



**Universitat de les
Illes Balears**

Papel de los péptidos bioactivos de los lácteos de la dieta en la prevención de las infecciones

María del Carmen Elena Elena

Diplomado en Enfermería, 1992, Universidad de Valladolid
Enfermera Especialista en Enfermería Obstétrico-Ginecológica (Matrona), 2004, Hospital
General Universitario de Alicante

Memoria del Trabajo Final de Máster

Máster Universitario en Nutrición y Alimentación Humana
de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Mayo, 2017

Firmas

Autor _____

*María del Carmen Elena Elena
31 de Mayo de 2017*

Certificado _____

*Marta Monjo Cabrer
Tutor del Trabajo*

Aceptado _____

*Josep Antoni Tur Marí
Director del Máster Universitario en Nutrición y Alimentación Humana*

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
1 INTRODUCCIÓN.....	6
2 OBJETIVOS	13
3 HIPÓTESIS	14
4 MATERIAL Y MÉTODOS	15
4.1 Diseño del estudio	15
4.2 Participantes.....	15
4.3 Criterios de inclusión y exclusión	15
4.4 Cálculo del tamaño de la muestra.....	16
4.5 Instrumentos y medidas.....	16
4.6 Variables	17
4.7 Procedimiento de recogida de datos.....	19
4.8 Intervención	19
4.9 Análisis de los datos	20
5 ASPECTOS ÉTICOS.....	20
6 BENEFICIOS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO	21
REFERENCIAS	23
Anexo I. Hoja de información en el estudio del papel preventivo de la ingesta de péptidos bioactivos lácteos sobre la infección.....	29
Anexo II. Consentimiento informado	30

RESUMEN

Antecedentes: La infección es una de las condiciones patológicas que mayor carga ocasionan al sistema de salud y ponen en mayor riesgo la calidad de vida de las personas, con un significativo índice de morbimortalidad. Los péptidos bioactivos son fragmentos que permanecen inactivos en secuencias de proteínas precursoras, pero que cuando son liberados por la acción de enzimas proteolíticas pueden interaccionar con receptores seleccionados y regular diversas funciones fisiológicas del organismo. Además, se ha descrito que algunos péptidos bioactivos pueden tener un efecto protector frente a las enfermedades infecciosas. **Objetivos:** El objetivo general es evaluar la eficacia de la ingesta de péptidos bioactivos derivados de la leche de vaca en la prevención de enfermedades infecciosas. Otros objetivos específicos son: analizar la eficacia de lactoferricina y caseicidina en la prevención de la gripe, la gastroenteritis, así como evaluar sus posibles efectos secundarios. **Métodos:** se realizará un ensayo clínico aleatorizado controlado con tres grupos, de los cuales dos recibirán una intervención consistente en un suplemento nutricional probiótico con lactoferricina (grupo intervención 1), con caseicidina (grupo intervención 2), mientras que un tercero seguirá su dieta habitual. La intervención durará 12 meses, coincidiendo con la temporada de observación de la gripe (septiembre a agosto), y se tomarán medidas antes de la intervención, a los 6 meses, al finalizar la intervención, así como a los 12 meses después de la finalización. Los participantes serán 9.366 personas entre 18 y 65 años de edad del municipio de Murcia. **Resultados esperados:** se espera que los participantes de los grupos con ingesta de péptidos bioactivos tengan una menor incidencia de enfermedades infecciosas en general, y de gripe y gastroenteritis en particular. Además, no se esperan efectos secundarios adversos sobre el organismo.

Palabras clave: péptidos bioactivos, lactoferricina, caseicidina, gripe, gastroenteritis.

ABSTRACT

Background: Infection is one of the pathological conditions that cause greater burden to the health system and put at risk the quality of life of people, with a significant index of morbidity and mortality. Bioactive peptides are fragments that remain inactive in precursor protein sequences, but when they are released by the action of proteolytic enzymes, they can interact with selected receptors and regulate several physiological functions of the organism. Among them, a protective effect against infectious diseases has been described. **Objectives:** The overall objective is to evaluate the efficacy of ingestion of bioactive peptides derived from cow's milk in the prevention of infectious diseases. Other specific objectives are: to analyze the efficacy of lactoferricina and caseicidin in the prevention of influenza, gastroenteritis, as well as to evaluate their possible side effects. **Methods:** A randomized controlled clinical trial will be conducted with three groups, two groups will receive a probiotic nutritional supplement either with lactoferricin (intervention group 1) or with caseicidine (intervention group 2), while a third group will follow the usual diet. The intervention will last 12 months, coinciding with the influenza observation season (September to August), and measures will be taken before the intervention, at 6 months, at the end of the intervention, and at 12 months after the intervention. Participants will be 9,366 people between 18 and 65 years of age from the municipality of Murcia. **Expected results:** Participants taking bioactive peptides as supplements in their diets are expected to have a lower incidence of infectious diseases in general, and of influenza and gastroenteritis in particular. In addition, no adverse side effects are expected.

Keywords: Bioactive peptides; Lactoferricin; Caseicidin; Infectious diseases; Flu; Gastroenteritis.

1 INTRODUCCIÓN

Los péptidos biológicamente activos se definen como fragmentos que permanecen inactivos en secuencias de proteínas precursoras, pero que cuando son liberados por la acción de enzimas proteolíticas pueden interaccionar con receptores seleccionados y regular las funciones fisiológicas del organismo. El efecto ejercido por tales péptidos puede ser positivo o negativo (1). Las enzimas proteasas se producen naturalmente en productos alimenticios, tales como la plasmina de la leche, hidrolizan proteínas y liberan fragmentos bioactivos durante el procesamiento o el almacenamiento. Muchos tipos de bacterias aplicadas en la producción de productos alimenticios fermentados y que se producen naturalmente en el tracto gastrointestinal son capaces de producir péptidos biológicamente activos. El queso contiene péptidos fosfo que se proteolizan adicionalmente en el proceso de maduración del queso, dando lugar a la formación de diversos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (2).

Los péptidos biológicamente activos derivados de la leche se encuentran inicialmente en forma inactiva dentro de la secuencia de las moléculas precursoras, pero pueden liberarse de tres maneras (3):

a) hidrólisis enzimática con enzimas digestivas como pepsina, tripsina, quimotripsina, etc.;

b) fermentación de la leche con cultivos iniciadores proteolíticos;

c) proteolisis por enzimas derivadas de microorganismos proteolíticos.

Una vez que estos péptidos bioactivos se liberan, pueden servir para influir en numerosas respuestas fisiológicas incluyendo la actividad cardiovascular, digestiva, endocrina, inmune y neurológica.

Los péptidos bioactivos pueden liberarse *in vivo* durante la digestión gastrointestinal por la acción de enzimas digestivas como pepsina, tripsina o quimotripsina. Las proteínas dietéticas sufren desnaturalización en presencia de ácido clorhídrico secretado por las células parietales del estómago. Este ácido activa el pepsinógeno y lo convierte en su forma activa, la pepsina. La pepsina

actúa sobre las proteínas para metabolizarlas a aminoácidos. La digestión gastrointestinal permite la acción consecuyente de las enzimas presentes en el intestino delgado tales como pepsina, tripsina o quimotripsina, que son responsables de la hidrólisis de las proteínas (3). Se sabe que varios péptidos bioactivos, como péptidos anti-bacterianos, inmunomoduladores, antihipertensivos y opioides, se liberan de la caseína y/o proteínas de suero por digestión gastrointestinal (4). Algunas otras enzimas proteolíticas tales como alcalasa, termolisina, se pueden utilizar con pepsina y tripsina para simular la digestión gastrointestinal. También se han empleado para liberar diversos péptidos bioactivos, incluyendo los anticonceptivos (5), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (6), anti-bacterianos (7), anti-oxidantes (8), inmunomoduladores (9) y péptidos opioides (10).

Un segundo proceso de formación de péptidos bioactivos implica la actuación de las bacterias del ácido láctico. Se ha informado que varias bacterias de ácido láctico, como *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus helveticus*, liberan péptidos bioactivos por el proceso de fermentación. Este sistema consiste en una serie de distintas peptidasas intracelulares, incluyendo endo-peptidasas, amino-peptidasas, dipeptidasas y tri-peptidasas (11). Estudios recientes han revisado la producción de diversos péptidos bioactivos, incluyendo péptidos antimicrobianos, inmunomoduladores, antioxidantes e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina a través de la proteólisis microbiana (12).

No obstante, la forma más común de producir péptidos bioactivos de la leche es a través de la hidrólisis enzimática de las moléculas de proteínas enteras. También se han utilizado enzimas digestivas y combinaciones de diferentes proteinasas que incluyen alcalasa, quimotripsina, pepsina y termolisina, así como enzimas de fuentes bacterianas y fúngicas para generar péptidos bioactivos de diversas proteínas (13).

La leche contiene aproximadamente un 3,5% de proteínas, de las cuales el 80% son caseína y el 20% proteínas de suero de leche. El suero de leche contiene β -lactoglobulina, α -lactalbúmina y varias proteínas menores con diferentes actividades biológicas tales como enzimas, unión a los minerales e inmunoglobulinas (14). Las proteínas de la leche se sintetizan en la glándula mamaria, pero el 60% de los aminoácidos usados para construir las proteínas se obtienen a través de la ingesta de la leche de la vaca. El contenido total de proteína de leche y la composición de aminoácidos varía con la raza de vaca y la genética animal individual. Hay dos categorías principales de proteínas de la leche: la familia de la caseína contiene fósforo y coagulará o precipitará a pH 4.6. Las proteínas del suero no contienen fósforo, y estas proteínas permanecen en solución en la leche a pH 4.6. En la leche de vaca, aproximadamente 82% de la proteína de la leche es caseína y el 18% restante es suero o proteína de suero (15). La familia de las proteínas de la caseína consiste en varios tipos de caseínas (α -s1, α -s2, β , y caseína-6) y cada uno tiene su propia composición de aminoácidos, variaciones genéticas, y características funcionales. Las caseínas se suspenden en la leche en un complejo llamado micela. Las caseínas tienen una estructura relativamente aleatoria, abierta debido a la composición de aminoácidos (alto contenido de prolina). El alto contenido de fosfato de la familia de la caseína permite asociarse con el calcio y formar sales de fosfato cálcico. La abundancia de fosfato permite que la leche contenga mucho más calcio de lo que sería posible si todo el calcio se disolviera en solución, por lo tanto, las proteínas de caseína-6 proporcionan una buena fuente de calcio para los consumidores de leche. La caseína está hecha de una porción de carbohidrato unida a la cadena proteica y está situada cerca de la superficie exterior de la micela de caseína (14).

La familia de proteínas de suero consiste en aproximadamente un 50% de β -lactoglobulina, un 20% de α -lactoalbúmina, albúmina de suero sanguíneo, inmunoglobulinas, lactoferrina, transferrina y muchas proteínas y enzimas menores. Al igual que los otros componentes principales de la leche, cada proteína de suero tiene su propia composición y variaciones características. Las proteínas del suero no contienen fósforo, por definición, pero contienen una gran cantidad de aminoácidos que contienen azufre. Éstos forman enlaces disulfuro

dentro de la proteína haciendo que la cadena forme una forma esférica compacta. Los enlaces disulfuro pueden romperse, dando lugar a la pérdida de estructura compacta, un proceso llamado desnaturalización (14). La desnaturalización es una ventaja en la producción de yogur porque aumenta la cantidad de agua que las proteínas pueden unirse, lo que mejora la textura del yogur. Este principio también se utiliza para crear ingredientes de proteína de suero especializados con propiedades funcionales únicas para su uso en alimentos (15).

Las propiedades multifuncionales de los péptidos de la leche biológicamente activos son cada vez más reconocidas. Éstos podrían tener un impacto positivo en la fisiología humana y el metabolismo ya sea directamente o a través de la hidrólisis enzimática *in vivo* o *in vitro* (17). La actividad de los péptidos se basa en su composición y secuencia inherentes de aminoácidos. El tamaño de las secuencias de péptidos bioactivos que poseen propiedades multifuncionales puede variar de dos a veinte residuos de aminoácidos (18). Debido a su versatilidad fisiológica, los péptidos bioactivos derivados de la leche han llamado la atención de muchos investigadores a nivel mundial para formular varios fármacos potenciales con propiedades nutricionales complementarias, alimentos funcionales para la salud u otros productos farmacéuticos (19).

Se ha descrito que los péptidos bioactivos antimicrobianos derivados de la leche inhiben muchos patógenos Gram positivos y Gram negativos incluyendo *Escherichia coli* MTCC82, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, *Salmonella typhi* MTCC3216, *Bacillus cereus* ATCC10702, *Salmonella typhimurium* SB300, *S. enteritidis* 125109, o *Staphylococcus aureus* MTCC 96 (20), previniendo muchas infecciones microbianas. De manera similar, la caseína digerida con quimosina libera un péptido de caseicidina que exhibe actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus spp.*, *Sarcina spp.*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* (21).

Estos péptidos tienen actividades líticas de la membrana bacteriana que alteran la permeabilidad normal de la membrana. El efecto antibacteriano total en la leche es mayor que la suma de inmunoglobulina individual y de otras

proteínas como la lactoferrina, las lactoferricinas, la lactoperoxidasa, la lisozima, la lactenina, los caseodubos, etc. (22).

Entre los péptidos antimicrobianos, las lactoferricinas, que se derivan de lactoferrina bovina y humana, son las más estudiadas (23). Se ha demostrado que las lactoferricinas tienen actividad antimicrobiana contra diversas bacterias Gram positivas y negativas, levaduras y hongos filamentosos (24). La lactoferricina es un péptido catiónico anfipático con propiedades antimicrobianas (23) y anticancerígenas (25). La lactoferricina puede ser generada por la digestión mediada por pepsina de la lactoferrina. La base de datos de Milk AMP contiene un total de 111 péptidos (naturales, sintéticos y modificados) que están derivados de la lactoferricina que presenta funciones antimicrobianas y anticancerígenas (26).

El resfriado común y la gripe son las infecciones virales más comunes y se producen en el tracto respiratorio. Muchos virus causan el resfriado común. Entre los virus del resfriado común, se ha observado una actividad antiviral de la lactoferrina contra el virus respiratorio sincitial (27) y el virus parainfluenza (28). La actividad anti-virus de la influenza de la lactoferrina también se ha observado contra los tipos de virus de la influenza A H1N1, H3N2 y H5N1 (gripe aviar) (29). Una encuesta a mujeres adultas reveló que el consumo de comprimidos que contienen lactoferrina disminuye la incidencia de síntomas comunes de resfriado y síntomas de gastroenteritis (30). Otro estudio informó que la administración de lactoferrina con inmunoglobulina de la leche reduce la incidencia del resfriado común en los seres humanos (31). Sin embargo, la lactoferrina no mostró un efecto favorable en un modelo de infección por virus RS en ratones (32). En un modelo de ratón para la infección por el virus de la gripe, la inclusión de lactoferrina en la alimentación redujo los marcadores inflamatorios pulmonares (33). No obstante, todavía no hay ningún informe sobre los efectos de la lactoferrina en la prevención de la gripe en humanos. Sí se ha observado que las células asesinas reconocen y destruyen las células objetivo infectadas por la gripe o el virus parainfluenza (34), informándose por lo tanto de una relación positiva entre la frecuencia del resfriado común y la actividad de las células asesinas (35). Se ha demostrado que la suplementación de la alimentación con lactoferrina mejora la actividad de las células asesinas en pacientes con pólipos

colorrectales adenomatosos, lo que podría incidir positivamente en la prevención de la gripe (36). Este aumento del número de células asesinas en ratones también ha sido puesta de manifiesto (37).

La gastroenteritis causada por rotavirus y norovirus también es una enfermedad importante especialmente en invierno. El norovirus es un patógeno humano emergente extremadamente importante que causa la mayoría de brotes de gastroenteritis en todo el mundo. Los efectos *in vitro* anti-rotavirus de la lactoferrina han sido hallados por algunos investigadores (38). El norovirus humano sigue siendo difícil de estudiar, porque hay una falta de cultivos celulares y modelos animales. En cambio, el calicivirus felino y el norovirus murino, que pueden cultivarse y comparten una serie de propiedades bioquímicas, organización genómica similar y secuencias de ARN primario con el norovirus humano, se han utilizado como un sustituto del virus para estudiar el norovirus humano. Un estudio utilizando calicivirus felino demostró que la lactoferrina bovina inhibe la infección viral de células de riñón felino de Crandell-Reese mediante la unión al virus (39). La lactoferrina bovina también disminuyó la infección por el norovirus murino a través de la inhibición de la fijación inicial del norovirus murino a las células y la posterior interferencia con la replicación del norovirus murino (40). La inducción de la expresión de interferón de citoquina antiviral (IFN)- α/β por lactoferrina estuvo implicada en la inhibición de la replicación viral en las células infectadas. Este estudio muestra la inhibición de la replicación viral en las células y la participación de IFN- α/β en el efecto antiviral de la lactoferrina. Ya se ha informado de que la administración oral de lactoferrina induce IFN- α/β en el intestino delgado de ratones (37).

Los resfriados de verano son causados por adenovirus y una familia de virus llamados enterovirus, que tienen una preferencia por una temperatura más cálida. El adenovirus causa principalmente infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, pero también causa enfermedades del intestino, ojos, hígado, tracto urinario y tejido linfoide. Se sabe que el adenovirus causa fiebre faringoconjuntival, también llamada fiebre común. La secreción nasal, la congestión nasal y el drenaje postnasal son quejas asociadas comúnmente con los resfriados tanto de verano como de invierno. Sin embargo, los enterovirus pueden causar enfermedades más complicadas, que incluyen fiebre, dolor de

garganta, tos, diarrea y erupción cutánea. La lactoferrina inhibe el efecto citopático del adenovirus en células HEP-2 (41), donde el efecto de la lactoferrina bovina es más potente que el de la lactoferrina humana. Por otra parte, otra investigación informó que la lactoferrina humana promueve la unión de adenovirus a las células epiteliales corneales humanos y previene la infección de las células por adenovirus (42).

Los virus del herpes simple tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2) producen infecciones latentes permanentes en el huésped y pueden reaparecer periódicamente a lo largo de la vida, causando principalmente lesiones herpéticas faciales y genitales, respectivamente. Las actividades anti-herpes in vitro de la lactoferrina se han estudiado para HSV-1 (43) y HSV-2 (44). El efecto de la lactoferrina administrada por vía oral en la infección por HSV se ha observado en un estudio (45). Este estudio indicó que la administración de lactoferrina previene la pérdida de peso corporal y aumenta la producción de citoquinas Th1, incluyendo IFN- γ , IL-12 e IL-18, después de la infección cutánea por HSV-1 en ratones. Estas respuestas mejoradas de citoquinas Th1 pueden ayudar a proteger al huésped contra la infección por HSV-1.

Las lacteninas, que son moléculas antibacterianas que se encuentran en la leche fresca recién ordeñada, pueden haber sido el primer factor antibacteriano encontrado en la leche, que se ha liberado de la hidrólisis del cuajo de la leche (22). Las caseicinas son un grupo de polipéptidos básicos, glicosilados y de alto peso molecular (aproximadamente 5 kDa), que poseen propiedades bactericidas contra lactobacilos y también contra diversas bacterias patógenas tales como *E. coli* (46). La caseicina, obtenida por digestión mediada por quimosina de caseína a pH neutro, se encontraba entre los primeros péptidos de defensa realmente purificados que exhibía actividad contra *Staphylococcus spp.*, *Sarcina spp.*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (47). Un fragmento catiónico de una s2-caseína, f165-203, conocida como caseína-I, puede inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y *S. carnosus* (48). Otros dos péptidos se han aislado a partir de un hidrolizado péptico de s2-caseína, (f183-207 y f164-179). Los primeros mostraron mayor actividad antimicrobiana que los segundos, aunque ambos poseían efectos hemolíticos comparables (49). Otro fragmento de una s1-caseína (F1-23),

conocido como isracidin, ha demostrado actividad de tipo antibiótico in vivo contra *S. aureus* y *Candida albicans*, observándose propiedades contra la mastitis en ovejas y vacas (47). Los fragmentos de b-caseína humana también tienen un efecto protector contra *Klebsiella pneumoniae* en ratones (50).

En la tabla 1 se presenta un resumen de los principales péptidos bioactivos derivados de la leche con propiedad antimicrobiana y los patógenos contra los que actúa (51,52).

Tabla 1. Principales péptidos derivados de la leche con propiedades antimicrobianas (51,52).

Nombre	Origen	Patógenos objetivo
Lactoferricina	Lactoferrina	Bacillus, E. coli, Candida albicans, Listeria, Streptococci, Klebsiella, Staphylococci, Proteus, Pseudomonas, Salmonella
Caseicidina	Caseína + Quimosina	Staphylococcus, Bacillus subtilis, Diplococcus pneumonia, Streptococcus pyogenes
Isracidina	alfa-caseína	Staphylococcus aureus
Casocidina-I	alfa-caseína	Escherichia coli, Staphylococcus carnosus
Péptidos derivados de beta-caseína	beta-caseína	Enterococcus faecium, Bacillus megaterium

2 OBJETIVOS

El objetivo general del estudio es evaluar la eficacia de la ingesta de péptidos bioactivos derivados de la leche de vaca en la prevención de enfermedades infecciosas, más concretamente, queremos analizar el efecto que tiene la ingesta de productos lácteos enriquecidos con péptidos bioactivos derivados de la leche (lactoferricina -derivado de la lactoferrina- y caseicidina – derivado de la caseína-) sobre la incidencia de enfermedades infecciosas.

Como objetivos específicos se han establecido los siguientes:

1. Analizar la eficacia de lactoferricina y caseicidina en la prevención de la gripe.

2. Evaluar el efecto de la ingesta de péptidos lácteos sobre la gastroenteritis.
3. Describir los posibles efectos secundarios sobre el organismo de la ingesta continuada de péptidos lácteos.

3 HIPÓTESIS

Se han planteado cuatro hipótesis relacionadas con los objetivos del estudio:

- H1: La ingesta de péptidos bioactivos derivados de la leche disminuye la incidencia de enfermedades infecciosas.
- H2: La ingesta de lactoferricina y caseicina disminuye la incidencia de la gripe.
- H3: La ingesta de péptidos lácteos disminuye la incidencia de gastroenteritis.
- H4: la ingesta de lactoferricina y caseicina de forma continuada no produce efectos secundarios perjudiciales al organismo.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

Ensayo clínico aleatorizado controlado con tres grupos, de los cuales dos recibirán una intervención consistente en un suplemento nutricional probiótico con lactoferricina (grupo intervención 1), con caseicidina (grupo intervención 2), mientras que un tercero seguirá su dieta habitual. La intervención durará 12 meses, coincidiendo con la temporada de observación de la gripe (septiembre a agosto), y se tomarán medidas antropométricas, clínicas, bioquímicas y nutricionales antes de la intervención, a los 6 meses, al finalizar la intervención, así como a los 12 meses después de la finalización. Las medidas de incidencia de las infecciones se realizarán en el período de intervención.

4.2 Participantes

Los participantes serán personas entre 18 y 65 años de edad del municipio de Murcia (España), sin patologías diagnosticadas que afecten al sistema inmunitario, seleccionados a partir de los registros de usuarios de los centros de atención primaria del municipio de Murcia y que participarán de forma voluntaria en el estudio. Los centros hospitalarios de referencia serán el Hospital General Universitario Virgen de la Arrixaca, Hospital General Universitario Morales Meseguer y Hospital General Universitario Reina Sofía, correspondientes a las áreas I, VI y VII de salud de la Región de Murcia.

4.3 Criterios de inclusión y exclusión

Se seleccionará a aquellas personas que cumplan los siguientes criterios de inclusión:

- a) Personas entre 18 y 65 años de edad.
- b) Personas de ambos sexos.
- c) Empadronados en el municipio de Murcia (España).

- d) Usuarios de los centros de Atención Primaria del Servicio Murciano de Salud en el municipio de Murcia.

Los criterios de exclusión son los siguientes:

- a) Diagnóstico previo de enfermedad del sistema inmune.
- b) Menores de 18 años y mayores de 65 años.
- c) No firmar el consentimiento informado.

4.4 Cálculo del tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se calculará teniendo en cuenta la incidencia acumulada de la gripe en España en la temporada 2014-2015, que fue de 2.367 casos por cada 100.000 habitantes (2,367%). El cálculo se ha realizado mediante el procedimiento de diferencia de proporciones utilizando el software Epidat®. Para detectar como diferencia significativa una reducción de 1 punto porcentual en la incidencia acumulada se deben seleccionar 3.122 sujetos en cada grupo de intervención y en el grupo control, teniendo en cuenta que se aplicará la corrección de Yates, con un nivel de significación del 5% y una potencia estadística del 80%. Por lo tanto, en el estudio participarán un total de 9.366 personas, de los cuales 3.122 recibirán lactoferricina, 3.122 caseicina y 3.122 seguirán su dieta habitual sin suplemento de péptidos bioactivos.

4.5 Instrumentos y medidas

Datos sociodemográficos. Se aplicará, antes del inicio de la intervención, un cuestionario de datos sociodemográficos en el que se evaluará el sexo (hombre, mujer), la edad (años), el estado civil (soltero, casado-en pareja, separado-divorciado, viudo), el nivel de estudios (básicos/sin estudios, medios, superiores), ocupación (trabaja, desempleado, jubilado-pensionista). Además, se registrarán los hábitos tóxicos como tabaco (sí, no), alcohol (sí, no), y los hábitos de realización de ejercicio físico (sí, no).

Datos antropométricos y clínicos. Se realizará un examen antropométrico, consistente en la medición de la estatura (m) y el peso (kg), a partir de los cuales se calculará el índice de masa corporal (IMC) (kg/m^2). Se realizará también un examen clínico consistente en la evaluación de la presión arterial, midiendo la presión arterial sistólica (PAS) (mmHg) y presión arterial diastólica (PAD) (mmHg). También se llevará a cabo un análisis de sangre, del que se extraerán los siguientes valores: leucocitos (mil/mm^3), hemoglobina glicosilada (HbA1c) (mmol/mol), colesterol total (CT) (mg/dl), triglicéridos (TG) (mg/dl), lipoproteína de alta densidad (HDLc) (mg/dl), lipoproteína de baja densidad (LDLc) (mg/dl), así como los valores de los marcadores inflamatorios interleucinas 1 a 13 (IL-1, ..., IL-13) (pg/ml).

Datos nutricionales. La evaluación nutricional se llevará a cabo antes de la intervención, así como en cada una de las revisiones periódicas y en el seguimiento al año de finalización del estudio. Los participantes serán evaluados con un cuestionario de frecuencia alimentaria en el que se recogerán información sobre los alimentos de consumo habitual. El cuestionario será aplicado por un nutricionista. Se recopilarán datos sobre la ingesta de péptidos bioactivos derivados de la leche mediante el análisis de consumo de los productos lácteos contemplados en el cuestionario de frecuencia alimentaria.

Datos de infección: se registrará el diagnóstico de gripe (sí, no), enfermedad vírica gastrointestinal (sí, no), bronquitis (sí, no), neumonía (sí, no), herpes (sí, no), faringitis (sí, no), hepatitis (sí, no), tuberculosis (sí, no), meningitis (sí, no) y legionella (sí, no).

4.6 Variables

La variable independiente es Grupo: variable cualitativa (lactoferricina, caseidina, placebo).

La variable dependiente es la incidencia de enfermedades infecciosas:

- Gripe: variable dicotómica (sí, no)
- Enfermedad vírica gastrointestinal: variable dicotómica (sí, no)

- Bronquitis: variable dicotómica (sí, no)
- Neumonía: variable dicotómica (sí, no)
- Herpes: variable dicotómica (sí, no)
- Faringitis: variable dicotómica (sí, no)
- Hepatitis: variable dicotómica (sí, no)
- Tuberculosis: variable dicotómica (sí, no)
- Meningitis: variable dicotómica (sí, no)
- Legionella: variable dicotómica (sí, no).

Otras variables que se utilizan para controlar su efecto sobre la infección son:

- Sexo (hombre, mujer)
- Edad (años)
- Estado civil (soltero, casado-en pareja, separado-divorciado, viudo)
- Nivel de estudios (básicos/sin estudios, medios, superiores)
- Ocupación (trabaja, desempleado, jubilado-pensionista)
- Tabaco (sí, no)
- Alcohol (sí, no)
- Ejercicio físico (sí, no).
- Estatura (m)
- Peso (kg)
- IMC (kg/m^2)
- PAS: presión arterial sistólica, variable cuantitativa (mmHg)
- PAD: presión arterial diastólica, variable cuantitativa (mmHg).
- Leucocitos: leucocitos (mil/mm^3)
- HbA1c: hemoglobina glicosilada, variable cuantitativa (mmol/mol)
- CT: colesterol total, variable cuantitativa (mg/dl)
- TG: triglicéridos, variable cuantitativa (mg/dl)
- HDLc: lipoproteína de alta densidad, variable cuantitativa (mg/dl)
- LDLc: lipoproteína de baja densidad (mg/dl)
- IL-1,..., IL-13: interleucinas, variable cuantitativa (pg/ml).
- Péptidos bioactivos: ingesta de péptidos bioactivos, variable cuantitativa (dosis).

- Ingesta de lácteos: ingesta de productos lácteos con contenido de péptidos bioactivos (dosis).

4.7 Procedimiento de recogida de datos

Los cuestionarios de recogida de datos serán aplicados en el centro de atención primaria del lugar de residencia de los participantes (ver Anexo I). Los participantes serán convocados en grupos de 10 para la aplicación de los cuestionarios. La aplicación será llevada a cabo por una enfermera del centro de atención primaria que previamente habrá sido adecuadamente instruida. Se acondicionará una sala del centro para la recogida, con las adecuadas condiciones de luminosidad. La información de los cuestionarios será traspasada a una base de datos, realizándose una codificación para los datos personales que impidan la identificación del paciente por cualquier persona que no conozca dicho procedimiento, y que constará de un algoritmo basado en un código de centro, una fecha, la edad y el sexo. La persona responsable de la codificación de los datos personales garantizará la custodia y confidencialidad de los datos personales. Los datos del estudio serán volcados en una base inmediatamente después de cada recogida de datos para su posterior análisis estadístico.

4.8 Intervención

La intervención consistirá en la ingesta diaria por el grupo de lactoferricina durante los 12 meses de seguimiento de 1 gramo de lactoferricina bovina en 2 cápsulas de 500 mg cada una, por la mañana durante el desayuno y en la cena. El grupo de caseidina tomará 700 mg de este péptido en dos cápsulas de 350 mg, también por la mañana y por la noche. El grupo de control tomará una dosis de maltodextrina (fibra), un producto placebo, de 600 mg diarios en dos tomas por la mañana y por la noche. En lo demás, los participantes seguirán su dieta habitual.

Los investigadores estarán cegados a los tratamientos, por lo que no sabrán, en las sucesivas evaluaciones, los participantes que han sido incluidos en los diferentes grupos.

4.9 Análisis de los datos

El análisis estadístico de los datos se llevará a cabo con el software SPSS® de IBM®. Se realizará un estudio descriptivo univariante de todas las variables en cada grupo, calculando la media y desviación típica de las variables cuantitativas, así como la frecuencia y porcentaje de las variables cualitativas. Las variables cuantitativas se compararán mediante una prueba F de ANOVA simple, previa comprobación de los supuestos de normalidad de las distribuciones de frecuencias, o mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, en caso de que no se cumpla el supuesto de normalidad. Las variables cualitativas se compararán mediante la prueba chi-cuadrado. Se calculará la incidencia anual de las enfermedades infecciosas en cada grupo, comparando dicha incidencia mediante una prueba chi-cuadrado. Se calculará la odd ratio de padecer infección en el grupo control en comparación con los dos grupos de intervención. También se aplicará un análisis de supervivencia para el evento infección teniendo en cuenta el grupo. Por último, se aplicará un modelo predictivo de infección teniendo en cuenta la ingesta de péptidos bioactivos, la edad, el sexo, los hábitos tóxicos, la realización de ejercicio físico, así como los datos de la ingesta nutricional correspondientes a la ingesta de alimentos fuente de péptidos lácteos antimicrobianos. El nivel de significación utilizado será del 5%.

5 ASPECTOS ÉTICOS

La investigación será aprobada por los Comités Éticos de Investigación del Hospital General Universitario Virgen de la Arrixaca, Hospital Universitario Morales Meseguer y Hospital Universitario Reina Sofía, así como los órganos correspondientes de los centros de atención primaria participantes para su aprobación y conformidad.

El estudio cumplirá con los principios éticos de la Declaración de Helsinki para la experimentación con personas, aprobada por la Asociación Médica Mundial.

Los sujetos que participen en el estudio serán informados de los propósitos y procedimientos del estudio mediante una hoja de información al paciente (Anexo I). Seguidamente, para su participación, deberán firmar un consentimiento informado (Anexo II). Se garantizará la confidencialidad de los datos personales de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

El estudio se adscribe a la guía de Buena Práctica Clínica, una norma internacional de calidad ética y científica aplicable al diseño, realización, registro y comunicación de los ensayos clínicos en los que participen seres humanos, promulgada por la Conferencia Internacional de Armonización. También se ajustará a los principios de la Declaración de Helsinki en relación a la investigación Biomédica.

Se realizará una codificación de la identidad a través de un sistema de códigos con el fin de preservar la confidencialidad de la información sanitaria y personal de los participantes. La codificación será realizada y custodiada por un miembro específicamente designado para este fin del equipo investigador. Ninguna otra persona tendrá acceso a dicha información.

6 BENEFICIOS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Los beneficios para los participantes y la población de estudio en general consisten en una prevención posible de las enfermedades infecciosas, con el consiguiente aumento de la calidad de vida relacionada con la salud. También existe un beneficio para la comunidad en general derivado del menor uso de los recursos sanitarios, lo que implicará un menor coste económico y social.

La limitación más importante del estudio consiste en la imposibilidad de controlar la ingesta dietética de péptidos bioactivos que podría interferir en los

resultados. Para limitar este sesgo, se incorporarán a los análisis las evaluaciones dietéticas que indiquen ingesta de tales sustancias.

REFERENCIAS

1. Meisel H, Bockelmann W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Int J Gen Mol Microbiol* 1999;76(1-4):207-15.
2. Saito T, Nakamura H, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in gouda cheese. *J Dairy Sci* 2000;83:1434-40.
3. Korhonen H, Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des* 2003;9:1297-308.
4. FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 2004;134:980-8.
5. Mcdonagh D, Fitzgerald RJ. Production of caseinophosphopeptides (CPPs) from sodium caseinate using a range of commercial protease preparations. *Int Dairy J* 1998;8:39-45.
6. Vermeirssen V, Van CJ, Verstraete W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr* 2004;92:357-66.
7. Mohanty DP, Tripathy P, Mohapatra S, Samantaray DP. Bioactive potential assessment of antibacterial peptide produced by *Lactobacillus* isolated from milk and milk products. In *J Curr Microbiol Appl Sci* 2014;3:72-80.
8. Rival SG, Boeriu CG, Wichers HJ. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties Peroral calcium dosage of infants. *Acta Med Scand* 2001;55:247-55.
9. Gauthier SF, Pouliot Y, Maubois, JL. Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities. *Lait* 2006;86:99-125.
10. Pihlanto-Leppala A, Antila P, Mantsala P, Hellman J. Opioid peptides produced by in vitro proteolysis of bovine caseins. *Int Dairy J* 1994;41:291-301.

11. Christensen JE, Dudley EG, Pederson JA, Steele JL. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Int J Gen Mol Microbiol* 1999;76(1-4):217-46.
12. Gobbetti M, Minervini F, Rizzello CG. Angiotensin I converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int J Dairy Technol* 2004;57:172-88.
13. Najafian L, Babji AS. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *J Funct Foods* 2014;9:280-9.
14. McGregor RA, Poppitt SD. Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. *Nutr Metabol* 2013;10:46.
15. Nongonierma AB, FitzGerald RJ. The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. *J Funct Foods* 2015;17:640-56.
16. Martínez Agustín O, Martínez de Victoria Muñoz E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr Hosp* 2006;21(Suppl. 2):1-14.
17. Kitts DD, Weiler K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des* 2003;9:1309-23.
18. Meisel H, FitzGerald RJ. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des* 2003;9:1289-95.
19. Korhonen H, Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des* 2003;9:1297-308.
20. Mohanty DP, Tripathy P, Mohapatra S, Samantaray DP. Bioactive potential assessment of antibacterial peptide produced by *Lactobacillus* isolated from milk and milk products. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2014;3:72-80.
21. Lahov E, Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: caseicidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol* 1996;34:131-45.

22. Gobbetti M., Minervini F., Rizzello C. G. Bioactive peptides in dairy products In: Hui Y. H., editor. Handbook of food products manufacturing. John Wiley & Sons, Inc.; 2007. pp. 489-517.
23. Wakabayashi H, Takase M, Tomita M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Curr Pharm Des* 2003;9(16):1277-87.
24. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides from food proteins In: Hui Y. H., editor. Handbook of food products manufacturing. John Wiley & Sons, Inc.; 2007b. pp. 5–37.
25. Eliassen LT, Berge G, Sveinbjornsson B, Svendsen JS, Vorland LH, Rekdal O. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of Bovine lactoferricin. *Anticancer Res* 2002;22:2703-10.
26. Théolier J, Fliss I, Jean J, Hammami R. Milk AMP: a comprehensive database of antimicrobial peptides of dairy origin. *Dairy Sci. Technol.* 2013;94:181-93.
27. Sano H, Nagai H, Tsutsumi H, Kuroki Y. Lactoferrin and surfactant protein A exhibit distinct binding specificity to F protein and differently modulate respiratory syncytial virus infection. *Eur J Immunol* 2003;33:2894-902.
28. Yamamoto H, Ura Y, Tanemura M, Koyama A, Takano S, Uematsu J, et al. Inhibitory effect of bovine lactoferrin on human parainfluenza virus type 2 infection. *J Health Sci* 2010;56:613-7.
29. Pietrantonio A, Ammendolia MG, Superti F. Bovine lactoferrin: involvement of metal saturation and carbohydrates in the inhibition of influenza virus infection. *Biochem Cell Biol* 2012;90:442-8.
30. Oda H, Nakano M, Wakabayashi H, Yamauchi K, Toida T, Iwatsuki K, et al. Questionnaire survey on the subjective effects of Ig lactoferrin supplement. *Jpn J Complement Altern Med* 2012;9:121-8.
31. Vitetta L, Coulson S, Beck SL, Gramotnev H, Du S, Lewis S. The clinical efficacy of bovine lactoferrin/whey protein Ig-rich fraction (Lf/IgF) for the common cold: a double blind randomized study. *Complement Ther Med* 2013;21:164-71.
32. Gualdi L, Mertz S, Gomez AM, Ramilo O, Wittke A, Mejias A. Lack of effect of bovine lactoferrin in respiratory syncytial virus replication

- and clinical disease severity in the mouse model. *Antiviral Res* 2013;99(2):188-95.
33. Shin K, Wakabayashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Tamura Y, Kurokawa M, et al. Effects of orally administered bovine lactoferrin and lactoperoxidase on influenza virus infection in mice. *J Med Microbiol* 2005;54(8):717-23.
 34. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 2001;409(6823):1055-60.
 35. Xu M, Muto T, Yabe T, Nagao F, Fukuwatari Y, Okumura K. The relationship between the frequency of the common cold and the activities of natural killer cells. *Environ Health Prev Med* 2000;4:212-6.
 36. Kozu T, Iinuma G, Ohashi Y, Saito Y, Akasu T, Saito D, et al. Effect of orally administered bovine lactoferrin on the growth of adenomatous colorectal polyps in a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Cancer Prev Res* 2009;2:975-83.
 37. Kuhara T, Yamauchi K, Tamura Y, Okamura H. Oral administration of lactoferrin increases NK cell activity in mice via increased production of IL-18 and type I IFN in the small intestine. *J Interferon Cytokine Res* 2006;26:489-99.
 38. Superti F, Siciliano R, Rega B, Giansanti F, Valenti P, Antonini G. Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochim Biophys Acta* 2001;1528:107-15.
 39. McCann KB, Lee A, Wan J, Rogincki H, Coventry MJ. The effect of bovine lactoferrin and lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) and poliovirus to infect cell cultures. *J Appl Microbiol* 2003;95:1026-33.
 40. Ishikawa H, Awano N, Fukui T, Sasaki H, Kyuwa S. The protective effects of lactoferrin against murine norovirus infection through inhibition of both viral attachment and replication. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;434:791-6.

41. Arnold D, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantoni A, Valenti P, Seganti L. Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection. *Antiviral Res* 2002;53(2):153-8.
42. Johansson C, Jonsson M, Marttila M, Persson D, Fan X, Skog J, et al. Adenoviruses use lactoferrin as a bridge for CAR-independent binding to and infection of epithelial cells. *J Virol* 2007;81:954-63.
43. Marr AK, Jenssen H, Moniri R, Hancock REW, Panté N. Bovine lactoferrin and lactoferricin interfere with intracellular trafficking of herpes simplex virus-1. *Biochimie* 2009;91:160-4.
44. Shestakov A, Jenssen H, Nordström I, Eriksson K. Lactoferricin but not lactoferrin inhibit herpes simplex virus type 2 infection in mice. *Antivir Res* 2012;93:340-5.
45. Wakabayashi H, Kurokawa M, Shin K, Teraguchi S, Tamura Y, Shiraki K. Oral lactoferrin prevents body weight loss and increases cytokine responses during herpes simplex virus type 1 infection of mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68:537-44.
46. Birkemo GA, O'Sullivan O, Ross RP, Hill C. Antimicrobial activity of two peptides caseicidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *J Appl Microbiol* 2009;106(1):233-40.
47. Lahov E, Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Caseicidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol* 1996;34(1):131-45.
48. Zucht HD, Raida M, Adermann K, Magert HJ, Forssman WG. Casocidin-I: A caseína s₂-derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters* 1995;372(2-3):185-8.
49. Recio I, Visser, S. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine a s₂-casein. *Biochim Biophys Acta* 1999;1428 (2/3):314-26.
50. Migloire-Samour D, Floch F, Jolles P. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J Dairy Res* 1989;56(3):357-62.
51. Torres-Llanez MJ, Vallejo-Cordoba B, González-Córdova AF. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *ALAN* 2005;55(2):111-7.

52. Mohanty DP, Mohapatra S, Misra S, Sahu PS. Milk-derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. Saudi J Biol Sci 2016;23(5):577-83

Anexo I. Hoja de información en el estudio del papel preventivo de la ingesta de péptidos bioactivos lácteos sobre la infección

El propósito de esta hoja de información es proporcionar a los participantes en esta investigación con una clara explicación de la naturaleza de la misma, así como de su rol en ella como participantes.

La meta de este estudio es conocer el posible efecto preventivo de la ingesta de péptidos bioactivos derivados de la leche en la incidencia de enfermedades infecciosas.

Se realizará un estudio experimental prospectivo longitudinal con tres grupos: el grupo 1 recibirá un suplemento de lactoferricina; el grupo 2 recibirá un suplemento de caseidina; un tercer grupo recibirá un producto placebo (maltodextrina). El estudio durará 1 año.

La intervención administrada no produce efectos adversos sobre la salud. En todo caso se realizará un amplio examen nutricional, clínico y bioquímico con el fin de descartar la participación de aquellas personas no aptas para recibir los tratamientos.

Si usted accede a participar en este estudio, se le informa de que los datos recopilados serán tratados de forma anónima y confidencial, y que dicha información será usada únicamente con fines investigadores. La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. Su participación será codificada usando un número de identificación y, por lo tanto, será anónima. Una vez analizado el caso, los archivos con las grabaciones se destruirán.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma.

Anexo II. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DE ENSAYOS CLÍNICOS, PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS GENÉTICOS

(Versión y fecha del CI)

TÍTULO DEL ESTUDIO:

CÓDIGO DEL PROMOTOR:

PROMOTOR:

INVESTIGADOR PRINCIPAL *(Médico del estudio, si excepcionalmente se trata de otro profesional se debe indicar. Incluir nombre, servicio y teléfono):*

CENTRO:

Yo, *(nombre y apellidos),*

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con: *(nombre del investigador).*
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio *(si se recogen muestras, añadir:)* y solicitar la destrucción de mi muestra, siempre y cuando no haya sido anonimizada:

Cuando quiera.

Sin tener que dar explicaciones.

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

- Comprendo que, si decido retirarme del estudio, los resultados obtenidos hasta ese momento podrán seguir siendo utilizados *(si se recogen muestras, añadir:)* pero que no se realizarán nuevos análisis de mi muestra, siempre y cuando no haya sido anonimizada.

En el caso de que los resultados de la investigación proporcionen datos que me puedan interesar a mí o a mis familiares: *(indicar una de las casillas)*

- Quiero ser informado.
- No quiero ser informado, pero acepto que mi médico contacte con mis familiares si dichos resultados les pueden afectar.

Comprendo que tengo los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición a mis datos de carácter personal de acuerdo con lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información al paciente.

(En caso de solicitar muestras para el proyecto, y tener previsto almacenarlas para otros estudios, deberá incluir el siguiente párrafo, ofreciendo al participante una o varias de las siguientes opciones, de acuerdo con la información facilitada en la hoja de información)

Al término de la investigación mi muestra podrá ser:

Destruída

Anonimizada

Incorporada en una colección cuyo responsable es el investigador *(indicar nombre completo del investigador responsable de la colección)*, que se encuentra en *(indicar lugar)*, para continuar ser utilizada en el estudio de *(indicar la línea de investigación)*.

Almacenada en el biobanco *(indicar cuál)* para poder ser utilizada en otras investigaciones, posiblemente no relacionadas con el estudio inicial para el cual consintió.

Firma del paciente: Firma del investigador:

Nombre: Nombre:

Fecha: Fecha: