**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**SECCIÓN A: DATOS GENERALES**

**1.- TÍTULO O NOMBRE DEL PROYECTO:**

Detección de mutantes en la región Pre-core del virus hepatitis B en pacientes con serología HBsAg+ y HBeAg-

**2.- Línea de investigación:**

Biología Molecular

**3.- Unidad Académica (Área):**

Laboratorio de Biología Molecular, Citogenética y Reproducción Asistida

Centros de Salud

Universidad Privada Antenor Orrego

**4.-** **Equipo Investigador:**

**Investigador principal:**

Dr. Pedro Mercado Martínez

Docente Auxiliar tiempo parcial Facultad Medicina Humana

Biólogo investigador Laboratorio de Biología Molecular, Citogenética y Reproducción Asistida.

**Co-Investigador:**

Blgo. Ruth Elizabeth Castillo Díaz

Biólogo Laboratorio de Biología Molecular, Citogenética y Reproducción Asistida.

**5.-** **Institución o lugar donde se ejecutará el proyecto:**

Laboratorio de Biología Molecular, Citogenética y Reproducción Asistida

Centros de Salud

Universidad Privada Antenor Orrego

**6.- Duración de la Ejecución del proyecto**

**Fecha de Inicio:** Enero 2018

**Fecha de término:** Diciembre 2018

**SECCIÓN B: PLAN DE INVESTIGACIÓN**

**1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

¿Cuál es la frecuencia de mutaciones en la región Pre-core del virus de la hepatitis B en pacientes con serología HBsAg+ y HBeAg-?

**2.- ANTECEDENTES DEL PROBLEMA**

El virus de la Hepatitis B (VHB) es considerado una de las principales causas de daño hepático fulminante, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular; además, por su alta incidencia y gravedad de la enfermedad es considerado en la actualidad la novena causa de muerte en el mundo. Se reportan 2 billones de personas infectadas y alrededor de 350 millones que evolucionan hacia la cronicidad, estas cifras pudieran considerarse aún más alarmantes si tenemos en cuenta que en los países en vías de desarrollo, estos datos estadísticos son menos fidedignos por las propias características inherentes al virus, el cual es considerado 100 veces más infectivo que el HIV y se ha detectado que puede sobrevivir en muestras de sangre seca, expuestas durante una semana1.

El VHB presenta la tasa de mutación más alta entre los virus ADN que infectan al hombre. En el curso natural de la enfermedad aparecen mutaciones en el virus como la doble mutación (A1762T/G1764A) en la región pre-Core que codifica para HBeAg, que aumentan la virulencia y están asociadas a hepatitis crónica, cirrosis y hepatocarcinoma2. La existencia de estos mutantes tiene importantes implicaciones clínicas2. se ha demostrado que los mutantes pre-Core provocan una inflamación hepática más agresiva y, en algunos casos, una insuficiencia hepática aguda, además de asociarse con resistencia al tratamiento con interferón alfa, una mayor probabilidad de pérdida del injerto después de un trasplante de hígado e incluso con el desarrollo de hepatitis fulminante. Además embargo, también se han encontrado en portadores asintomáticos3.

Se reporta que la prevalencia de mutantes pre-Core se expresa en 7-30%4. Estudios realizados en Irán determinaron que el 55% de los pacientes con hepatitis B crónica es provocado por virus mutantes. Así también, se ha demostrado que una cuarta parte de la enfermedad hepática crónica relacionada con hepatitis B, se debe a virus mutante en la región pre-Core (15,5%) o mutante de la región de superficie (10,8%). Se sugiere que la Guanina cambia a Adenina en el nucleótido 1896 del genoma del VHB en pacientes con enfermedad hepática crónica5. Estudios en España, determinaron que el 75% de pacientes con hepatitis B crónica presentan virus mutantes en la región pre-Core, core o en ambas y que el 37% de los pacientes estudiados, mostraron mutaciones de resistencia al tratamiento antiviral6.

En Brasil, al hacer el análisis de las secuencias BCP y precore / core en 54 muestras, se reportó que la mutación precore G1896A fue la más frecuente (55,6%), seguida de la doble mutación BCP A1762T/G1764A (40,7%), mutación del BCP T1753V (33,3%) y mutaciones de la región pre-Core G1899A (26%) y G1862T (20,4%). Todas las muestras identificadas como mutantes pre-core G1896A tenían una timina (T) en la posición 18587. En Colombia, al estudiar muestras de donantes de sangre con HBsAg positivo y HBeAg negativo y su relación con las mutantes pre-Core y PBC y su posible asociación con la progresión de la Hepatitis B; se reportó que el 19% de las muestras analizadas estaban asociadas a mutaciones en el gen pre-Core en las posiciones G1896A y la doble mutación T1762A/G1764A8.

Se ha demostrado que las mutaciones en la región pre-Core afectan a la replicación y pueden aumentar la agresividad del virus produciendo mayor daño hepático, habiéndose identificado genotipos mutantes que están vinculados a los resultados clínicos graves y resistencia a las drogas9. En Sudamérica, el Perú es considerado como área de endemicidad intermedia para el VHB con prevalencias promedio de 1-2 % para el HBsAg y 20-30 % para anti-HBcAg10. No obstante tiene zonas de alta, baja e intermedia endemicidad, debido a la intensa migración que caracteriza a nuestro país11. Esto demuestra que la prevalencia de la hepatitis B varía de acuerdo a las diferentes regiones geográficas, localidades, hábitat y los grupos de población distribuidas en dichas regiones12.

**3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

La multiplicación del virus de la hepatitis B (VHB) está ligada a la generación de “cuasiespecies” genómicas en virtud de la intervención de una transcriptasa inversa en la replicación del DNA viral; la ineficacia con que esta enzima escinde los nucleótidos que inserta incorrectamente en el DNA durante la retrotranscripción posibilita que el VHB exhiba una plasticidad genómica inusual para un virus DNA; prueba de ello es la existencia de no menos de 9 subtipos. Junto a estas variantes, no exentas de interés patogénico, la literatura se viene ocupando de los denominados mutantes del VHB, los cuales, si bien se generan espontáneamente durante el curso de la infección natural por el VHB, lo hacen con especial frecuencia y eficacia en un ambiente de presión selectiva, propiciado por el uso de las inmunoprofilaxis activa y pasiva y el tratamiento antiviral13.

La mayoría de las mutaciones no acarrean cambios de la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente, por lo que carecen de relevancia clínica; sin embargo, han sido halladas cepas del VHB particularmente virulentas (mutantes pre-core o core), resistentes a ciertos análogos nucleósidos inhibidores de la síntesis del DNA viral como la lamivudina y el famciclovir (mutantes en el gen P, que codifica la polimerasa viral), especialmente vinculadas al desarrollo de hepatocarcinoma (mutantes en el gen X) y en cepas capaces de eludir la respuesta inmunitaria humoral específica frente al virus (mutantes en el gen S). Estos virus pueden infectar a individuos vacunados o tratados con gammaglobulinas específicas, causar reinfecciones y rebrotes en el marco de una hepatitis B crónica y que pueden pasar inadvertidos a las pruebas que detectan el HBsAg13.

En el Perú, la detección de VHB se basa en la determinación serológica de HBsAg y Anti-HBc pero no se tiene en cuenta las diversas cepas mutantes del virus, especialmente a nivel de la región pre-Core, que tiene un comportamiento serológico diferente, que pueden convertir al huésped en portadores crónicos con una alta probabilidad de desarrollar cirrosis y hepatocarcinoma a corto plazo. Considerando, entonces, que en nuestro medio no existe data de mutaciones del VHB, surge la necesidad de investigar la prevalencia de estas, principalmente las mutaciones pre-Core, cuya serología es HBsAg+ y HBeAg-.

**4. OBJETIVOS**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Objetivo General  (Propósito del proyecto ) | | Resultados Finales | Medios de Verificación |
| Detectar mutantes en la región pre-core del virus hepatitis B en pacientes con serología HBsAg+ y HBeAg-. | | **R1:** Reporte de mutaciones en la región pre-Core del virus de la hepatitis B. | **MV1:** Comparación de la secuencia de los pares de bases de los productos amplificados con la data publicada en el Gen Bank para analizar si existe o no mutaciones. |
| Objetivos Específicos  (Componentes) | | Resultados Intermedios: | Medios de Verificación |
| 1 | 1. Establecer la frecuencia de los diversos tipos de mutantes de la región pre-core. 2. Establecer la significancia estadística entre los diversos tipos de mutantes aislados. | **P1**: Porcentajes de frecuencia de las mutaciones encontradas. | **MV1:** Mediante análisis estadístico. |
| **P2:** Diferencias significativas entre las mutaciones encontradas. | **MV2:** Mediante análisis estadístico. |

**5. MARCO TEÓRICO**

La hepatitis B es una infección potencialmente mortal causada por el virus de la hepatitis B (VHB). Constituye un importante problema de salud a nivel mundial, considerando que aproximadamente 350 millones de personas alrededor del mundo son portadores crónicos del virus5. Este virus puede llegar a causar hepatopatía crónica y conlleva un alto riesgo de muerte por cirrosis y cáncer hepático6,14. El VHB, es un hepadnavirus con ADN de cadena doble de aproximadamente 3200 nucleótidos15, el cual se replica a través de un RNA intermediario mediante transcripción reversa16 y que presenta cuatro promotores, dos regiones potenciadoras y cuatro marcos de lectura abierta (ORF) superpuestos entre sí: S, C, P, y X. Estos ORF contienen a los genes que codifican para las proteínas de la envoltura viral, la proteína de la cápside, el antígeno e (HBeAg), la polimerasa y la proteína X17,18.

Este virus realiza su replicación en el individuo infectado mediante la intervención de una transcriptasa reversa; esta enzima al no catalizar correctamente la escisión de los nucléotidos que inserta incorrectamente en el ADNc durante la retrotranscripción, posibilita que el VHB exhiba variaciones genómicas inusuales para un virus ADN19. Esto se verifica al encontrar en los últimos años cepas mutantes del VHB que pueden tener consecuencias importantes en la infección por dicho virus, capaces de producir hepatitis crónica B (HCB), e incluso hepatocarcinoma (HCC)20. También pueden causar problemas en la detección del antígeno de superficie (HBsAg), aun con métodos altamente sensibles y específicos 9; pero si el virus ha sufrido una mutación en le región pre-Core, el antígeno no reacciona dando por ende falsos negativos.

La mutación pre-Core (G1896A, C1653T) y delecciones en la región pre-S, se asocian con la progresión de la enfermedad hepática, incluyendo cirrosis y carcinoma hepatocelular21. La prevalencia de mutantes pre-Core se ha expresado en un 7-30%4. Estudios realizados en Irán determinaron que el 55% de los pacientes con hepatitis B crónica es provocado por virus mutantes. Así también, se ha demostrado que una cuarta parte de la enfermedad hepática crónica relacionada con hepatitis B, se debe a virus mutante en la región pre-Core o mutante de la región de superficie. Estudios preliminares sugieren que en la mutación del nucleótido 1896, la Guanina cambia a Adenina y que está relacionada con pacientes que tienen enfermedad hepática crónica5.

Se ha demostrado que las mutaciones en la región pre-Core afectan a la replicación y pueden aumentar el daño hepático al aumentar la agresividad del virus. Recientemente se han identificado genotipos mutantes que están vinculados a la resistencia de drogas y la inmunotrapia9. Por lo tanto, la identificación de estos mutantes virales, asociadas con el desarrollo de una enfermedad hepática grave, incluyendo hepatocarcinoma, es de vital importancia. El antígeno de superficie (HBsAg) es el marcador de laboratorio más importante en el diagnóstico de la hepatitis B, tanto aguda como crónica; es un marcador de infección y en combinación con otros marcadores permite determinar si el paciente cursa con una infección aguda, crónica, resuelta o ha sido satisfactoriamente vacunado o tratado.

La presencia del *antígeno e* (HBeAg), codificado en la región pre-core, indica replicación activa del virus. Su ausencia no descarta la presencia del virus, por eso se pueden encontrar formas de hepatitis B crónica HBeAg- (mutantes de la región core-precore). Los pacientes que son seropositivos para *antígeno e*, tienen replicación viral activa asociados con enfermedad hepática. Este marcador, se identifica por métodos serológicos como el ELISA o por radio inmunoensayo (RIA)22. Sin embargo, a pesar que el diagnóstico serológico del VHB es el más completo: HBeAg, HBsAg, IgM-anti-HBc, anti-HBc, antiHBe y anti-HBs, el PCR es más sensible y específico porque detecta directamente el material genético del virus. Esto hace que mediante el PCR se pueda detectar los mutantes del HB con serología negativa al HBsAg y al HBeAg23,24.

En el caso de los pacientes con hepatitis B y con serología negativa al HBsAg, se sugiere que las principales causas son: la presencia de complejos inmunes (anti-HBs-HBsAg), mutaciones en la región S y pacientes con coinfección por otros virus como de la hepatitis C25. Y para los pacientes con HBeAg- se explica por los dos tipos de mutaciones que pueden ocurrir: unas presentes en la región pre-Core y otras en el promotor core. Las mutaciones en la región pre-Core se relacionan con la posición 1896 con el cambio de una guanina por una adenina que genera un codón de stop y por lo tanto no se traduce el HBeAg24. Las mutaciones en el promotor core se refieren a cambios de bases que se localizan entre los nucleótidos del 1570 al 1770 del genoma. Estas mutaciones se asocian con una disminución del HBeAg y un incremento de la replicación viral23, 24.

El uso de las tecnologías de punta, como el PCR, permite identificar cualquier mutación del microorganismo en un período de tiempo breve, además que los resultados tienen alta precisión y especificidad. Otra ventaja del diagnóstico molecular en comparación con el diagnóstico serológico es que mediante este método podemos valorar con mayor certeza la respuesta al tratamiento26. El desarrollo en los últimos años de las denominadas tecnologías de secuenciación masiva permite actualmente obtener millones de secuencias de ADN a una velocidad sin precedentes y a un coste cada vez más reducido27. Estas tecnologías están permitiendo la consecución de logros científicos trascendentales, con la identificación de nuevos genes y la resolución de las bases genéticas28,29.

Se ha reportado que en el Perú se presenta una prevalencia de 1 a 2% para antígeno de superficie (HBsAg) y de 20-30% para anticuerpos contra HBsAg del virus de la Hepatitis B (VHB). La prevalencia de la hepatitis B varía de acuerdo a las diferentes regiones geográficas, localidades, hábitat y los grupos de población distribuidas en las diversas áreas geográficas12; sin embargo, en nuestro medio no existe data de mutaciones HBeAg, es por ello que surge la necesidad de investigar la prevalencia de mutaciones pre-Core y su relación con el HBeAg.

**6. HIPÓTESIS**

IMPLICITA

**7. METODOLOGÍA**

**7.1. CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION**

**Criterios de Inclusión:**

1. Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado para donar muestra.
2. Pacientes con pruebas serológicas que evidencien actividad replicativa del virus (HBsAg+ y HBeAg-)
3. Pacientes con hepatitis B crónica
4. Pacientes que no estén en tratamiento retroviral.

**Criterios de exclusión:**

1. Pacientes con HIV.
2. Pacientes con otras enfermedades por virus hepatotrópicos como Hepatitis C o coinfección  con Hepatitis D.

**7.2 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA:**

Se obtendrá sangre venosa (aproximadamente 5mL) de 50 donantes con serología HBsAg+ y HBeAg- con un sistema de extracción al vacío Vacuette®, luego se centrifugará para la obtención de suero y será almacenada a -20 °C en una congeladora vertical Thermo Scientific – Revco hasta su uso; Los donantes, firmarán una carta de Consentimiento Informado, así mismo se le entregará de manera personal el resultado de su análisis.

Se trabajará con un suero patrón positivo HBsAg+ y HBeAg+

**7.3 AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN LA CADENA POLIMERASA (PCR):**

**7.3.1 EXTRACCIÓN DEL ADN VIRAL:**

El proceso de identificación se iniciará con la extracción de ADN del suero de la sangre de los donantes usando el innuPREP Blood DNA Mini Kit. Se seguirán las instrucciones del fabricante y el ADN extraído se almacenará a -20°C.

**7.3.2 DETECCIÓN DEL ADN VIRAL MEDIANTE PCR ANIDADO:**

Se realizará una primera PCR con el primer par RMD 26 con la secuencia 5'-ATG GAG ACC ACC GTG AAC-3' (nt. 1608-1625) y con el Ci 1 con la secuencia 5'-TTC CGG AGA CTC TAA GGC-3' (nt. 2038-2020), para amplificar la región pre-core y core. La segunda amplificación con el par de cebadores RMD 26 y PC 1 con la secuencia 5'-GGA GAA AAG AAG TCA GGC-3 '(nt. 1974 a 1957), para amplificar solo la región pre-core. Para el proceso de amplificación se usará Taq Polimerasa de la marca Invitrogen.

**7.2.3 ELECTROFORESIS:**

Se utilizará 10 µl de los productos PCR en gel agarosa al 2% con Safe-Green, a un voltaje de 120 V por 45 minutos, luego se analizarán las bandas de 367 pares de base visualizadas en el transiluminador UV.

**7.2.4 SECUENCIAMIENTO:**

Se utilizará el par de cebadores RMD 26 y PC 1 para amplificar el ADN de interés para su secuenciación. Los criterios de secuenciación serán determinados por un laboratorio especializado.

**7.4 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS:**

El registro de datos que estarán consignados en las correspondientes hojas de recolección de datos, serán procesados utilizando el paquete estadístico SPSS Vers. 22.0, los que luego serán presentados en cuadros de entrada simple y doble, así como gráficos de relevancia y que servirán para determinar la frecuencia de mutantes aislados y establecer la significancia entre los diversos tipos de mutantes aislados.

**8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Lavanchy D. Hepatitis B epidemiology, disease burden, treatment and current and emerging prevention and control measures. J Viral Hepat. 2004;11(2):97-107.
2. Ma XY, Han T, Pei YZ, Zhao ZG, Gao YT, Li Y, Jing L. Analysis of the relationship between hepatitis B virus precore and basal core promoter mutations and acute-on-chronic liver failure. Zhonghua an Zang Bing Za Zhi. 2012 Sep;20(9):644-8. doi: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2012.09.002. Chinese. PubMed PMID: 23207226.
3. Parque YM. Clinical utility of complex mutations in the core promoter and proximal precore regions of the hepatitis B virus genome. J Hepatol. 2015 27 de enero; 7 (1): 113 - 20. doi: 10.4254 / wjh.v7.i1.113.
4. Funk ML., Rosenberg DM., Lok AS., 2002. World-widw epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. J Viral Hepat. 9:52-61
5. Moradi A., Zhand S, Ghaemi A., Javid M., Tabarraei H., 2015. Correlation Between Hepatitis B G1896A Precore Mutations and HBeAg in Chronic HBV Patients. *Jundishapur Journal of Microbiology. 8(2)*: e17126.
6. Gutiérrez A., Viciana I., Rius F., y Pinedo A. 2012. Mutaciones de la región precore, promotor basal del core y polimerasa viral en pacientes con hepatitis B crónica. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. *30(2):*70-74. Doi:10.1016/j.eimc.2011.08.008
7. Martins Almeida de Mello Flávia, Oba Kuniyoshi Aline, Fanhani Lopes André, Soares Gomes-Gouvêa Michele, Armando Bertolini Dennis. Hepatitis B virus genotypes and mutations in the basal core promoter and pre-core/core in chronically infected patients in southern Brazil: a cross-sectional study of HBV genotypes and mutations in chronic carriers. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.47 no.6 Uberaba Nov./Dec. 2014. http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0158-2014
8. Martínez de Rodriguez Luzmila, Manascero-Gómez Aura Rosa, Jaramillo Tobón Antonio Carlos. Precore mutant detection of HBeAg in blood donors from Bogota, D.C., Colombia, through serological profile of the virus. Current Laboratory Journal. Vol. 2015, No. 46, Págs 21 – 25.
9. Consensus Report. 2004. Diagnostic problems caused by HBsAg mutants – a Consensus Report of an Expert Meeting. *Intervirology.;* *47*:310-3.
10. Cubides V, Suárez C, Quintero P. Epidemiología e historia natural de la hepatitis B. Rev Col Gastroenterol. 2009; 24(1):4-12.
11. Cabezas C, Suárez M, Romero G, Carrillo C, García M, Reátegui J, et al. Hiperendemicidad de hepatitis viral B y Delta en pueblos indígenas de la Amazonía peruana. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2006;23(2):114-22
12. Segovia G., Galván K., García V., Huamaní L., Gotuzzo E. 2002. Prevalencia De Marcadores Serológicos para Hepatitis B y Delta e Infección Intrafamiliar en el Valle Del Río Pampas, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública; 19 (2).
13. Navarro D, Esparcia O y Granda S. Mutantes del virus de la hepatitis B en el gen S. Hospital Clínico Universitario de Valencia. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/Mutavhb.pdf>. Recuperado el 26/09/2017.
14. Organización Mundial de la Salud. 2016. *Hepatitis B.* http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/es/ Recuperado el 30/08/2016.
15. Zhang Z., Wu X., Chen X., Li J., Li M. 2016. Prolonged suppression of HBV in mice by a novel antibody that targets a unique epitope on hepatitis B surface antigen.GUT. *PubMed. Gob. Apr;65(4):*658-71. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308964
16. Sánchez O. Laura, Panduro C. Arturo. 2005. Virus de la Hepatitis C. Investigación en Salud en línea, VII (marzo): [Fecha de consulta: 6 de agosto de 2017. Disponible en:<http://148.215.1.176/articulo.oa?id=14270104> ISSN 1405-7980
17. Sánchez Orozco, Laura Verónica; Panduro Cerda, Arturo. Genómica y proteómica del virus de la Hepatitis B. Investigación en Salud, vol. VII, núm. 1, marzo, 2005, pp. 12-18. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Guadalajara, México
18. Locarnini S., McMillan J., Bartholomeuz A. The hepatitis B Virus and common mutants. Semin Liver Dis 2003; 23:5-20.
19. Thakur V, Kazim S, Guptan R, Hasnain S, Bartholomeusz A, Malhotra V, et al. 2005. Transmision of G145R mutant of HBV to an unrelated contact. *J Med Virol*.; *76*:40-6
20. Liu C, Chen B, Chen P, Lai M, Huang W, Kao J, y col. 2006. Role of Hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *J Infect Dis.; 193*:1258-65
21. Chu C., Lin C., Lin S., Lin D., Liaw Y. 2012. Viral load, genotypes, and mutants in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: special emphasis on patients with early hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis. Sci., 57 (1)*, pp. 232–238.
22. Guevara C., Peñaloza C., Páez O., Meisel Ch. Diagnóstico de la hepatitis B. Rev Col Gastroenterol. 2009, vol.24, suppl.1, pp.13s-20s.
23. Chu CJ., Keeffe EB., Han SH., Perrillo RP., Min AD., Soldevila-Pico C., y col., 2003. The US HBV epidemiology study group. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepatology; 38*:619-28
24. Parekh S., Zoulim F., Ahn SH., Tsai A., Li J., Shigenobu K., y col., 2003. Genome replication, virion secretion, and c antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. J Virol; 77(12)6601-12.
25. Cacciola I., Pollicino T., Squadrito G., Cerenzia G., Orlando ME., Raimondo G., 1999. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med; 34(1):*22-26
26. Feld J., Lee J., Locarnini S., 2003. New targets and possible new therapeutic approaches in the chemotherapy of chronic hepatitis B. *Hepatology. 38(3):*545-53
27. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010;11:31–46.
28. Tucker T, Marra M, Friedman JM. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. Am J Hum Genet. 2009;85:142–54.
29. Stein LD. The case for cloud computing in genome informatics. Genome Biol. 2010;11:207.

**SECCIÓN C: CRONOGRAMA DE INVESTIGACIÓN:**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ACTIVIDAD** | | **MESES** | | | | | | | | | | | |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** |
| **1** | Revisión Bibliográfica | **X** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| **2** | Recolección De Datos |  | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** | **X** |  |  |  |
| **3** | Procesamiento y Análisis de Resultados |  |  |  |  |  |  |  |  |  | **X** |  |  |
| **4** | Elaboración de Informe Final |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | **X** | **X** |

**SECCIÓN D: PRESUPUESTO DEL PROYECTO:**

|  |  |
| --- | --- |
| **Partida presupuestaria** | **Monto (S/.)** |
| Equipos y bienes duraderos | 0 |
| Recursos humanos (hasta un 20% del presupuesto) | 3900.00 |
| Materiales e insumos | 7651.04 |
| Pasajes y viáticos | 2350.00 |
| Servicios tecnológicos | 5500.00 |
| **TOTAL** | **19401.04** |

**CUADRO Nº 1: Equipos y bienes duraderos (adjuntar proformas)**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Equipos y bienes duraderos** | **Especificaciones técnicas** | **Proforma (fecha)** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** |

**CUADRO Nº 2: Recursos Humanos - Valorización del equipo Técnico**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nombre** | **Escuela o Unidad a la que pertenece** | **% de dedicación** | **Honorario mensual**  **S/.** | **Nº de meses** | **Costo total S/.** |
| **Estadístico** | Externo |  | 1500.00 | 1 | 1500.00 |
| **Consulta a especialistas** | Externo |  | 800.00 | 3 | 2400.00 |
| **TOTAL** |  |  |  |  | **3900.00** |

**CUADRO Nº 3: Material e insumos (adjuntar proformas)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario S/.** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| Caja de guantes de nitrilo Nilife | 21.80 | 15 | 327.00 |
| Mascarillas descartables, caja x 50 | 5.50 | 1 | 5.50 |
| Gorros desechables Nilife, caja x 100 | 10.00 | 1 | 10.00 |
| Tips 0.1-10 ul con filtro estéril. Caja x 96 unidades. | 50.00 | 6 | 300.00 |
| Tips 10-100 ul con filtro estéril. Caja x 96 unidades. | 50.00 | 6 | 300.00 |
| Tips 100-1000 ul con filtro estéril. Caja x 96 unidades. | 50.00 | 10 | 500.00 |
| Papel aluminio Alu Folie Kartong | 15.00 | 1 | 15.00 |
| Microtubo 1.5 ml. Paquete x 500 | 41.00 | 1 | 41.00 |
| Microtubo 0.2 ml. Brand. Cj x 1000 | 180.54 | 1 | 180.54 |
| Microtubo 0.5 ml. Brand. Cj x 1000 | 186.44 | 1 | 186.44 |
| Tubo vacutainer con gel separador de 5ml, paquete x 100 unidades | 65.00 | 1 | 65.00 |
| Aguja para extracción al vacío 21G x 1 1/2" Caja x 100 | 46.00 | 1 | 46.00 |
| Liga para toma de muestra de sangre | 2.00 | 1 | 2.00 |
| Adaptador para sistema al vacío VACUTAINER (Standard holder) | 5.00 | 2 | 10.00 |
| Kit de extracción de ADN: InnuPrep Blood DNA Mini Kit x 50 rx | 585.92 | 2 | 1171.84 |
| Kit para diagnóstico de antígeno HBeAg del VHB x 100 Rx | 280.00 | 1 | 280.00 |
| Taq PCR Master Mix, 200 Rx | 800.00 | 1 | 800.00 |
| Marcador de peso molecular 100 BP DNA 50 UG. | 377.60 | 1 | 377.60 |
| Marcador de peso molecular 50 BP DNA 50 UG | 377.60 | 1 | 377.60 |
| SYBR SAFE DNAgel Stain o Safe-Green, vial x 1ml | 505.30 | 1 | 505.30 |
| TAE, 50X 1000ML | 330.40 | 1 | 330.40 |
| Agarosa grado Biología Molecular para electroforesis de ADN. Frasco x 500Gr | 883.82 | 1 | 883.82 |
| Tubos Falcon de 15ml c/tapa rosca. Pack x 50 und | 40.00 | 1 | 40.00 |
| Buffer Fosfato Sódico (PBS) | 196.74 | 1 | 196.74 |
| Agua Grado Biología Molecular. Fco. x 1L | 504.86 | 1 | 504.86 |
| Primer RMD 26 | 64.80 | 1 | 64.80 |
| Primer Ci 1 | 64.80 | 1 | 64.80 |
| Primer PC 1 | 64.80 | 1 | 64.80 |
| **TOTAL** |  |  | **7651.04** |

**CUADRO Nº 4: Pasajes y viáticos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| Transporte domicilio – Laboratorio - domicilio | 2.00 | 300 | 600.00 |
| Transporte recolección de muestras: Hospital Alta Complejidad – La Esperanza - UPAO | 3.00 | 50 | 150.00 |
| Transporte nacional para llevar muestras a secuenciar: Trujillo – Lima - Trujillo | 200.00 | 4 | 800.00 |
| Viáticos | 200.00 | 4 | 800.00 |
| **TOTAL** |  |  | **2350.00** |

**CUADRO Nº 5: Servicios tecnológicos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo unitario** | **Cantidad** | **Costo total S/.** |
| **Análisis especializado (Secuenciamiento de productos PCR para análisis de mutaciones)** | 80.00 | 50 | 4000.00 |
| **Publicación en revista científica indexada** | 1500.00 | 01 | 1500.00 |
| **TOTAL** |  |  | **5500.00** |