto en curso, por lo que se dispone de la colaboración del grupo de la Dra. Gloria González (Centro de Investigación Médica Aplicada de Pamplona, CIMA), cuyo grupo dará apoyo a este proyecto como consta en el Anexo.

A pesar de estos factores limitantes, el número de pacientes con hepatitis crónica B en diferentes estadios clínicos (160) y muestras (un mínimo de 640) a procesar, junto con las metodologías de secuenciación masiva y fenotípicas desarrolladas en el proyecto actual (PI15/00856), y el apoyo del grupo de la Dra. Gloria González, nos permiten augurar el cumplimiento de los objetivos propuestos.

Expediente Nº
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD SECCIÓN PLAN DE TRABAJO

Etapas de desarrollo y distribución de las tareas de todo el equipo investigador, y las asignaciones previstas para el personal técnico que se solicita. Indicar además el lugar/centro de realización del proyecto.

(Ajustese al espacio disponible)

El estudio se realizará conjuntamente entre la unidad patología hepática (Servicios de bioquímica y microbiología) y la unidad de hepatología (Servicio de Medicina Interna) del hospital universitario Vall d'Hebron. Los miembros del equipo investigador de este proyecto son: el Dr. Francisco Rodríguez Frías (FRF), IP del proyecto, y la Dra. Andrea Caballero (AC), facultativos del servicio de bioquímica. Los doctores Rafael Esteban (RE) y Lluís Castells (LLC), facultativos del servicio de medicina interna. Finalmente, los doctores María Francesca Cortese (MFC) y David Tabernero (DT), Rosario Casillas (RC) y Marçal Yll (MY), personal investigador de laboratorio encargado de los estudios *in vitro* y de biología molecular. Aunque no forman parte del equipo investigador del proyecto, el Dr. Josep Gregori (JG) dará soporte bioinformático y la Dra. Gloria González (GG) dará soporte en los ensayos fenotípicos para las pruebas del siRNA. En este proyecto se han diferenciado 6 etapas:

1. Selección de los pacientes de los grupos A a D y recogida de muestras: A lo largo del primer año del proyecto LLC seleccionará un grupo de pacientes entre la población de pacientes con hepatitis crónica B que acude a las consultas externas del hospital universitario Vall d'Hebrón, a medida que vayan viniendo a las visitas rutinarias, a los que solicitará que firmen el consentimiento informado.

LLC revisará las historias clínicas de los pacientes que hayan firmado el consentimiento informado y recogerá los parámetros demográficos y clínicos. Estos datos, junto con el resto de resultados recogidos durante el estudio se incluirán en una base de datos anonimizada, la cual LLC se encargará de actualizar y valorar en coordinación con RE.

A medida que se vayan incluyendo los pacientes de los distintos grupos en el estudio AC, responsable del área de pre-analítica de los laboratorios clínicos del hospital Vall d'Hebrón, se encargará de buscar las muestras retrospectivas en la seroteca, así como recoger las muestras de los pacientes que se sigan prospectivamente, hasta el final del segundo año del proyecto. Estas muestras se conservarán a parte, a -80° C, hasta el momento de su procesamiento.

2. Puesta a punto de los protocolos para cuantificación y estudio de las quasiespecies de ADN y ARN circulantes: Durante los 6 primeros meses MFC y DT adaptarán o diseñarán las metodologías para cuantificar ARN-VHB circulante total y la proporción relativa de transcritos del gen X (tanto canónicos como cortos), así como los *primers* y reacciones de retrotranscripción y/o PCR para la creación de librerías de amplicones para secuenciación masiva a partir del ADN o ARN-VHB circulante. Las pruebas para ajustar estos métodos serán realizadas por RC y MY. FRF dará asesoramiento técnico en esta fase del proyecto.

3. Cuantificación de ARN circulantes y estudio de las quasiespecies de ADN y ARN-VHB: A partir de la segunda mitad del primer año, RC y MY empezarán la determinación de los niveles de ARN-VHB total circulante en las muestras recogidas hasta entonces por AC. En aquellas muestras con ARN-VHB total detectable se cuantificarán las proporciones relativas de transcritos del gen X y se analizará la complejidad y composición de la quasiespecies del ARN-VHB circulante. En las muestras con niveles detectables de ADN-VHB se analizará la quasiespecies viral en la misma región que en los transcritos. El análisis bioinformático y estadístico para estudiar la quasiespecies del VHB se realizará con la colaboración de JG. Esta etapa se llevará a cabo bajo la supervisión y asistencia de MFC y DT, que pasarán los datos obtenidos a RE y LLC para que los añadan a la base de datos, y se extenderá hasta el final del segundo año del proyecto, pudiéndose prorrogar hasta la mitad del tercer año para completar el seguimiento de algún paciente.

4. Estudios fenotípicos *in vitro*: Durante el último trimestre del primer año MFC y DT adaptarán o diseñarán las metodologías basadas en transfección de construcciones genéticas con el genoma del VHB que simulen las variantes más prevalentes en las quasiespecies virales, que se vayan observando a lo largo de la etapa anterior del proyecto, para realizar estudios fenotípicos sobre sus efectos en la replicación del VHB y actividad celular, además de la actividad resultante de los transcritos cortos del gen X. RC y MY llevarán a cabo las pruebas para ajustar estos métodos y a partir del primer trimestre del segundo año hasta el segundo semestre del tercer año, realizarán los experimentos diseñados por MFC, DT y FRF.

5. Diseño y estudio de la eficiencia de terapia génica basada en siRNA: A partir de los datos sobre conservación obtenidos en las quasiespecies virales de ARN-VHB circulante, se testará fenotípicamente la eficiencia de un sistema de terapia génica basada en siRNA dirigidos contra dianas en zonas conservadas de estos transcritos, desarrollados con el soporte de GG. MFC, DT, RC y MY llevarán a cabo las pruebas fenotípicas de este sistema de tratamiento desde el segundo semestre del segundo año hasta el primer semestre del tercero.

6. Elaboración de manuscritos para la publicación de los resultados obtenidos: Todo el equipo investigador colaborará en la redacción de manuscritos para publicar los resultados del proyecto en revistas clínicas y/o virológicas de alto impacto, durante el último año del proyecto.

FRF supervisará todas estas etapas del proyecto y coordinará los miembros del equipo investigador entre sí, y con los colaboradores externos.

Expediente N°
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

INTENSIFICACIÓN

En caso de solicitar Intensificación, describir la actividad asistencial (consulta, actividad quirúrgica, exploraciones complementarias, actividad en servicios centrales, etc.) que justifique la solicitud, en relación con la actividad de investigación desarrollada por el Investigador Principal (IP) (Ajustese al espacio disponible)

Expediente Nº
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN PLAN DE TRABAJO

(Ajustese al espacio disponible. Puede incorporar hasta un máximo de 8 líneas de Actividad/Tarea)

CRONOGRAMA

ACTIVIDAD / TAREA	PERSONA/S INVOLUCRADAS		MESES											
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Selección de los pacientes de los grupos A a D	LLC, RE	1º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
		2º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
		3º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ACTIVIDAD / TAREA	PERSONA/S INVOLUCRADAS		MESES											
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Recogida de muestras	AC	1º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
		2º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
		3º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ACTIVIDAD / TAREA	PERSONA/S INVOLUCRADAS		MESES											
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Creación y actualización de base de datos anonimizada	LLC, RE	1º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
		2º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
		3º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ACTIVIDAD / TAREA	PERSONA/S INVOLUCRADAS		MESES											
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Protocolos para cuantificación y estudio de las quasiespecies de ADN y ARN circulantes	MFC, DT, RC, MY, FRF	1º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☐	☐	☐	☐	☐	☐
		2º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
		3º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ACTIVIDAD / TAREA	PERSONA/S INVOLUCRADAS		MESES											
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Cuantificación de ARN circulantes y estudio de las quasiespecies de ADN y ARN-VHB	AC, MFC, DT, RC, MY, JG	1º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☒	☒	☒	☒	☒	☒
		2º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
		3º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ACTIVIDAD / TAREA	PERSONA/S INVOLUCRADAS		MESES											
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Estudios fenotípicos in vitro	MFC, DT, RC, MY, FRF	1º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☒	☒	☒	☒
		2º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
		3º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ACTIVIDAD / TAREA	PERSONA/S INVOLUCRADAS		MESES											
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Diseño y estudio de la eficiencia de terapia génica basada en siRNA	MFC, DT, RC, MY, GG	1º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
		2º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
		3º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☐	☐	☐	☐	☐	☐
ACTIVIDAD / TAREA	PERSONA/S INVOLUCRADAS		MESES											
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Elaboración de manuscritos para la publicación de los resultados obtenidos	FRF, AC, RE, LLC, MFC, DT, RC, MY	1º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
		2º Año	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
		3º Año	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒

Expediente N°
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN PLAN DE TRABAJO

Inserte (si lo desea) una imagen con un cronograma.

Máximo un fichero de imagen formato jpg

Expediente Nº
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN EXPERIENCIA DEL EQUIPO

Experiencia del equipo investigador sobre el tema.

(Ajustese al espacio disponible)

El grupo formado por investigadores de las unidades de patología hepática (servicios de bioquímica y microbiología) y hepatología (servicio de medicina interna) del Hospital Universitario Vall d'Hebron forma parte del Centro de Investigación Biomédica en Red de enfermedades hepáticas y digestivas (CIBERehd). Ambas unidades están integradas en el grupo de investigación en enfermedades hepáticas del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR) del hospital universitario Vall d'Hebron, y tienen una larga historia de colaboración de cerca de 30 años con numerosos artículos publicados.

En la infección crónica por VHB se han desarrollado estudios sobre la replicación viral y el tratamiento. En 1995 el análisis de las mutaciones del preCore/Core del VHB mostró que el cambio G por A en la posición 1896 es la responsable del 90% de las hepatitis crónicas anti-HBe positivo en nuestro entorno (Rodríguez-Frías F et al, Hepatol 1995;22:1641). En 1998 se evidenció la asociación entre la recidiva de la infección por VHB en pacientes trasplantados hepáticos en tratamiento con gammaglobulina antihepatitis B con mutaciones en la región de superficie del VHB (Rodríguez-Frías et al, Liver 1999; 19:177-182). Estudios de polimorfismos del VHB han permitido conocer la prevalencia y el significado clínico de los genotipos del VHB y de las mutaciones del promotor y de regiones epitópicas del gen core del VHB en nuestra área y su asociación con la infección crónica (Jardi R et al, J Hepatol 2004;40:507; Buti M et al, J Hepatol 2007;47:366; Jardi R et al, J Hepatol 2008;49:695; Tabernero D et al, Aliment Pharmacol Ther 2010; 32:97, Homs M et al, Antivir Ther 2011;16:37). También se ha investigado la selección de resistencias al tratamiento antiviral con análogos de nucleos(t)idos (Jardi R, J Virol Methods 1999;83:181; Rodríguez-Frías et al, J Med Virol 2007;79:1671; Jardi R et al, J Viral Hepat 2007;14:835; Jardi R et al, J Clin Microbiol 2009;47:485).

Desde 2011 una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo ha sido el estudio de las quasiespecies virales por secuenciación masiva, especialmente la del VHB (Homs M et al, Nucleic Acids Res 2011;39:8457; Rodríguez-Frías F et al, PLoS One 2012;7:e37874; Homs M et al, World J Gastroenterol 2012;18:6096; Homs M et al Plos One 2014; 9(11):e112306; Caballero A et al, Plos One 2015;10(12):e0144816, Buti M et al, Transpl Infect Dis, 2015; 17(2):208), y por ende el diseño de algoritmos bioinformáticos para el análisis de los datos obtenidos por esta técnica (Ramírez C et al, Antiviral Res 2013;98:273; Gregori J et al, PLoS One 2013;8:e83361). Prueba de la productividad de esta línea son las 3 tesis doctorales dirigidas por el Dr. Rodríguez-Frías (IP del proyecto) en el marco de esta línea (Dres. María Homs, David Tabernero y Andrea Caballero) y las revisiones bibliográficas en las que hemos participado (Rodríguez-Frías F et al. World J Gastroenterol 2013;19(41):6995, Quer J et al. Virus Res 2017;239:115). Además, recientemente también se han caracterizado parámetros que permiten establecer de manera objetiva los cambios en la complejidad en las quasiespecies virales para comparar muestras secuenciales de un mismo paciente o entre diferentes grupos de pacientes (Gregori J et al, Bioinformatics 2014;30:1104; Homs et al, Plos One 2014; 9(11):e112306; Gregori J et al, Virology 2016;493:227). También recientemente, el grupo ha colaborado en un estudio donde se caracterizan quasiespecies virales y se analiza fenotípicamente algunas de sus variantes con baja susceptibilidad a Tenofovir (Shirvani-Dastgerdi E et al. J Hepatol 2017;67(2):246) y ha publicado un estudio donde se analiza la conservación y variabilidad de la región de interacción del preS1 con el NTCP, el supuesto receptor y responsable de la entrada del virus y la prevalencia del polimorfismo rs2296651, por PCR a tiempo real, que afecta a las variantes del mismo (Casillas R et al, World J Gastroenterol, 2018;24(6):680).

Cabe destacar la colaboración (aunque no como miembro del equipo investigador) en los estudios fenotípicos de comprobación de la efectividad del sistema de tratamiento antiviral basado en siRNA de la Dra. Gloria González, directora del programa de terapia génica del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la universidad de Navarra, en el que se integró en el año 2001, con el objetivo de buscar nuevas terapias para la hepatitis B crónica. En los últimos años ha realizado publicaciones relevantes en este campo (Di Scala M, et al. J Virol. 2016;90(19):8563, Otano I, et al. Hepatology 2012;56(2):474), nuestro grupo ha colaborado recientemente en los estudios de quasiespecies del VHD en un modelo animal desarrollado por el grupo de la Dra. Gloria González (Suarz-Amaran L, et al. J Hepatol 2017;67(4):669).

Expediente Nº
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN MARCO ESTRATÉGICO

(Ajustese al espacio disponible)

1. Capacidad del proyecto de abordar los objetivos y prioridades enmarcadas en el reto Salud, Cambio Demográfico y Bienestar de la Estrategia Española de Ciencia y Tecnología y de Innovación.

2. Relevancia de la propuesta a la investigación clínico-traslacional.

Como se ha indicado en los párrafos anteriores la infección por VHB representa un reto de máxima prioridad en salud por su importante prevalencia y severas consecuencias. Las alternativas preventivas y terapéuticas disponibles, aun siendo de gran potencia, no parecen ser suficientes para abordar esta solución. Nuestro sistema nacional de salud dispone de estrategias y recursos tanto económicos como humanos para profundizar al máximo nivel en el conocimiento de esta infección y así colaborar de forma significativa en el camino hacia su curación y control. Nuestro grupo ha disfrutado de la financiación de varios proyectos anteriores en esta línea de estudio de la infección por el VHB (proyectos de investigación en salud PI09/0899, PI11/01973, PI12/01893, PI14/01416 y PI15/00856) que nos han permitido adquirir un conocimiento profundo de este agente y su complejidad poblacional y estamos convencidos que esta experiencia puede ser relevante para colaborar en este objetivo común de la investigación biomédica actual. No podemos olvidar que en España se ha estimado en 400.000 los portadores de esta infección (HBsAg positivo) (0,7% de la población general). Los datos obtenidos en los anteriores proyectos financiados y especialmente en el más reciente (PI015/00856), en el que se ha podido desarrollar un primer prototipo de terapia génica (siRNA) actualmente en fase de estudio fenotípico en cultivos celulares, nos permiten mantener la esperanza de que nuestra línea de trabajo cristalice en soluciones traslacionales para la infección por VHB. Por este motivo uno de los objetivos principales de este proyecto es profundizar en esta línea, analizando la conservación de la quasispecies del VHB en la región del gen X, mediante secuenciación masiva. Eso nos permitiría evidenciar otras regiones conservadas, ofreciendo nuevas posibles dianas para un enfoque terapéutico basado en el sistema de siRNA. Este sistema, pero, debe ser abordado también en base a la población de transcritos circulantes en periodos de viremia indetectable. Además, el análisis de la conservación de la quasispecies podría evidenciar nuevas posibles dianas a utilizar en terapia con siRNA. La utilidad de estas regiones como dianas de ARN interferente se testará *in vitro* en modelos de infección. Por ello creemos que este proyecto se relaciona con la línea de investigación de prevención, desarrollo nuevos fármacos y terapias innovadoras.

El proyecto que planteamos tiene interés no sólo en lo que concierne a un mejor conocimiento y tratamiento de la infección por el VHB, sino también para estudiar marcadores virológicos en pacientes con baja o ausente viremia, focalizándonos en aquellos que, a pesar del control de la replicación viral, presentan progresión de la enfermedad hasta desarrollar cirrosis y CHC. Esta situación parece paradójica si la comparamos con otras infecciones como por el VHC y más si se tiene en cuenta que los tratamientos antivirales frente al VHB no tienen una duración limitada y son muchos los pacientes con esta infección que se encuentran en la situación de ausencia de viremia detectable por efecto del tratamiento. En España hay 16.504 pacientes infectados por VHB en tratamiento antiviral y en el 80% de los casos se consigue una respuesta virológica sostenida. Esto quiere decir que más de 13.000 pacientes presentan una viremia indetectable y de estos, el 1-5% de los pacientes presentan riesgo de desarrollar CHC, pero no es posible monitorizar en analíticas rutinarias la posible situación de su patología hepática asociada a la población viral, que como se ha indicado mantiene la actividad transcripcional y la producción de antígenos virales en las células infectadas, determinando la progresión de la enfermedad. El estudio de transcritos circulantes en distintos grupos clínicos, tanto en su complejidad (las variantes virales en la región correspondiente al gen X) como los propios niveles relativos de transcritos del gen X (tanto canónico como corto) en relación a otros transcritos del VHB, nos podría permitir evidenciar marcadores predictivos de la progresión de la enfermedad hepática potencialmente útiles en el seguimiento de los pacientes infectados por el virus de la hepatitis B. Confirmar fenotípicamente estas interacciones garantizaría un mejor conocimiento del mecanismo de la evolución de la enfermedad a nivel virológico, y poder así intervenir con sistemas preventivos.

El grupo estima que el estudio generará resultados a medio plazo, para ser presentados en congresos de nivel nacional e internacional. A largo plazo, esperamos generar al menos dos o tres publicaciones en revistas del campo y de elevado factor de impacto.

Expediente Nº
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN MEDIOS DISPONIBLES

(Ajustese al espacio disponible)

Medios disponibles para la realización del proyecto.

INSTRUMENTACIÓN:

- Plataforma de secuenciación masiva MiSeq (Illumina); se dispone de 2 instrumentos
- Lumipulse G600 II (Fujirebio)
- Termocicladores para PCR: GeneAmp 9700 (Perkin Elmer), Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- Termocicladores/fluorímetros para PCR a tiempo real LightCycler 2.0 y 480 (Roche)
- Cubetas para electroforesis de ácidos nucleicos
- Fuentes electroforesis
- Transiluminador con LEDs de alta intensidad (Genetics)
- Sistema de cuantificación ácido nucleicos Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific)
- Microcentrífuga refrigerada
- Centrífuga 5430 con rotor de tubos y placas (Eppendorf)
- Cabinas Flujo laminar aptas para muestras biológicas y cultivo celular
- Fluorímetro Infinite F200Pro (Tecan) y acceso a fluorímetro Qubit (Thermo Scientific)
- Estación de pipeteo automatizado Freedom EVO75 (Tecan)
- Equipo electroforesis capilar TapeStation 2200 (Agilent)
- Congeladores de -80°C, -40°C y -20°C, neveras
- El equipo investigador tiene acceso a los analizadores automáticos COBAS 8000 (serología) y 6800 (cuantificación de ácidos nucleicos virales) (Roche) y al secuenciador automático de ácidos nucleicos (método de Sanger) ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Thermo Scientific)
- Incubadora de calor seco
- Termoshaker
- Bunsen
- Acceso a laboratorio P2plus para los experimentos de cultivo celular. Este laboratorio cuenta con: incubadora de calor húmedo, cabina de bioseguridad, centrífuga, mini-centrífuga, vórtex, Pipet-aid, microscopio, nevera, congeladores (-20°C y -80°C), baño termostatzado, microscopio
- Acceso a microscopio con fluorescencia y citómetro FACS calibur
- Células susceptibles a transfección/infección por VHB de las líneas HepG2 y HepG2-NTCP

TÉCNICAS:

- Técnicas de extracción y purificación de ácidos nucleicos
- Amplificación génica por PCR
- Electroforesis de Ácidos nucleicos
- Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría y fluorimetría
- Técnicas de secuenciación por Sanger y Sequencing by Synthesis (Illumina)
- PCR a tiempo real (cuantificación de ácidos nucleicos)
- Determinación automática de parámetros serológicos
- Automatización en la preparación de librerías de amplicones para su secuenciación por Sequencing by Synthesis (Illumina)
- Algoritmo bioinformático para el análisis de datos obtenidos de la secuenciación masiva
- Infección y/o transfección de células
- Clonación
- Mutagénesis
- Marcaje con fluorescencia de células
- Técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISA) automatizadas y manuales

Expediente Nº
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN JUSTIFICACIÓN DETALLADA DE LAS PARTIDAS PRESUPUESTARIOS SOLICITADAS

(Ajustese al espacio disponible)

Kits para extracción manual y automática de ácidos nucleicos

Extracción manual.....	1500,00
Extracción automática (tecnología de partículas magnéticas).....	5000,00

Cuantificación del HBsAg y HBcrAg

HBsAg quantitative test (Roche).....	700,00
Lumipulse® G HBcrAg.....	800,00

Primers y Polimerasas de alta fidelidad para amplificación de librerías a procesar por Secuenciación Masiva y por Secuenciación Sanger

Primers de de diferentes longitudes para creación de librerías	7000,00
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase.....	980,00
Reverse Transcriptase High Fidelity	6000,00

Kits para cuantificar ARN circulante y la proporción relativa del transcrito del X

TTH Reverse Transcriptase.....	6300,00
LightCycler® FastStart DNA Master PLUS HybProbe	11760,00
Sondas para Real Time PCR.....	10000,00
DNase.....	1000,00

Cuantificación ADN

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, v2.0 30x650	2420,00
Light Cycler DNA Master HybProbe.....	580,00

Kits para la preparación y procesado por MiSeq sequencing de librerías de amplicones

KAPA Hyper Prep (8rxn).....	3720,00
SeqCap Adapter Kit A, 96 Reactions	1300,00
SeqCap Adapter Kit B, 96 Reactions	1300,00
Placas MID	3000,00
KAPA Pure Beads (30ml).....	1000,00
Lib Quant Kit (Illumina/LC480)	2300,00
Miseq Reagent Kit v3 (600cycle).....	21000,00
TAPE STATION DNA analysis	2210,00
Placas de fluorescencia y Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit).....	1000,00
Qubit quantification kit.....	515,00

Kits secuenciación directa (método de Sanger)

Kits Big Dye 3.1 Applied Biosystems	4700,00
Big Dye Xterminator Purification Kit.....	500,00
Exosap.....	95,00

Fungible General (puntas, tubos, placas Petri y reactivos varios biología molecular)...

Cultivo celular

Placas y material para cultivo celular (cell strainers, filter, counting chamber, crio tube). 12000,00	
Reactivos medios cultivo (Tripsina, DMEM, Opti-MEM, FBS, glutamina, Glutamax)...	7000,00
Kit transfección (TransIT LT-1 y X2, siRNA transfection kit).....	2700,00
Análisis actividad celular.....	1300,00
Reactivos por clonaje (plámidos, bacterias, kit de extracción, enzimas de restricción, etc.). 1700,00	
VHB-ADN asociado a capsid	1700,00

Comité ético.....

800

Servicio de Mensajería.....

1.000

Publicaciones.....

5.000

Viajes.....

4.000

Expediente N°
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL:
Dr. Francisco Rodríguez Frías

MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN PRESUPUESTO

Presupuesto solicitado

¿Solicita Intensificación del Investigador Principal (IP)?

☐ SI ☒ NO

La solicitud de Intensificación es incompatible con la solicitud de financiación para otro tipo de personal a cargo del proyecto **Euros**

1. Gastos de Personal o Intensificado

Los costes de contratación imputables a la subvención se ajustarán a las tablas salariales dictadas al efecto.

Subtotal Gastos de Personal :

2. Gastos de Ejecución

A) Adquisición de bienes y contratación de servicios

(Bienes inventariables, material fungible y gastos complementarios)

Material Fungible general	14.000
Extracción ADN/ARN virales circulantes, creación y secuenciación directa librerías de amplicones	25.775
Estudios de las quasiespecies del ARN y ADN circulante	37.345
Cuantificación ARN-VHB y proporcion relativa de transcritos del gen X por Real-Time diferencial	29.060
Estudios fenotipicos in vitro	26.400
Cuantificación de marcadores virológicos (HBcrAg, HBsAg, HBV DNA)	4.500
Servicio de mensajería	1.000
Edición de manuscritos y tasas publicación en revistas de acceso abierto	5.000
Evaluación del proyecto por comité ético	800
Subtotal Gastos Bienes y Servicios :	143.880

B) Gastos de Viajes

Gastos de viajes para la presentación de resultados en congresos	4.000
Subtotal Gastos Viajes :	4.000

Subtotal Gastos Ejecución : 147.880

Total Solicitado : 147.880

Total + 21% Costes Indirectos : 178.934,8

**Expediente N°
PI18/01436**

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

**MEMORIA DE SOLICITUD PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
SECCIÓN ANEXOS**

INTRODUZCA TEXTO COMO ANEXO

Máximo 3 páginas (15.700 caracteres)

Expediente Nº
PI18/01436

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: Dr. Francisco Rodríguez Frías

INTRODUZCA UNA IMAGEN COMO ANEXO

Máximo un fichero de imagen formato jpg



Pamplona, 26 Febrero 2018

Al comité de evaluación de los proyectos en salud del ISCIII,

Con el presente documento confirmo mi apoyo al proyecto presentado por el Dr Francisco Rodríguez Frías titulado "Estudio de la quasispecies del gen X en ARN circulante del virus de la hepatitis B (ARN-VHB): en búsqueda de nuevos factores pronósticos y dianas para terapia génica" que se presenta en la convocatoria 2018 de ayudas de proyectos de investigación en salud del Instituto de Salud Carlos III y mi participación como colaborador externo en el proyecto. Nuestro laboratorio cuenta con modelos de infección y replicación del HBV en cultivo celular y con modelos de ratón de replicación de HBV. Estos modelos permiten el análisis de nuevos tratamientos antivirales desde el cultivo celular al ratón y los ponemos a disposición del grupo del Dr Francisco Rodríguez Frías así como nuestra experiencia en su manejo y análisis.

Aténtamente,

Dra. Gloria González-Aseguinolaza, PhD
Área de Terapia Génica y Regulación de la expresión génica
Centro de Investigación Médica Aplicada
Avda. Pío XII, 55
CP31008 Pamplona (Navarra)
Tel: 948-194700
Fax: 948-194714
E-mail: ggasegui@unav.es

