

Anexo II TITULACIÓN: Grado en Biología MEMORIA INICIAL DEL TRABAJO FIN DE GRADO CENTRO: Facultad de Ciencias Experimentales CURSO ACADÉMICO: 2013-14		 UNIVERSIDAD DE JAÉN <i>Facultad de Ciencias Experimentales</i>
Farmacogenética del tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C		
1. DATOS BÁSICOS DE LA ASIGNATURA		
NOMBRE: Trabajo Fin de Grado		
CÓDIGO: 10216001		CARÁCTER: Obligatorio
Créditos ECTS: 12	CURSO: Cuarto	CUATRIMESTRE: Segundo
2. TUTOR/COTUTOR(en su caso) Antonio José Caruz Arcos		
3. VARIANTE Y TIPO DE TRABAJO FIN DE GRADO (Artículo 8 del Reglamento de los Trabajos Fin de Grado) Experimental		
4. COMPETENCIAS (*) Y RESULTADOS DE APRENDIZAJE		
Competencias generales: CG1, CG2, CG4, CG5, CG6, CG7, CG8, CG9, CG11, CG12 Competencias transversales: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6, CT7, CT8, CT9, CT10 Competencias Específicas: CE4, CE6, CE9, CE36, CE37, CE39, CE40, CE41		
Resultados de aprendizaje		
Resultado 216001A	Capacidad de integrar creativamente sus conocimientos para resolver un problema biológico real.	
Resultado 216001B	Capacidad para estructurar una defensa sólida de los puntos de vista personales apoyándose en conocimientos científicos bien fundados.	
Resultado 216001C	Destreza en la elaboración de informes científicos complejos, bien estructurados y bien redactados.	
Resultado 216001D	Destreza en la presentación oral de un trabajo, utilizando los medios audiovisuales más habituales.	
Resultado 216001E	Capacidad para realizar tareas especializadas en biología molecular y celular	
5. ANTECEDENTES		
La IL28B, o interferón $\lambda 3$ es un interferón tipo III que podría tener actividad antivírica frente a VHC, incrementando el efecto del interferón alfa sobre la vía de señalización JAK/STAT (1). En los últimos meses, varios estudios de asociación genómica amplia han demostrado que polimorfismos de nucleótido único (SNP) situados en el cromosoma 19, en las proximidades del gen de la IL28B, se asocian estrechamente con la eliminación espontánea (2,3) e inducida por el		

tratamiento con interferón alfa y ribavirina del VHC (4-7). Entre ellos, el SNP rs12979860, que tiene un fuerte desequilibrio de ligamiento con una variante no sinónima en el gen de la IL28B (213A>G, K70R; rs81031142) (4), ha sido el mejor estudiado (2,4,7). El alelo C de este SNP, que tiene comportamiento recesivo, se ha asociado a eliminación espontánea del VHC (2) y a respuesta viral sostenida (RVS) tras tratamiento con interferón pegilado (Peg-IFN) y ribavirina (RBV) en enfermos monoinfectados por VHC (4,7), fundamentalmente en los portadores de VHC genotipo 1. En general, el impacto de las variaciones en el gen de la IL28B sobre la respuesta a la terapia en pacientes con genotipo 3 parece sustancialmente menor (3,8,9). El fenotipo molecular de los alelos de protección de IL28B no es conocido, aunque datos fragmentarios parecen indicar que pudiera estar asociado a una mayor expresión del ARNm (6).

La hepatitis crónica C tiene características peculiares en el paciente coinfectado por VIH. Así, su curso se encuentra acelerado, por lo que representa una de las causas más importantes de morbilidad en ese colectivo. Sin embargo, desgraciadamente, la tasa de respuesta a tratamiento es más baja que en el enfermo monoinfectado por VHC, oscilando entre el 45% y el 50% la proporción de pacientes en los que se logra la erradicación viral. En el enfermo coinfectado por VIH y VHC es conocido que el genotipo de IL28B se asocia con la eliminación espontánea del VHC (3). Respecto a la eliminación inducida por tratamiento, en el momento de redactarse esta memoria no existe ningún trabajo publicado al respecto. No obstante, en un reciente congreso se han comunicado tres estudios, uno de ellos del equipo solicitante de esta ayuda, con resultados que apuntan en el mismo sentido, en los que se demostraba que el genotipo CC del SNP rs12979860 se asocia con RVS al tratamiento Peg-IFN y RBV (8-10). Estos trabajos han dejado abiertas una serie de cuestiones, entre las que cabe destacar las tres siguientes:

1) El valor que puede tener la determinación del genotipo de IL28B en la predicción de la respuesta al tratamiento de la hepatitis C del paciente coinfectado en clínica diaria. En la actualidad se conocen una serie de parámetros previos al tratamiento (genotipo y carga viral, fibrosis hepática, edad, etc) que predicen esta respuesta, pero incluso usándolos conjuntamente, el número de pacientes que no se clasificarían correctamente es alto, lo que hace que haya que plantearse el tratamiento en la mayoría de los enfermos en que no hay contraindicaciones. Los cambios en la cinética vírica tras tratamiento son muy útiles para predecir la respuesta. De hecho, la falta de caída de, al menos, 2 unidades logarítmicas de la carga viral a la semana 12 se usa rutinariamente como parámetro para interrumpir la terapia (11). No obstante, esta regla obliga a administrar tratamiento durante un periodo en el que la frecuencia de efectos adversos es máxima. La determinación de la carga viral de VHC en plasma tiene un alto valor predictivo positivo (11,12) y negativo (12) para RVS, pero deja sin clasificar a un porcentaje notable de pacientes (12), que deberían seguir tratamiento, al menos hasta la semana 12. Finalmente, se ha descrito recientemente que la caída de la carga viral en periodos más cortos de tiempo, incluso en las primeras 24 horas (13) podrían ser útiles para predecir la respuesta al tratamiento con Peg-IFN y RBV en pacientes coinfectados por VIH y VHC. Por todos ello, es necesario valorar si incluyendo el genotipo de IL28B es posible crear mejores modelos predictivos de respuesta al tratamiento de la hepatitis C que los que se podían elaborar hasta ahora, si es posible usando sólo parámetros pretratamiento, pues ello evitaría el inicio de tratamiento en enfermos con baja probabilidad de respuesta, y, si no lo fuera, intentar conseguirlos combinando variables pretratamiento, entre ellas el genotipo de IL28B, con la cinética vírica en las dos primeras semanas de tratamiento.

2) La relación entre el genotipo de IL28B y el genotipo vírico. Tanto en pacientes monoinfectados por VHC (7), como en coinfectados (8), los portadores del genotipo rs12979860 CC están infectados más frecuentemente por VHC genotipo 3, que los individuos con rs2979860 TC o TT. Si ello se debe a que el genotipo CC tiene mayor impacto sobre la tasa de eliminación espontánea de los genotipos 1 y 4 que sobre la del genotipo 3, como sucede sobre la eliminación inducida por tratamiento, o por el contrario, es que el genotipo CC confiere mayor protección para

ser infectado por VHC genotipos 1 o 4 que por genotipo 3, no es conocido. El estudio de la distribución de genotipos víricos, con arreglo a al genotipo de IL28B, en pacientes con hepatitis aguda y crónica, podría aclarar este tema, pues si es similar, significaría que la protección del genotipo de IL28B se ejercería sobre la infección por genotipo 1 o 4, en tanto que, si es distinta y, en los pacientes con hepatitis aguda, la distribución de genotipos víricos es similar en los portadores de rs12979860 CC y los enfermos con genotipo TT o TC, implicaría que el efecto beneficioso se ejerce sobre la eliminación espontánea del VHC en la fase de infección aguda. Este tema es muy importante para conocer cuál es el mecanismo de acción del genotipo de IL28B y puede ser útil en el futuro para diseñar estrategias tendentes a evitar la infección o la evolución a la cronicidad de la hepatitis C.

3) La relación entre el genotipo de IL28B y el sistema LDL plasmático/LDL receptor (LDLR). El LDLR es una de las vías que usa el VHC para entrar en el hepatocito. Debido a ello, niveles altos de LDL en plasma podrían bloquear competitivamente el LDLR, dificultando el ciclo replicativo del VHC. Esta, al menos, es la hipótesis que se ha sugerido para explicar la relación entre niveles altos de LDL en plasma y mayor frecuencia de RVS, que se ha observado de forma constante en estudios llevados a cabo en pacientes mono infectados y coinfectados por VHC (14). Esta hipótesis es muy verosímil ya que en modelos in vitro, la unión del VHC a la célula así como su endocitosis pueden ser inhibidas por LDL libre, péptidos recombinantes solubles de LDLR así como mediante anticuerpos anti-LDLR (17). También ha sido descrito que los niveles de carga viral están correlacionados con los niveles de expresión de LDLR en la membrana de los hepatocitos tanto in vitro como in vivo (18) y la expresión de la proteasa PCSK9 (asociada a la degradación fisiológica de LDLR) tiene un efecto protector frente a la infección por VHC in vitro (19). Por último, la relación LDL y respuesta a la terapia de la infección por VHC también se ha visto corroborada por datos de epidemiología genética en la que alelos de LDLR asociados a hipercolesterolemia están asociados a mejor respuesta al tratamiento con peg-INF+RBV (20). Dos estudios han demostrado que existe una estrecha asociación entre el genotipo de IL28B y los niveles plasmáticos de LDL colesterol, de modo que los enfermos con rs12979860 CC tienen niveles de LDL colesterol significativamente más altos (8,15). Esto podría deberse a una represión de la expresión de LDLR mediada por el genotipo CC de IL28B y a un aumento concomitante del LDL plasmático. Existen estrechas relaciones entre la actividad de los interferones y el metabolismo de los lípidos. De hecho, la administración de interferones exógenos altera los niveles de colesterol LDL (15) e induce ciertas isoformas solubles del LDLR, que tienen actividad antivírica (16).

Se desconoce la interacción entre el interferón λ y el metabolismo lipídico, pero estas estrechas relaciones hace pensar a algunos autores que la asociación entre colesterol LDL y la respuesta al tratamiento de la hepatitis C podría no ser más que un epifenómeno del efecto de la IL28B (16). En cualquier caso, es necesario aclarar cuál es la relación entre genotipo de IL28B y el sistema LDL plasmático LDL, así como explicar cuál es el mecanismo que se produce, pues la manipulación mediante fármacos del sistema LDL/LDLR podría llegar a ser útil en el manejo de la hepatitis C. La regulación de la expresión de LDLR en linfocitos y hepatocitos es muy similar. De hecho se cuantifica la expresión y capacidad funcional de LDLR en pacientes hipercolesterolémicos usando cultivos celulares de linfocitos de sangre periférica. Consideramos que este modelo biológico es muy pertinente para los objetivos propuestos pues simplifica el acceso a material biológico, al poder usarse células de donantes de sangre previamente disponibles, y permitiría determinar el efecto funcional de variantes genéticas de IL28B sobre la ruta LDL-LDLR.

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La actividad antiviral del peg-INF+RBV mediada por el genotipo protector de IL28B podría estar relacionada con una acción directa sobre el eje LDL-LDLR, reduciendo la expresión o la capacidad funcional del LDLR, correceptor del VHC. En este sentido, variantes genéticas de la

ruta LDL-LDLR, que redujeran la expresión o capacidad funcional del LDLR, podrían estar asociadas a un mejor pronóstico de la infección por VHC y una mejor respuesta al tratamiento, actuando sinérgicamente con las variantes alélicas protectoras de IL28B.

7. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES A REALIZAR

Metodología para determinar el efecto funcional sobre la vía LDLR de variantes de IL28B asociadas a respuesta al tratamiento con peg-INF+RBV:

Modelo in vitro con donantes sanos:

Los experimentos se realizarán sólo con hombres para reducir la varianza inmunológica mediada por estrógenos y con un número mínimo de 30 individuos por genotipo de IL28B. Brevemente el protocolo a seguir es:

Fase 1: Células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos se aislarán mediante gradiente de ficoll a partir de sangre anticoagulada con EDTA y se pondrán en cultivo con un suero especial tratado con carbón activo durante 24 horas. Durante este tiempo a partir de una alícuota se realizará una extracción de ADN genómico y mediante la tecnología TAQMAN se determinará el genotipo para el polimorfismo de la IL28 rs12979860 asociado con respuesta al tratamiento con interferón. Individuos con los genotipos homocigotos de alta respuesta (CC o baja respuesta (TT) serán seleccionados para la siguiente fase.

Fase 2: Los cultivos con los genotipos seleccionados se tratarán con anti-CD3+CD28 en bolas (Dyna) 72 horas, a continuación se estimularán con interferón alfa (1000 IU/ml) durante 4 horas (máxima inducción de los genes regulados por INF- α , Lanford RE et al. Hepatology, 2006).

Fase 3: Cuantificación de la actividad LDLR. Los linfocitos cultivados se incuban durante dos horas con Dil-LDL (LDL fluorescente de Molecular Probes) y posteriormente se determina su incorporación mediante citometría de flujo. En paralelo se marcan las células con anti-CD3 para gatear exclusivamente los linfocitos T (protocolo detallado en Tada H, et al. Clinica Chimica Acta).

Fase 4: Expresión de LDLR en membrana mediante citometría de flujo, con co-marcaje con anti-CD3.

Fase 5: Extracción de ARN total celular mediante Tripure (Roche) y retrotranscripción a ADNc. Cuantificación de la expresión de los ARNm de IL28B, LDLR y PCKS9 mediante PCR en tiempo real cuantitativa normalizada con actina beta, a partir del ADNc retrotranscrito. Para ello se utilizarán sondas TAQMAN de Applied Biosystems. Como control de la actividad del interferón se utilizará el gen CXCL10 que en PBMC se activa más de 30 veces en respuesta al interferon alfa (Lanford RE et al. Hepatology 2006).

Fase 6: Aislamiento del sobrenadante total de los cultivos y cuantificación mediante ELISA de LDLR soluble.

Fase 7: Análisis estadístico de los datos de función y expresión de ARNm y proteínas en función del genotipo para IL28B (paired t-test).

8. DOCUMENTACIÓN/BIBLIOGRAFÍA

1. O'Brien TR. Interferon-alfa, interferon λ and hepatitis C. Nat Genet 2009; 10: 1048-1050.
2. Thomas DL, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. Nature 2009; 461: 798-801.
3. Rauch A, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure - A genome-wide association study. Gastroenterology 2010; Jan 7. [Epub ahead of print].
4. Ge D, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. Nature 2009; 461: 399-401.
5. Suppiah V, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. Nat Genet 2009; 41: 1100-1104.
6. Tanaka Y, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat Genet 2009; 41: 1105-1109.
7. McCarthy JJ, et al. Replicated Association between an IL28B Gene Variant and a Sustained Response to Pegylated Interferon and Ribavirin. Gastroenterology 2010; Feb

- 19.
8. Pineda JA, et al. Interleukin 28 B Genotype Is a Potent Predictor of Response to Therapy with Pegylated Interferon plus Ribavirin in HIV/HCV-Co-infected Patients. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco (EEUU), Febrero 2010. Abst N°: 656.
 9. Rallon N, et al. Strong Association of a Single Nucleotide Polymorphism Located Near the Interleukin-28b Gene with Response to Hepatitis C Therapy in HIV/HCV Co-infected Patients. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco (EEUU), 16-19 Febrero 2010. Abstract número: 165LB.
 10. Nattermann J, et al. Genetic Variation in IL28B and Treatment-induced Clearance of Hepatitis C Virus in HCV/HIV Co-infected Patients. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco (EEUU), 16-19 Febrero 2010. Abstract número: 164.
 11. Soriano V, et al. Care of patients coinfecting with VIH and hepatitis C virus: 2007 updated recommendations from the HCV-HIV International Panel. AIDS 2007; 21: 1073-1089.
 12. Mira JA, et al. Rapid virological response at week 4 predicts response to pegylated interferon plus ribavirin among HIV/HCV-coinfecting patients. Antivir Ther 2007; 12: 523-529.
 13. Laufer N, et al. Early Changes in HCV Viral Load During the First 24 Hours of Treatment Exhibit a Very High Negative Predictive Value of Sustained Virological Response in HCV/HIV coinfecting Patients. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2009). San Francisco (EEUU), 12-15 Septiembre 2009. Abstract H-213.
 14. del Valle J, et al. Baseline serum LDL cholesterol levels predict sustained virologic response to peg-INF+RBV in HIV/HCVvirus-coinfecting patients. AIDS 2008; 22: 923-930.
 15. Li JH, et al. Interferon-lambda genotype and low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with chronic hepatitis C infection. Hepatology 2010; Epub ahead to print.
 16. Fischer DG, Tal N, Novick D, Barak S, Rubinstein M. An antiviral soluble form of the LDL receptor induced by interferon. Science 1993;262:250-253.
 17. Molina S. et al. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by HCV. J. Hepatology 2007; 46: 411-419.
 18. Petit JM, et al. Cell surface expression of LDL receptor in chronic hepatitis C: correlation with viral load. Am J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2007; 293:416-420.
 19. Labonte P, et al. PCSK9 impedes HCV infection in vitro and modulates liver CD81 expression. Hepatology 2009; 50: 17-24.
 20. Hennig BJW, et al. Association of LDLR polymorphism and outcome of HCV infection. Genes and Immunity 2002; 3: 359-367.

9. CRONOGRAMA PROVISIONAL

En función de la disponibilidad del alumno y del laboratorio, este trabajo será realizado en horario de mañana o tarde.

El cronograma semanal provisional puede establecerse de la siguiente forma:

Semanas I -III: Confirmación de estudios de asociación genética y epistasia entre LDLR e IL28B. Extracción de ARNm de cultivos estimulados con interferon.

Semanas IV - XII: Cuantificación de la expresión del ARNm de LDLR en función del genotipo para IL28B y para los haplotipos de LDLR. Medida de la proteína por citometría de flujo en cultivos celulares.

Semana XIII-XIV: Análisis de los resultados. Elaboración de las conclusiones. Redacción final, corrección, impresión y presentación del trabajo.