**1 Información General:**

1.1 Identificación del estudio

**Título**: ESTUDIO FOREVER (FORo para Encontrar la Verdadera causa de la Enfermedad Renal).

**Versión y fecha**: Versión 1 23/03/2023

1.2 Identificación de promotor:

**Nombre del promotor**: SOCIEDAD MADRLIEÑA DE NEFROLOGÍA.

1.3 Identificación de investigadores principales de los centros participantes:

**María Marques**, Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (mmvidas@gmail.com)

**Judith Martins –**Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de **Getafe** (judithmartins1@gmail.com)

**Alberto Ortiz Arduan**, jefe de Servicio de Nefrología e Hipertensión del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz de Madrid (aortiz@fjd.es).

**Maria Vanessa Pérez Gomez**, Servicio de Nefrología e Hipertensión del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz de Madrid (mvanessa@fjd.es

Como investigadores representantes de los centros del grupo quironsalud actuaran:

* Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Maria Vanessa Pérez Gómez mvanessa@fjd.es y Elena Goma Garces elena.goma@quironsalud.es
* Hospital General de Villalba: Beatriz Maria Dura Gurpide beatriz.durag@quironsalud.es
* Hospital Rey Juan Carlos: María López Picaso maria.lopez@hospitalreyjuancarlos.es
* Hospital Infanta Elena: Raquel Esteras Rubio raquel.esteras@quironsalud.es

**Eduardo Gutiérrez**, Servicio de Nefrología del Hospital Universitario 12 de Octubre (eduardogutmat90@gmail.com)

**2 Justificación:**

**Enfermedad renal avanzada de etiología desconocida: carga de mortalidad, morbilidad y discapacidad.**

La enfermedad renal crónica (ERC) afecta a un porcentaje cada vez mayor de la población mundial, mermando la calidad de vida y teniendo además un impacto socioeconómico muy importante. A pesar de los avances recientes en el diagnóstico histológico y el desarrollo de biomarcadores, un porcentaje significativo de pacientes sin diagnóstico aún alcanzan el estadio G5 de ERC (tasa de filtración glomerular estimada inferior a 15 ml/min). Los datos del registro europeo de la *European Renal Association* (ERA) indican que este porcentaje llega al 27% entre los pacientes que están en tratamiento renal sustitutivo (TRS). También hay que destacar que junto a un alto porcentaje de pacientes que están en TRS sin diagnóstico etiológico, algunos de los pacientes diagnosticados de nefropatía diabética, glomerulopatía inespecífica o nefropatía hipertensiva presentan posteriormente un diagnóstico erróneo.

**Alcance del proyecto**

Actualmente, en nuestro medio (España), la segunda causa de ERC en pacientes que reciben TRS (64.666 pacientes prevalentes en 2020) es la “etiología desconocida”. La filiación exacta de la causa puede representar un gran avance en su manejo personalizado, ya que determinadas patologías pueden tener un tratamiento específico, los pacientes pueden participar en ensayos clínicos, se puede estudiar la afectación de otros órganos o sistemas en casos sindrómicos, así como la recurrencia de la enfermedad después del trasplante renal.

Por ello, realizar un estudio genético completo (análisis de exoma por secuenciación de nueva generación; evaluación de deleciones; detección de polimorfismos de riesgo; variaciones en el número de copias [CNVs], etc.) en pacientes jóvenes con ERC de etiología desconocida puede representar un gran avance en la fisiopatología conocimiento de las enfermedades renales hereditarias en nuestro medio, así como ofrecer un manejo individualizado del paciente.

**Resumen**

Lograr un diagnóstico preciso es un objetivo fundamental de la práctica médica. Las pruebas genéticas se han convertido en una poderosa herramienta de diagnóstico en nefrología. La evidencia de que al menos el 15% de los pacientes adultos y la mayoría de los niños con ERC padecen una enfermedad renal hereditaria junto con la accesibilidad de nuevas herramientas genéticas de diagnóstico debería permitir diagnosticar un alto porcentaje de pacientes no diagnosticados y así asistir a una medicina personal con claras repercusiones para el pronóstico, manejo y tratamiento.

2.1 Bibliografía relevante:

1. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. Lancet 2013; 382: 260–272

2. ERA-EDTA Registry. ERA-EDTA Registry Annual Report 2018.https://www.era-edta.org/registry/AnnRep2018.pdf (8

 December 2020, date last accessed)

3. Kramer A, Boenink R, Stel VS et al. The ERA-EDTA registryannual report 2018: a summary. Clin Kidney J 2021; 14: 107–123

4. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S et al. Diagnostic utility of exome sequencing for kidney disease. N Engl J Med 2019; 380: 142–151

5. United States Renal Data System. USRDS 2019 Annual Data Report. Incidence. <https://www.usrds.org/annual-data-re> port/ (8 December 2020, date last accessed)

6. Carriazo S, Vanessa Perez-Gomez M, Ortiz A. Hypertensive nephropathy: a major roadblock hindering the advance of precisión nephrology. Clin Kidney J 2020; 13: 504–509

7. Devuyst O, Knoers NVAM, Remuzzi G et al. Rare inherited kidney diseases: challenges, opportunities, and perspectives.Lancet 2014; 383: 1844–1859

8. Wu¨ hl E, Van Stralen KJ, Wanner C et al. Renal replacement therapy for rare diseases affecting the kidney: an analysis of

the ERA-EDTA Registry. Nephrol Dial Transplant 2014; 29(Suppl 4): iv1–8

9. Vivante A, Hildebrandt F. Exploring the genetic basis of early-onset chronic kidney disease. Nat Rev Nephrol 2016; 12: 133–146

10. Ingelfinger JR, Kalantar-Zadeh K, Schaefer F et al. World Kidney Day 2016: averting the legacy of kidney disease—focuson childhood. Pediatr Nephrol 2016; 31: 343–348

11. Connaughton DM, Bukhari S, Conlon P et al. The Irish Kidney Gene Project – prevalence of family history in patients withkidney disease in Ireland. Nephron 2015; 130: 293–301

12. Cocchi E, Nestor JG, Gharavi AG. Clinical genetic screening in adult patients with kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol

2020; 15: 1497–1510

13. Doreille A, Raymond L, Lebre A-S et al. Nephronophthisis in young adults phenocopying thrombotic microangiopathyand severe nephrosclerosis. Clin J Am Soc Nephrol 2020; doi:10.2215/CJN.11890720

14. Kottgen A, Pattaro C. The CKDGen consortium: ten years ofinsights into the genetic basis of kidney function. Kidney Int

2020; 97: 236–242

15. Wuttke M, Li Y, Li M et al. A catalog of genetic loci associatedwith kidney function from analyses of a million individuals.Nat Genet 2019; 51: 957–972

16. Arpega° rd J, Viktorin A, Chang Z et al. Comparison of heritabilityof cystatin C- and creatinine-based estimates of kidneyfunction and their relation to heritability of cardiovasculardisease. J Am Heart Assoc 2015; 4: e001467

17. Fox CS, Yang Q, Cupples LA et al. Genomewide linkage analysisto serum creatinine, GFR, and creatinine clearance in acommunity-based population: the Framingham HeartStudy. J Am Soc Nephrol 2004; 15: 2457–2461

18. Ko¨ ttgen A, Pattaro C, Bo¨ ger CA et al. New loci associated withkidney function and chronic kidney disease. Nat Genet 2010;42: 376–384

19. Tin A, Ko¨ ttgen A. Genome-wide association studies of CKDand related traits. Clin J Am Soc Nephrol 2020; 15: 1643–1656

20. Teumer A, Li Y, Ghasemi S et al. Genome-wide associationmeta-analyses and fine-mapping elucidate pathwaysinfluencing albuminuria. Nat Commun2019; 10: 4130

21. Gorski M, Jung B, Li Y et al. Meta-analysis uncovers genomewidesignificant variants for rapid kidney function decline.Kidney Int 2021; 99: 926–939

22. Kanji Z, Powe CE, Wenger JB et al. Genetic variation in APOL1associates with younger age at hemodialysis initiation. J AmSoc Nephrol 2011; 22: 2091–2097

23. Sanchez-Rodriguez E, Southard CT, Kiryluk K. GWAS-baseddiscoveries in IgA nephropathy, membranous nephropathy,and steroid sensitive nephrotic syndrome. Clin J Am SocNephrol 2020; 16: 458–466

24. Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B et al. The utility of thetraditional medical genetics diagnostic evaluation in thecontext of next-generation sequencing for undiagnosed geneticdisorders. Genet Med 2014; 16: 176–182

25. Sun Y, Ruivenkamp CAL, Hoffer MJV et al. Next-generationdiagnostics: gene panel, exome, or whole genome? HumMutat2015; 36: 648–655

26. Groopman EE, Rasouly HM, Gharavi AG. Genomic medicinefor kidney disease. Nat Rev Nephrol 2018; 14: 83–104

27. Strande NT, Riggs ER, Buchanan AH et al. Evaluating the clinicalvalidity of gene-disease associations: an evidence-basedframework developed by the clinical genome resource. Am JHum Genet 2017; 100: 895–906

28. Richards S, Aziz N, Bale S et al. Standards and guidelines forthe interpretation of sequence variants: a joint consensusrecommendation of the American College of MedicalGenetics and Genomics and the Association for MolecularPathology. Genet Med 2015; 17: 405–424

29. Sboner A, Mu XJ, Greenbaum D et al. The real cost of sequencing:higher than you think! Genome Biol 2011; 12: 125

30. Kirby A, Gnirke A, Jaffe DB et al. Mutations causing medullarycystic kidney disease type 1 lie in a large VNTR in MUC1missed by massively parallel sequencing. Nat Genet 2013; 45:299–303

31. Ayasreh N, Bullich G, Miquel R et al. Autosomal dominanttubulointerstitial kidney disease: clinical presentation ofpatients with ADTKD-UMOD and ADTKD-MUC1. Am J KidneyDis 2018; 72: 411–418

32. Ekici AB, Hackenbeck T, Morinie`re V et al. Renal fibrosis isthe common feature of autosomal dominant tubulointerstitialkidney diseases caused by mutations in mucin 1 or uromodulin.KidneyInt2014; 86: 589–599

**3 Hipótesis del estudio:**

La **hipótesis principal** de este proyecto es que un alto porcentaje de pacientes con enfermedad renal crónica sin una causa clara, tienen una enfermedad renal hereditaria. Por tanto, la aplicación de un estudio genético con técnicas de última generación permitiría identificar la causa exacta en un 15-30% de estos pacientes, confiriendo un diagnóstico de certeza con importantes implicaciones pronósticas y manejo individualizado.

Nuestro objetivo es realizar una evaluación genética completa en pacientes con enfermedad renal crónica de origen desconocido y evaluar su correlación con la información clínica e histológica y también con la historia familiar y la evolución.

**4 Objetivo y Finalidad del Estudio:**

El objetivo principal de esta propuesta es realizar un estudio genético completo de pacientes -de nuestro medio- con enfermedad renal crónica sin causa clara, con el fin de aumentar el número de pacientes con diagnóstico etiológico y por tanto, un mayor conocimiento. de su pronóstico personal y familiar, además de ofrecer un manejo individualizado.

**Objetivos específicos:**

1. Analizar mediante tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) la presencia de variantes patogénicas aplicando un panel de 529 genes responsables de enfermedades renales hereditarias.

2. Aplicar diferentes tecnologías que permitan el diagnóstico de enfermedades hereditarias con cambios en regiones intrónicas, especialmente en presentaciones clínicas que así lo sugieran (Ejemplo: MUC1).

3. Confirmación de variantes mediante técnicas como Sanger, MLPA o qPCR.

4. Correlacionar las variantes patogénicas identificadas con la historia familiar y personal (inicio de la enfermedad, presentación clínica, datos histológicos, evolución, etc).

5. Identificar las principales enfermedades hereditarias no diagnosticadas previamente en nuestro medio y analizar posibles asociaciones con los diferentes territorios.

4.1 Variables: Los datos se obtendrán de la historia clínica, la exploración física y la historia clínica. Luego, toda la información será revisada e introducida en una base de datos utilizando Microsoft Excel 365. Esta base de datos cumplirá con los estándares requeridos para una buena práctica clínica, con acceso restringido a los miembros del equipo de investigación del proyecto. Se recogerán variables clínicas, analíticas e histológicas tanto en la población de estudio como en sus familiares cuando se aplique:

• **Variables clínicas, analíticas e histológicas:** (1) En el momento de la inclusión en el estudio en todos los pacientes: datos demográficos e historial médico relacionado con la enfermedad renal incluyendo: edad (fecha de nacimiento), sexo, raza, hipertensión, diabetes, obesidad, otras enfermedades concomitantes, medicamentos, inicio de la enfermedad (edad), FGe al diagnóstico, evolución de FGe, proteinuria, albuminuria, sedimento urinario, ecografía renal, biopsia renal (si está disponible), afectación sistémica. (2) En pacientes con antecedentes familiares de enfermedad renal: se realizará un árbol genealógico completo de toda la familia, así como los datos relevantes de la presentación clínica y evolución de la enfermedad renal.

**5 Diseño del Estudio**

**Diseño del estudio**: Estudio de cohortes multicéntrico para evaluar la utilidad diagnóstica de la secuenciación del exoma en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) de causa no identificada en Madrid.

La **población de estudio** serán los pacientes diagnosticados de ERC antes de los 45 años. Se incluirán pacientes con una tasa de filtración glomerular estimada (FGe) inferior a 60 ml/min y/o albuminuria > 30 mg/g y/o otra evidencia diagnóstica de ERC según criterios KDIGO (alteración de imagen renal, de histología renal, del sedimento urinario o alteración analítica que sugiera tubulopatía). Se estima incluir un máximo de 58 pacientes en un periodo de 12 meses. La inclusión inicial correrá a cargo de los 4 centros que se presentan como investigadores principales, no obstante, a medida que se recauden fondos para el estudio, se adecuarán nuevos centros de la SOMANE para su participación (hasta la fecha han manifestado su intención de participar todos los centros madrileños).

**INTERVENCIÓN:** Después de la firma del consentimiento informado, todos los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión serán incluidos en el estudio. En ese momento se recogerán datos demográficos, clínicos e histológicos. Sobre la población de estudio se realizarán los procedimientos habituales desarrollados en la práctica clínica.

Las muestras de sangre periférica (3-5 mL de plasma EDTA) se recogerán aprovechando las punciones analíticas definidas por el seguimiento clínico periódico de los pacientes, evitando así la realización de procedimientos innecesarios.

Las muestras serán recogidas, procesadas y almacenadas (-20ºC) en los hospitales de referencia. Posteriormente serán trasladados a las dependencias del laboratorio encargado de procesarlas, donde se realizarán los trámites posteriores:

**METODOLOGÍA:**

***Next Generation Sequencing (NGS):***Las muestras de los pacientes (sangre) se someterán a purificación de ADN genómico automatizada (QIAsymphony SP®, Qiagen). La preparación de bibliotecas se llevó a cabo con el kit de preparación de bibliotecas Agilent SureSelect para la secuenciación multiplexada de extremo emparejado de Illumina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El enriquecimiento de las regiones de interés se realizó utilizando un kit de sonda SureSelect (Agilent) que captura selectivamente las regiones codificantes y las áreas intrónicas adyacentes de los genes seleccionados. Después de la generación de grupos, el ADN capturado se secuencio en la plataforma Illumina. El protocolo de laboratorio puede sufrir modificaciones con el fin de optimizar el procedimiento.

Los datos de secuenciación se analizan mediante una canalización de bioinformática patentada que incluye tanto la demultiplexación de muestras (con el software Illumina) como todos los pasos necesarios para obtener un informe de variante anotado, junto con los parámetros de cobertura y calidad correspondientes. La canalización sigue esta secuencia lógica: alineación; refinamiento y ajuste de la alineación; llamada variante; normalización de variantes y puntuación de calidad; generación de estadísticas de cobertura por región de interés; Detección de CNV utilizando un método estadístico desarrollado internamente basado en la profundidad de cobertura.

El diseño de la biblioteca de captura personalizada incluye los siguientes 529 genes relacionados con el panel global de nefropatías:

*ACE, ACTB, ACTG1, ACTN4, ADAMTS13, ADAMTS9, ADCY10, AGT, AGTR1, AGXT, AHI1, ALG1, ALG8, ALG9, ALMS1, ALPL, AMER1, ANKFY1, ANKS6, ANLN, ANOS1, AP2S1, APOA1, APOA4, APOE, APOL1, APRT, AQP2, ARHGAP24, ARHGDIA, ARL13B, ARL3, ARL6, ARMC9, ATN1, ATP6V0A4, ATP6V1B1, ATP6V1C2, AVIL, AVP, AVPR2, B2M, B3GLCT, B9D1, B9D2, BBIP1, BBS1, BBS10, BBS12, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BICC1, BMP2, BMP4, BMPER, BNC2, BSCL2, BSND, C1QA, C1QB, C1QC, C3, C4A, C4B, C5orf42, C8orf37, CA1, CA2, CASP10, CASR, CC2D2A, CCBE1, CCDC28B, CCL2, CCNQ, CD151, CD2AP, CD46, CD81, CD96, CDC42, CDC5L, CDC73, CDK10, CDK20, CDKN1C, CENPF, CEP104, CEP120, CEP164, CEP290, CEP41, CEP55, CEP83, CFB, CFH, CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4, CFHR5, CFI, CFP, CHD1L, CHD7, CHRM3, CISD2, CIT, CLCN5, CLCN7, CLCNKA, CLCNKB, CLDN10, CLDN16, CLDN19, CNNM2, COL4A1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, COPA, COQ2, COQ4, COQ6, COQ7, COQ8A, COQ8B, COQ9, CPT1A, CRB2, CRKL, CSPP1, CTH, CTLA4, CTNS, CTU2, CUBN, CUL3, CYP24A1, DACH1, DACT1, DCDC2, DCHS1, DDX59, DGKE, DHCR7, DLC1, DMP1, DNAJB11, DNASE1, DSTYK, DVL1, DVL3, DYNC2H1, DYNC2LI1, DZIP1L, EGF, EHHADH, EMP2, ENPP1, EP300, ESCO2, ETFA, ETFB, ETFDH, ETV4, EXOC8, EYA1, FAH, FAM20A, FAN1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCI, FAS, FASLG, FAT1, FAT4, FCGR2A, FCGR3A, FGA, FGF10, FGF20, FGF23, FGFR2, FGFR3, FLCN, FLNA, FMN1, FN1, FOXI1, FOXP1, FRAS1, FREM1, FREM2, FUZ, FXYD2, G6PD, GANAB, GAPVD1, GATA3, GCM2, GDF11, GEMIN4, GLA, GLI3, GLIS2, GLIS3, GNA11, GPC3, GPHN, GREB1L, GRHPR, GRIP1, H19, HAAO, HAS2, HES7, HGD, HNF1A, HNF1B, HNF4A, HOGA1, HPRT1, HPSE2, HSD11B2, HSD17B4, HSPA9, IFT122, IFT140, IFT172, IFT27, IFT43, IFT46, IFT52, IFT74, IFT80, IFT81, INF2, INPP5E, INTU, INVS, IQCB1, IRF5, ITGA3, ITGA8, ITGAM, ITGB4, ITSN1, ITSN2, JAG1, JAM3, KANK1, KANK2, KANK4, KAT6B, KCNA1, KCNJ1, KCNJ10, KCNJ15, KCNJ16, KCTD1, KIAA0556, KIAA0586, KIAA0753, KIF14, KIF7, KLHL3, KMT2D, KYNU, LAGE3, LAMA5, LAMB2, LCAT, LMNA, LMX1B, LRIG2, LRP2, LRP4, LRP5, LYZ, LZTFL1, MAD2L2, MAFB, MAGED2, MAGI2, MAPKBP1, MBTPS2, MCM5, MKKS, MKS1, MMACHC, MNX1, MOCOS, MOCS1, MUC1, MYCN, MYH9, MYO1E, NAA10, NCAPG2, NDUFAF3, NDUFB8, NDUFS2, NEK1, NEK8, NEU1, NFIA, NIPBL, NOS1AP, NOTCH2, NPHP1, NPHP3, NPHP4, NPHS1, NPHS2, NR3C2, NRIP1, NSDHL, NUP107, NUP133, NUP160, NUP205, NUP85, NUP93, NXF5, NXN, OCRL, OFD1, OPLAH, OSGEP, PAX2, PAX8, PBX1, PCBD1, PCSK5, PDE6D, PDSS1, PDSS2, PEX1, PEX10, PEX11B, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX6, PGM3, PHEX, PHGDH, PIBF1, PIEZO2, PIGN, PIGT, PKD1, PKD2, PKHD1, PLA2R1, PLCE1, PMM2, PODXL, PORCN, PRKCD, PRKCSH, PRPS1, PTEN, PTPN22, PTPRO, PUF60, RAD21, RAI1, RARRES1, REN, RERE, RET, RFWD3, RMND1, RNU4ATAC, ROBO2, ROR2, RPGRIP1L, RPL26, SALL1, SALL4, SARS2, SCARB2, SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G, SDCCAG8, SEC61A1, SEC61B, SEC63, SEMA3E, SF3B4, SGPL1, SI, SIX1, SIX2, SIX5, SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3, SLC12A7, SLC22A12, SLC26A1, SLC26A7, SLC2A2, SLC2A9, SLC34A1, SLC34A3, SLC36A2, SLC3A1, SLC41A1, SLC4A1, SLC4A2, SLC4A4, SLC5A1, SLC5A2, SLC6A19, SLC6A20, SLC7A7, SLC7A9, SLC9A3R1, SLIT2, SMARCAL1, SNRPB, SON, SOX11, SOX17, SPRY2, SRGAP1, STAT1, STAT4, STK11, STRA6, STS, SUFU, SYNPO, TBC1D24, TBC1D8B, TBX18, TBX4, TBXT, TCTN1, TCTN2, TCTN3, TFAP2A, THBD, THOC6, TMEM107, TMEM138, TMEM216, TMEM231, TMEM237, TMEM260, TMEM67, TNFSF4, TNIP1, TNS2, TNXB, TP53RK, TP63, TPRKB, TRAF3IP1, TRAP1, TREX1, TRIM32, TRIP11, TRPC6, TRPM6, TRPS1, TRRAP, TSC1, TSC2, TTC21B, TTC37, TTC8, TXNDC15, TXNL4A, UMOD, UPK3A, USP8, VANGL1, VANGL2, VDR, VHL, VIPAS39, VPS33B, VTN, WDPCP, WDR19, WDR34, WDR35, WDR60, WDR72, WDR73, WFS1, WNK1, WNK4, WNT3, WNT4, WNT5A, WNT7A, WT1, XDH, XPNPEP3, XPO5, XRCC2, XRCC4, ZAP70, ZIC3, ZMPSTE24, ZNF148, ZNF365, ZNF423.*

Los genes incluidos en esta prueba han sido seleccionados clínicamente de acuerdo con su relación con un fenotipo particular y clasificados según la evidencia que respalda esta asociación en genes prioritarios, secundarios y candidatos.

Las sondas se diseñaron para cubrir adecuadamente todos los exones codificantes y 50 pares de bases (pb) de secuencias intrónicas flanqueantes; por lo tanto, esta prueba no puede identificar variantes genéticas ubicadas en zonas intrónicas alejadas de los sitios de empalme o regiones UTR.

Las regiones secuenciadas con cobertura limitada se enumeran al final de este apéndice en "Estadísticas de cobertura del estudio".

**Análisis de SNVseINDELs:** Esta prueba puede identificar variantes de un solo nucleótido (SNV) e inserciones/deleciones (INDEL) de hasta 20 pb. Las variantes genéticas se identifican utilizando el genoma de referencia GRCh37/hg19 y se notifican siguiendo las recomendaciones de la Human Genome Variation Society (HGVS) (www.hgvs.org). La patogenicidad de la variante puede estar sujeta a cambios a medida que aparezca nueva evidencia científica.

**Estudios de confirmación:** Las variantes incluidas en la tabla principal que cumplen las condiciones siguientes se confirman mediante pruebas ortogonales.

▪ Variantes de punto (SNV) e inserciones, eliminaciones y/o INDEL de ≤4 pb que cumplen al menos uno de los siguientes criterios: llamado por solo un llamador de variante, calidad subóptima (QUAL < 100), profundidad de cobertura < 30x, variantes en baja mapeabilidad o múltiples regiones de alineación.

▪ Inserciones, deleciones y/o INDELs>4 pb.

De manera similar, las regiones de baja cobertura en genes prioritarios que pueden ser de interés clínico se vuelven a secuenciar mediante el método de Sanger.

**Análisis CNV:** Este análisis se lleva a cabo utilizando una canalización de bioinformática interna. El software compara datos de profundidad de lectura normalizados. Detecta duplicaciones y deleciones, desde el nivel subexónico hasta el nivel de genes completos. La detección de CNV por este método depende de la calidad de las muestras y del número de muestras de control. Cuando la detección de CNV con este método no es posible, se informa como "CNV no evaluables".

**Estudios de confirmación CNV:** Todos los CNV que se consideren relevantes deben confirmarse mediante secuenciación de Sanger, MLPA o PCR digital.

**Especificaciones analíticas de la prueba:** La sensibilidad analítica y la especificidad de esta prueba son superiores al 99 % para variantes de un solo nucleótido (SNV) y pequeñas inserciones/deleciones (INDEL) de ≤20 pb. La detección de CNV utilizando nuestra técnica de profundidad de lectura tiene valores de sensibilidad y VPP superiores al 99 % y al 96 %, respectivamente.

**Software de análisis y gestión de los estudios:** El registro de los estudios y la consulta de aspectos relacionados con la gestión de muestras están disponibles a través de la plataforma ClientSite (healthincode) así como el análisis de los datos.

**Limitaciones técnicas:** A pesar de la alta sensibilidad y especificidad de esta prueba, pueden ocurrir algunos errores de genotipado en situaciones específicas:

- Contaminación de las muestras antes de que lleguen a nuestro laboratorio

- Mosaico y variantes somáticas. Es posible que bioinformática no identifique variantes con MAF

- Monosomías y trisomías

- Problemas genéticos de paternidad

- Variantes genéticas que producen abandonos alélicos

- Estudios realizados en tejidos incluidos en parafina

- Presencia de pseudogenes o regiones homólogas

- Presencia de reordenamientos cromosómicos complejos, translocaciones equilibradas e inversiones.

- Identificación incorrecta de variantes en zonas de homopolímero o alto contenido de GC

- Errores en la secuencia de referencia

Este estudio generalmente no puede identificar la fase (alelos iguales/diferentes) de más de una variante que afecta al mismo gen. Esta limitación debe considerarse en casos de trastornos recesivos, que ocurren solo cuando ambos alelos están mutados.

**Trazabilidad inequívoca:** Nuestro software desarrollado internamente, NextLIMS, identifica y rastrea de manera eficiente las muestras en el laboratorio y nos permite rastrear inequívocamente los pasos por los que ya ha pasado una muestra. Sin embargo, no podemos responsabilizarnos por errores de etiquetado en muestras que ocurran antes de que lleguen a nuestras instalaciones.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 2023 | 2024 |
| **Tareas** | **Nov** | **Dic** | **Ene** | **Feb** | **Mar** | **Abr** | **May** | **Jun** | **Jul** | **Ago** | **Sep** | **Oct** | **Nov** | **Dic** |
| **Fase de reclutamiento** |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| **Fase de secuenciación** |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| **Resultados e interpretación** |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| **Redacción de manuscritos** |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

**6 Selección de los participantes**

Todos los pacientes diagnosticados de ERC de causa desconocida antes de los 45 años, serán candidatos a ser incluidos en el estudio.

Previamente a la inclusión se dará información detallada del estudio, se resolverán dudas y si el paciente acepta se firmará por duplicado el consentimiento informado, recibiendo el paciente una copia firmada por el investigador principal.

La inclusión inicial correrá a cargo de los 4 centros que se presentan como investigadores principales, no obstante, a medida que se recauden fondos para el estudio, se adecuarán nuevos centros de la SOMANE para su participación (hasta la fecha han manifestado su intención de participar todos los centros madrileños).

6.1 Criterios de inclusión de los sujetos:

**Población de estudio:** Pacientes que desarrollaron ERC antes de los 45 años sin diagnóstico etiológico.

6.2 Criterios de exclusión de los sujetos:

**Población de estudio:** Pacientes que desarrollaron ERC después de los 45 años. Pacientes con un claro diagnóstico clínico, histológico o genético de su enfermedad renal.

**7 Tratamiento y calendario del estudio**

Sobre la población de estudio se realizarán los procedimientos habituales desarrollados en la práctica clínica. Todas las visitas y pruebas coincidirán con las programadas para el seguimiento clínico habitual. No se administrarán tratamientos diferentes, ni se realizarán otras pruebas extra.

Una vez identificados los potenciales pacientes en los diferentes hospitales de referencia, se les ofrecerá la entrada en el estudio, coincidiendo con una visita asistencial rutinaria. En el caso de aceptar su participación, se firmará el consentimiento por duplicado y se aportará uno de ellos. Después de la inclusión, todos los datos demográficos, clínicos e histológicos se recopilarán en la base de datos generada. Asimismo, se obtendrán muestras de sangre periférica (3-5 mL de en tubo de Plasma-EDTA) en la misma fecha en que se realicen las pruebas asistenciales de rutina.

Durante los primeros 6 meses del estudio, se identificarán los pacientes potenciales, se ingresarán en el ensayo, se obtendrán datos clínicos y se tomarán muestras de sangre de forma progresiva en los diferentes centros de salud. En un plazo total de 12 meses desde el inicio del proyecto, todos los estudios genéticos serán realizados por Health in Code, así como los informes pertinentes.

**8 Estadística**

El rendimiento diagnóstico se calculará en función de los recuentos de variantes clasificadas como "patogénicas" o "probablemente patógenas". Evaluaremos el desempeño para cada categoría de diagnóstico clínico usando un modelo de regresión logística (función R GLM), con nefropatía diabética (para la cual el desempeño fue más bajo) como referencia. Además, ejecutaremos modelos con ajuste por cohorte, sexo y edad al ingreso al estudio. Las comparaciones por pares se realizaron con una prueba exacta de Fisher de dos colas. Se consideró que un valor de P corregido por Bonferroni de menos de 0,007 indicaba significación estadística.

**9 Ética y aspectos legales**

Todos los candidatos a participar en el estudio serán informados detalladamente al respecto, podrán resolver dudas y si desean participar firmarán el consentimiento - 2 copias - recibiendo una de las copias firmadas, antes de su inclusión.

El estudio se realizó en cumplimiento de la Declaración de Helsinki (versión actual; actualmente Fortaleza, Brasil, octubre de 2013). Además, el estudio se realizará de acuerdo con el protocolo y con los requisitos legales pertinentes: Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, si se trata de un proyecto de investigación que no tiene nada que ver con medicamentos.

**10 Gestión de datos**

Tipo y formato de datos que serán recabados:

1. Datos demográficos, clínicos e histológicos recogidos de los pacientes que desarrollaron ERC de origen desconocido: demográficos, enfermedades y tratamientos previos, datos analíticos, pauta inmunosupresora, evolución clínica, evaluación histológica y complicaciones (tratamientos y evolución).

2. También se recogerán muestras biológicas (sangre periférica). Todas las muestras se recogerán aprovechando las punciones analíticas definidas por el seguimiento clínico periódico de los pacientes, evitando así la realización de procedimientos innecesarios. De acuerdo con la Ley 14/2007, se recogerán directamente del interesado y se seguirá el procedimiento marcado por la normativa de uso de muestras biológicas para autorizar su uso. Las muestras serán posteriormente almacenadas (-20ºC) en los hospitales participantes y posteriormente enviadas a las oficinas de Healthincode para realizar el estudio genético completo.

3. Datos generados a partir de los objetivos propuestos a lo largo del plan de trabajo del estudio: estudio genético completo.

4. Todos los datos serán codificados, y sólo se recogerán los necesarios para la consecución de los objetivos de la investigación.

Acceso a los datos:

1. Las variables clínicas necesarias para la realización del estudio se obtendrán de la historia clínica del centro, y posteriormente tendrán un proceso de codificación y seudonimización, de acuerdo con lo dispuesto en los artículos 6.e), 9.2. j) + 89 RGPD, así como la disposición adicional 17.2.d de la LOPD-GDD. Solo después, los investigadores del presente proyecto tendrán acceso a ellos.

2. Los investigadores básicos recibirán muestras de los pacientes codificados y seudonimizados, y se realizará la correlación y asociación entre los datos clínicos y experimentales en base al código alfanumérico establecido.

3. El hospital en el que el paciente esté recibiendo asistencia sanitaria actúa como responsable del tratamiento de datos en el marco de este estudio observacional. El contacto del delegado de protección de datos en este centro es dpo@fjd.es.

Procedimiento para garantizar los requisitos éticos y legales específicos de la recogida y acceso a los datos:

**11 Tratamiento de los Datos y Archivo de los Registros. Confidencialidad de los datos.**

El tratamiento, almacenamiento, comunicación y cesión de los datos personales de todos los participantes se ajustará al Reglamento UE 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de datos, y a la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. La base legal que justifica el tratamiento de tus datos es el consentimiento que prestas en este acto, de conformidad con lo dispuesto en el artículo 9 del Reglamento UE 2016/679.

Los datos recogidos para estos estudios se recogerán identificados únicamente mediante un código, por lo que no se incluirá información que permita identificar a los participantes. Únicamente el médico del estudio y sus colaboradores con derecho de acceso a los datos fuente (historia clínica), podrán relacionar los datos recogidos en el estudio con la historia clínica del paciente.

La identidad de los participantes no será accesible a ninguna otra persona excepto por una emergencia médica o requerimiento legal. Las autoridades sanitarias, el Comité de Ética de la Investigación y el personal autorizado por el promotor del estudio podrán tener acceso a los datos personales identificados, cuando sea necesario para verificar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de acuerdo con la legislación vigente.

Únicamente se transferirán a terceros y otros países los datos cifrados, que en ningún caso contendrán información que pueda identificar directamente al participante (como nombre y apellidos, iniciales, dirección, número de la seguridad social, etc.). En el caso de que se produzca esta cesión, sería con la misma finalidad del estudio descrito y garantizando la confidencialidad.

Si se realiza una transferencia de datos cifrados fuera de la UE, ya sea en entidades vinculadas al centro hospitalario donde participa el paciente, a proveedores de servicios o a investigadores que colaboran con nosotros, los datos de los participantes estarán protegidos por garantías como contratos o otros mecanismos establecidos por las autoridades de protección de datos.

Como promotores del proyecto, nos comprometemos a tratar los datos de acuerdo con el Reglamento UE 2016/679 y, por tanto, a llevar un registro de las actividades de tratamiento que realizamos y a realizar una evaluación de riesgos de los tratamientos que realizamos. para saber qué medidas tendremos que aplicar y cómo hacerlo.

Además de los derechos que ya contemplaba la legislación anterior (acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, supresión en el nuevo Reglamento) ahora los participantes también pueden limitar el tratamiento de los datos recogidos para el proyecto que sea incorrecto, solicitar una copia o transferido a un tercero (portabilidad). Para ejercer estos derechos, deberán contactar con los investigadores principales del estudio. También tienen derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no están satisfechos.

Los datos no se pueden eliminar, incluso si un paciente se retira del estudio, para garantizar la validez de la investigación y cumplir con las obligaciones legales y los requisitos de autorización de medicamentos.

Los investigadores principales y el Promotor conservaran los datos recopilados para el estudio durante al menos 10 años después de su finalización. Posteriormente, la información personal sólo será conservada por el centro de salud y por el promotor para otros fines de investigación científica si el paciente ha dado su consentimiento para ello, y si así lo permite la legislación aplicable y los requisitos éticos.

**12 Gestión de las muestras biológicas**

Todas las muestras se recogerán aprovechando las punciones analíticas definidas por el seguimiento clínico periódico de los pacientes, evitando así la realización de procedimientos innecesarios. De acuerdo con la Ley 14/2007, se recogerán directamente del interesado y se seguirá el procedimiento marcado por la normativa de uso de muestras biológicas para autorizar su uso. Las muestras se enviarán posteriormente a Health in Code:

**Ley aplicable y políticas generales de gestión de datos:**

De conformidad con: REGLAMENTO (UE) 2016/679 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos (Reglamento General de Protección de Datos ); Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales; Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal; y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica, y en cuanto a su artículo 52:

1. Los datos genéticos de carácter personal se conservarán durante un plazo mínimo de cinco años a partir de la fecha en que se hayan obtenido, transcurridos los cuales EL RESPONSABLE (EL CLIENTE), o el interesado, podrá solicitar su cancelación.

2. A falta de solicitud de EL RESPONSABLE, o del interesado, los datos serán conservados durante el plazo que sea necesario para preservar la salud de la persona de quien procedan o de terceros relacionados con ellos.

3. Fuera de estos casos, los datos sólo podrán conservarse, con fines de investigación, de forma anónima, sin que sea posible la identificación del sujeto fuente.

No obstante, Health in Code podrá conservar una copia, con los datos debidamente bloqueados, mientras se deriven responsabilidades por la ejecución del servicio.

**Archivos bioinformáticos:**

La política de retención y eliminación de registros genéticos de Health in Code establece que los datos sin procesar de secuenciación recopilados de nuestra plataforma NGS (archivos BCL) se conservan durante un período mínimo de retención de 5 años, mientras que los archivos FASTQ procesados bioinformáticamente se almacenan durante un período mínimo de 1 año. Siguiendo la misma política, nuestros informes clínicos se archivan para una retención mínima de 5 años y se almacenan tanto en papel como en versión digital. Todos los datos bioinformáticos intermedios (principalmente alineaciones) también se conservan durante un mínimo de 5 años.

Aunque nuestra política enfatiza la relevancia de almacenar archivos BCL por más tiempo en lugar de FASTQ; se debe considerar que los archivos FASTQ se pueden volver a generar siempre y cuando mantengamos los archivos BCL originales. De hecho, está permitido convertir datos de formato BCL a FASTQ, pero no al contrario. Si se requiere el reprocesamiento de datos, se recomienda almacenar archivos BCL, ya que son el resultado principal de la secuenciación.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Formato de datos** | **Tiempo mínimo de conservación** | **Recuperación** |
| BCL | 5 años | Una copia de seguridad |
| FASTQ | 1 año | N/A\* |

*\*Debido a la capacidad de almacenamiento limitada, solo se conservan bcl durante un período de retención mínimo de 5 años (según la Ley de Protección de Datos Personales de España), pero todos los archivos de configuración (archivos de configuración) se almacenan de forma ilimitada, lo que garantiza la recuperación completa de los datos del paciente de los datos de secuenciación obtenidos originalmente en formato bcl.*

Health in Code dispone de su propia biblioteca de ADN genómico que garantiza la disponibilidad de la muestra mediante estudios adicionales o complementarios, durante un periodo mínimo de 5 años (siguiendo las recomendaciones de la LOPDGDD). Consistirá la concentración de ADN y el método de extracción utilizado. El control de temperatura se realiza con un sistema de monitorización continua que lleva un sistema de alerta de temperaturas no aceptables. Así, nos hacemos cargo de la custodia del excedente de muestra de ADN de acuerdo con la normativa vigente, estando disponible para su devolución al centro peticionario si éste lo solicita.

**POLÍTICA DE ALMACENAMIENTO DE MUESTRA:**

• Tubo primario: A -20 ºC, mínimo 6 meses con posibilidad de ampliar hasta 1 año (pero no más), dependiendo de la capacidad de almacenamiento de cada sitio.

• ADN genómico: A -20 ºC, mínimo 5 años, con posibilidad de mantener el archivo indefinidamente, dependiendo de la capacidad de almacenamiento de cada sitio.

• RNAs: A -80 ºC, mínimo 5 años, con posibilidad de mantener el archivo indefinidamente, dependiendo de la capacidad de almacenamiento de cada sitio.

• Diluciones de trabajo: A -20 ºC, mínimo 1 año con posibilidad de ampliar hasta 5 años (pero no más), dependiendo de la capacidad de almacenamiento de cada sitio.

• Agro:

• Muestras originales: mínimo 1 mes, conservadas a temperatura ambiente oa -20ºC, según se trate de productos perecederos.

• Muestras extraídas (ADN): mínimo 3 meses a -20ºC

• COVID: Las muestras originales y los RNAs extraídos se almacenan al menos 1 mes a -20ºC

Tras finalizar el acuerdo entre la SEN y Healthincode y las prórrogas que apliquen se procederá a destruir las muestras biológicas de acuerdo a la legislación vigente o bien se devolverán los materiales a los peticionarios si así lo solicitan dentro del tiempo que marca la legislación arriba indicada.

Los datos genéticos y fenotípicos de los pacientes serán incorporados a una base de datos anonimizada de Healthincode para su uso exclusivo con fines de investigación y aplicación diagnóstica, como consta en el consentimiento informado

**13 Memoria económica -Financiación**

HEALTH IN CODE, S.L como parte colaboradora del acuerdo con la SOCIEDAD MADRILEÑA DE NEFROLOGIA llevará a cabo la realización del estudio genético de las muestras incluidas en el convenio bajo el título “Estudio FOREVER (FORo para Encontrar la Verdadera causa de la Enfermedad Renal)”. El servicio ofertado bajo la referencia S-202212474 y nombre Panel global de nefropatías hereditarias (529 genes) – SOMANE.

El servicio prestado por HEALTH IN CODE como parte colaboradora de este proyecto incluye:

-Extracción del material genético a partir de muestras de sangre o saliva válidas para su secuenciación de alto rendimiento.

-Preparación de una librería de captura de secuenciación enriquecida que incluye 529 genes de justificación para su análisis en el diagnóstico de nefropatías hereditarias.

-Secuenciación de alto rendimiento mediante la plataforma Illumina alcanzando una cobertura media superior a 400x de las regiones codificantes e intrónicas +/-50pb.

-Realización de la bioinformática de los datos crudos generados por la secuenciación y su carga en la plataforma de visualización de ClientSite (propiedad de HEALTH IN CODE, S.L).

- Soporte en el análisis de los datos cargados en el ClientSite, con el fin de asegurar el uso adecuado de las herramientas y una correcta interpretación de los resultados para los peticionarios autorizados por la SOCIEDAD MADRILEÑA DE NEFROLOGÍA.

Este servicio será financiado por la SOCIEDAD MADRILEÑA DE NEFROLOGIA: En términos generales, el servicio de secuenciación, bioinformática y herramienta sin informe de HEALTH IN CODE, S.L tiene una tarifa base por muestra de 520€.

Según la previsión de la SOCIEDAD MADRILEÑA DE NEFROLOGIA para una estimación de 58 estudios, el coste global ascendería a 30.000€. La financiación se realizará a partir de recursos obtenidos de forma competitiva (solicitud de diferentes becas competitivas) y de forma no competitiva. Actualmente, la Sociedad MADRILEÑA de Nefrología (SOMANE) está presentando la propuesta real a diferentes entidades con el fin de obtener la financiación necesaria para desarrollar todo el proyecto. Hasta la fecha se dispone de un acuerdo con ALEXION-Pharma, que aportará 30.000 €.

**14 Política de Publicación**

**Plan de difusión**

Los resultados del proyecto se presentarán en congresos nacionales e internacionales de Nefrología y Enfermedades Hereditarias. Los resultados se publicarán en revistas de alto nivel a través de código abierto. Una de las prioridades de la Sociedad Española de Nefrología ha sido comunicar el conocimiento que generamos no solo a la comunidad científica, sino también a los pacientes ya la sociedad en general. Los grupos de investigación que participan en esta propuesta están muy involucrados en iniciativas tanto nacionales como internacionales y generarán sinergias para la difusión y explotación de los resultados de la investigación dentro de las principales plataformas de sus Sociedades Nacionales e Internacionales y asociaciones de pacientes como ALCER.

Los hallazgos clave de este proyecto se compartirán con el público y los medios a través de comunicados de prensa, conferencias de prensa, informes científicos y redes sociales. Para eso contamos con el apoyo de nuestros equipos de prensa institucionales, contactos de medios y posicionamiento en redes sociales. La difusión de resultados e hitos destacados se hará accesible a través de la web institucional y específica de las sociedades científicas y redes sociales.