

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

DESARROLLO DE UN TEST PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA

Bechelli, Maria Lucila – LU 1019598

Licenciatura en Biotecnología

Brie, Belén – LU 1019391

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Panero, Julieta, UADE

Colaborador/es:

Martinez, Damián, UADE

Agosto 19, 2014



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

1. Resumen

Este proyecto busca traer al mercado Argentino un producto innovador y eficaz: un kit para la medición de la longitud telomérica. Los telómeros son regiones de ADN no codificante que se encuentran ubicados en los extremos de los cromosomas lineales, cuya función principal está asociada a la estabilidad estructural de los cromosomas en las células eucariotas, la división celular y el tiempo de vida de las estirpes celulares.

Numerosos estudios científicos han probado la correlación entre la longitud telomérica y diferentes tipos de cáncer en humanos (Wentzensen IM *et al*, 2011), obesidad (Zannolli *et al*, 2008), y patologías asociadas a la edad entre las que se destacan enfermedades cardiovasculares (Willeit *et al*, 2010), y envejecimiento (Cawthon RM, 2002). Además, se sabe que la longitud de los telómeros se asocia al estilo de vida en individuos sanos (Puterman *et al*, 2010; Epel *et al*, 2004) La venta de nuestro producto **TeloLength®** implica la disponibilidad de este ensayo en laboratorios del país, y el acceso a esta información relevante para la salud.

Con **TeloLength®**, el cliente tendrá la posibilidad de contar con los reactivos necesarios, con excepción de la enzima taq polimersa, para realizar la medición mediante una técnica denominada PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). La principal ventaja que ofrecemos es la compatibilidad de nuestros reactivos, con todos los equipos de qPCR presentes en el mercado. De esta forma, no limitamos nuestro público meta a los usuarios de un aparato en particular. Uno de los componentes esenciales de nuestro kit es el agente intercalante EvaGreen®, del laboratorio Biotium. Se han realizado negociaciones con el mismo, para comprar la patente de su producto EvaGreen®, y utilizarlo como método de cuantificación en tiempo real.

Nuestra fuente de ingreso será la venta directa del kit a las instituciones interesadas (laboratorios y centros de salud). La compra se realizará por teléfono o internet, y se ofrecerá envío gratuito. Asimismo los esfuerzos de comunicación estarán estratégicamente orientados a aquellas instituciones a las cuales les puede resultar de gran utilidad, y a los médicos que si bien no compraran en forma directa nuestro producto, serán quienes indiquen la realización del ensayo a los pacientes que consideren adecuados para el estudio de longitud telomérica.

Con el fin de comenzar el emprendimiento, se deberá realizar una inversión inicial de \$1.078.651,83 que será financiada en su totalidad con un préstamo del Banco Credicoop (TNA 17%). Se realizó una proyección a cinco años en tres escenarios: pesimista, moderado y optimista, para los que se obtuvieron los siguientes resultados:

✓ Escenario pesimista, el VAN a cinco años es de \$1.254.662,28, la TIR del 17% y el pay back es a 3 años y 11 meses de iniciadas las actividades.

✓ Escenario moderado, el VAN a cinco años es de \$ 1.736.847,42, la TIR del 22% y el pay back es a 3 años y 6 meses de iniciadas las actividades.

✓ Escenario optimista, el VAN a cinco años es de 3.120.144,84, la TIR del 37% y el pay back es a 2 años y 8 meses de iniciadas las actividades.

Actualmente, el interés por la salud va en aumento y es ese interés el que pensamos aprovechar y por el cual creemos firmemente que el producto tendrá éxito en el mercado.

2. Abstract

This project seeks to introduce an innovative and effective product to the Argentine market: a kit to measure telomere length (TL). Telomeres are non-coding DNA regions, located at the ends of linear chromosomes, whose primary function is associated to the structural stability of chromosomes in eukaryotic cells, cell division and the life span of cell lines.

Numerous scientific studies have proven the correlation between TL and several diseases such as cancer (Wentzensen IM *et al*, 2011), obesity (Zannolli *et al*, 2008), as well as age related pathologies like cardiovascular diseases (Willeit *et al*, 2010) and aging (Cawthon RM, 2002). Furthermore, it is known that TL is associated with lifestyle in healthy individuals (Puterman *et al*, 2010; Epel *et al*, 2004). Our product, **TeloLength®**, offers the possibility of measuring TL in Argentine laboratories, allowing customers to have access to this information relevant to their health.

With **TeloLength®**, customers have all the reagents necessary to measure their TL, using a real-time quantitative PCR (qPCR) technique. **TeloLength's** main advantage is that the reagents used are readily compatible with all the qPCR equipments available in today's markets. Therefore, **TeloLength's** target users are not limited to a particular device. One of the essential components of our kit is the EvaGreen® dye from the Biotium laboratory. Negotiations have been made in order to purchase the Patent EvaGreen®, and use it as the quantification method.

Our source of income is the sale of the kit directly to the concerned institutions such as laboratories and hospitals. Its purchase will be made via telephone or the Internet, and free shipping will be offered. In addition, communication efforts are strategically focused on those institutions which may find the product useful and medical doctors, who will indicate the test of measuring telomere length to their patients.

To begin with this project an initial investment of \$1.078.651,83 is required, and it will be entirely financed with a loan from Credicoop Bank (TNA 17%). Five-year projections with three different scenarios were analyzed: pessimistic, moderate and optimistic. The analysis indicated

✓ Pessimistic scenario, the NPV to five years is \$ 1,254,662.28, the IRR of 17% and the pay back is 3 years and 11 months after initiating activities.

✓ Moderate scenario, the NPV to five years is \$ 1,736,847.42, the IRR of 22% and the pay back is 3 years and 6 months after initiating activities.

✓ Optimistic scenario, the NPV to five years is 3,120,144.84, the IRR of 37% and the pay back is 2 years and 8 months after initiating activities.

Nowadays, aging and health are subject matters of interest and by taking advantage of that interest by introducing a product that satisfy their needs and curiosity, we firmly believe the product will be a success.

Contenidos

1. Resumen	2
2. Abstract.....	4
3. Introducción	7
4. Descripción.....	8
5. Antecedentes.....	10
5.1 Descubrimiento de los telómeros.....	11
5.2 La replicación de los cromosomas lineales plantea un problema	12
5.3 La telomerasa (TERT).....	14
5.4 TRF (Fragmentos de Restricción Terminal)	16
5.5 Q-FISH (Hibridación Fluorescente en situ cuantitativa).....	18
5.6 qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)	18
5.7 “Longitud telomérica y patologías asociadas”	22
5.8 La longitud telomérica en el mercado	28
6. Metodología y desarrollo.....	29
6.1 Estudio técnico	29
6.2 Análisis del mercado	47
6.2.1 Análisis del macroentorno:	47
6.2.2 Análisis del microentorno	53
6.2.3 Análisis de oferta y demanda	59
6.2.4 Investigación de mercado.....	61
6.3 Plan comercial	62
6.3.1 Marketing mix.....	62
6.4 Plan operativo	65
6.4.1 Proceso productivo.....	65
6.4.2 <i>Bill of materials</i>	67
6.5 Plan de recursos humanos	68
7. Resultados	69
7.1 Plan económico y financiero	69
7.1.1 Inversión inicial.....	69
7.1.2 Flujo temporal	72
7.1.3 Estructura de costos	73
7.1.4 Punto de equilibrio.....	74
7.1.5 Estado de resultados.....	74
7.1.6 Indicadores de rentabilidad	76
8. Conclusión	77
9. Referencias	78
Anexo A	84
Anexo B.....	90
Anexo C.....	91
Anexo D	93
Anexo E.....	95
Anexo F	96
Anexo G.....	97

3. Introducción

Hoy en día hay un creciente interés en centros de investigación y diagnóstico molecular por conocer la longitud de los telómeros (LT), ya que la misma se encuentra relacionada con varias enfermedades tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y obesidad, entre otras (anexo A). Esto nos sugiere la existencia de un vacío en el mercado que no se está satisfaciendo. Actualmente los centros interesados envían las muestras de sus pacientes a laboratorios que trabajan en el tema para que lleven a cabo la medición de la LT. Nuestra empresa, **Bebri S.A.**, tiene por lo tanto como **objetivo principal** cubrir la demanda de los hospitales y centros de salud que estén interesados en saber la longitud de los telómeros de sus pacientes. Esto se llevará a cabo mediante la venta de un kit llamado **Telolength®** el cual contendrá los reactivos necesarios, con excepción de la enzima taq polimerasa, para llevar a cabo la medición. Gracias a esto y a que nuestro kit brinda claras instrucciones de cómo utilizarlo y cómo interpretar los resultados, los hospitales y centros podrán llevar a cabo el protocolo sin necesidad de enviar las muestras a terceros.

El proyecto se divide principalmente en siete secciones, cada una de ellas contiene los aspectos más relevantes para el desarrollo del mismo.

Primero y principal está el resumen/*abstract* en donde se encuentra resumido todo el trabajo, desde la relevancia de medir los telómeros, la oportunidad en el mercado observada, la inversión inicial necesaria, cómo la financiaríamos, hasta los distintos escenarios que se podrían plantear a lo largo del establecimiento de nuestra empresa en el sector.

Luego, se encuentra la descripción en donde se detalla los aspectos más relevantes de la dirección estratégica de la empresa.

A continuación están los antecedentes, los cuales incluyen toda la información relevante acerca de los telómeros y las técnicas disponibles para realizar la medición de los mismos. Asimismo, se describe brevemente la situación del mercado en cuanto a la medición de la longitud telomérica.

En la siguiente sección, llamada metodología y desarrollo se describe el estudio técnico del producto, los análisis del mercado, el plan comercial, el plan operativo y el plan de recursos humanos.

Luego, se expresan los resultados del plan económico financiero utilizando los principales indicadores de rentabilidad, el valor actual neto (VAN), la tasa interna de retorno (TIR) y el tiempo que se tardará en recuperar la inversión inicial (*pay back*).

Por último, se encuentra la conclusión en donde se resalta la viabilidad del proyecto basándonos en los resultados de los indicadores de rentabilidad.

4. Descripción

Bebri S.A., operará en el campo de la investigación y proveerá insumos para laboratorios. Ofertaremos un kit con los materiales necesarios, a excepción de la taq polimerasa, para medir la longitud de los telómeros en individuos sanos que deseen conocer su edad biológica y en pacientes con patologías asociadas: cáncer, obesidad, cirrosis, enfermedades cardiovasculares, diabetes, infertilidad, osteoporosis, artritis reumatoidea, enfermedades respiratorias, inmunología, estrés y sistema nervioso central (Anexo A). Además, nuestro producto brindará información relevante a médicos que trabajan con patologías asociadas a la edad, ya que podrán utilizar esta medición como un indicador más de la edad biológica de los pacientes.

La empresa será de carácter industrial y estará localizada en el Parque Industrial de Almirante Brown (Alte. Brown), que ofrece un excelente punto de partida para aquellas empresas que desean instalarse en una zona privilegiada del Sur del Gran Buenos Aires, con beneficios impositivos, con los servicios necesarios para su funcionamiento, con excelentes medios de transporte, y a corta distancia de puntos importantes como el Puerto de Buenos Aires, el aeroparque Jorge Newbery, el aeropuerto de Ezeiza, a 30 minutos de la Ciudad de Buenos Aires, y a 45 minutos de La Plata. El Sector Industrial de Alte. Brown fue creado por el Decreto Provincial N° 4705/93, que rige su funcionamiento, límites y objetivos, a la vez que constituye la Comisión Mixta Industrial, entidad que administra, planifica y representa a las Empresas del Sector.

Para llevar a cabo el proyecto deberemos comprar la licencia del EvaGreen® al laboratorio Biotium, ya que es un reactivo necesario para la realización del kit, y está registrado.

Los clientes directos del producto serán los hospitales, laboratorios de biología molecular y de investigación. Sin embargo, también se deberán considerar a los médicos, que si bien no comprarán en forma directa nuestro producto, serán quienes indiquen la realización del mismo a los pacientes que consideren adecuados para el estudio de LT.

A continuación se detallan los aspectos más relevantes de la dirección estratégica de la empresa:

Misión:

Desarrollar un kit de primera calidad, que permita determinar la longitud telomérica en pacientes de manera sencilla y práctica en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y en Gran Buenos Aires (GBA), manteniendo el liderazgo en el mercado.

Visión:

Ser la empresa modelo para el desarrollo de este tipo de kits en el futuro, pudiendo también expandir nuestra cartera a otros productos de interés científico.

Valores:

RESPONSABILIDAD:

- Caracteriza nuestra actuación frente a clientes, colaboradores, socios y posibles inversores.
- Determina nuestras decisiones empresariales, de las que nos responsabilizamos conjuntamente.
- Significa ser un buen modelo.
- Lleva al reconocimiento y aceptación de nuestra actividad empresarial.

INTEGRIDAD

- Es el sustento de nuestra credibilidad ante los demás.
- Cumplimos con lo que proponemos.
- Nos permite asegurar la transparencia de nuestro negocio.

EFICIENCIA

- Determina la aptitud individual y empresarial.
- Reta y estimula a nuestros colaboradores.
- Apoya el desarrollo personal de nuestros colaboradores.
- Se mide por el resultado conseguido.
- Asegura la independencia empresarial.

RESPONSABILIDAD SOCIAL

- Se mide por el compromiso hacia la sociedad en su conjunto.
- Establece políticas y prácticas que promueven y protegen la salud.
- Estimula a nuestra empresa a generar oportunidades para la acción social.

Estrategia:

La estrategia general de **Bebri S.A.** será explotar la ventaja competitiva del producto. La misma consiste en ofrecer a los clientes los reactivos necesarios, menos la taq polimersa, para realizar el protocolo de medición de la longitud telomérica, compatibles con todos los equipos de qPCR disponibles en el mercado. A su vez, ofrecemos las soluciones necesarias para hacer la calibración de la metodología y una curva con longitudes estándar de individuos sanos, para realizar comparaciones.

5. Antecedentes

Los telómeros (del griego telos, "final" y meros, "parte") son una región de ADN no codificante que se encuentra en los extremos de los cromosomas lineales (Fig. 1). Están constituidos por una secuencia altamente repetida, cuya función principal es la estabilidad estructural de los cromosomas en las células eucariotas, la división celular y el tiempo de vida de las estirpes celulares.

Los telómeros juegan un papel importante en la vida de las células ya que mantienen la integridad de las terminaciones de los cromosomas impidiendo que se enmarañen y adhieran unos con otros, y ayudando a que los cromosomas homólogos se

segreguen correctamente en meiosis (Blackburn EH, 1991). Los telómeros humanos y murinos contienen hasta 2.000 veces repetida la secuencia 5' TTAGGG 3'.

Estructuralmente, el ADN de los telómeros tiene una región de doble hebra y una zona en el extremo 3' que carece de hebra complementaria. Las dos hebras del telómero son asimétricas en cuanto a composición y tamaño. La hebra del extremo 3' es rica en guaninas y la hebra 5' rica en citosinas. Se cree que la existencia de la secuencia simple cadena es crucial para la formación de la estructura secundaria en el ADN telomérico (Denchi EL, 2009).

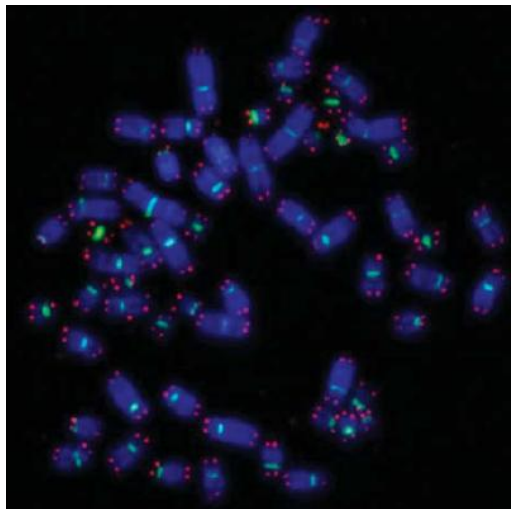


Figura 1: Imagen de cromosomas en metafase mostrando la ubicación de los telómeros (rojo) y centrómeros (verde) mediante FISH (*fluorescence in situ hybridization*) (Stewart y Weinberg, 2006).

5.1 Descubrimiento de los telómeros

Los telómeros fueron descubiertos por Hermann Joseph Muller durante la década de los años 30 del siglo XX. Desde entonces, se ha avanzado mucho en el conocimiento de los telómeros, gracias a las técnicas de genética molecular. Se proponía que los telómeros, situados en los extremos de los cromosomas, tenían la función de prevenir que los mismos se fusionen al ponerse en contacto por sus extremos, lo que produciría consecuencias terribles para las células.

Los científicos Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider y Jack W. Szostak son reconocidos con el Premio Nobel de medicina en 2009 por la descripción molecular de los telómeros, demostrar su conservación evolutiva y el descubrimiento de la telomerasa, enzima capaz de sintetizar repeticiones teloméricas utilizando como molde la hebra 3' simple cadena. Asimismo, lograron un modelo consistente que explica el 'problema de la terminación de la replicación' (*end-replication problem*) que será explicado más adelante, y el mecanismo molecular de protección de los extremos cromosomales (Toftgård, 2009).

5.2 La replicación de los cromosomas lineales plantea un problema

La ADN polimerasa sólo puede fabricar nuevas hebras de ADN cuando se mueve a lo largo de la cadena molde en la dirección 5' → 3'. Esto no plantea ningún problema para la cadena 3' → 5' de un cromosoma, dado que la polimerasa se puede mover libre e ininterrumpidamente desde el origen de replicación hasta el final del cromosoma o hasta que encuentra con una señal de terminación. No ocurre lo mismo cuando la hebra molde es la 5' → 3' cuya replicación debe ser forzosamente discontinua. Cuando la horquilla de replicación se ha abierto lo suficiente, la ADN-polimerasa sintetiza un fragmento del ADN complementario en el sentido contrario. Más tarde, estos fragmentos de ADN (llamados fragmentos de Okazaki) serán empalmados mediante una ligasa (Brown T, 2008).

Por lo tanto en los cromosomas lineales la ADN polimerasa no puede copiar las últimas bases del extremo 3' del telómero ya que necesita espacio en la hebra molde para la introducción del *primer*. Como consecuencia de este impedimento, en cada ciclo de replicación del ADN los cromosomas lineales sufren un pequeño acortamiento, llamado acortamiento telomérico (Fig. 2).

La integridad y funcionalidad de los telómeros son factores críticos en la vida de las células humanas, considerándose que se requiere un mínimo de longitud telomérica (LT) para mantener su función. En promedio se observa una disminución de 25-200 pares de base (pb) con cada duplicación de la población celular *in vitro* y entre 30 y 60 pb por año *in vivo*. Así por ejemplo, en individuos normales se han detectado longitudes teloméricas de

10000 pb en adultos jóvenes y entre 5000 a 7000 pb en células de ancianos (Shay *et al*, 1996). Además, existen diferencias en el nivel de acortamiento telomérico entre los distintos tipos celulares, asociados a los diferentes índices de replicación de cada tejido (Iwama *et al*, 1998; Lindsey *et al*, 1991; Vaziri *et al*, 1994).

Estas observaciones llevaron a la hipótesis de que la LT serviría como un reloj biológico regulando la vida de las células normales. Hayflick y Moorehead (1961) fueron los primeros en describir el limitado potencial replicativo de las células somáticas normales en cultivo, sugiriendo que existe un número definido de divisiones celulares a partir del cual las células ingresan en senescencia. En este punto, denominado límite de Hayflick, los telómeros se encuentran críticamente acortados (2,5 kb) provocando que las células dejen de dividirse, mostrando cambios morfológicos y de expresión génica, como ser aumento de los niveles de β -galactosidasa en lisosomas (marcador asociado a senescencia) (Hayflick y Moorhead, 1961).

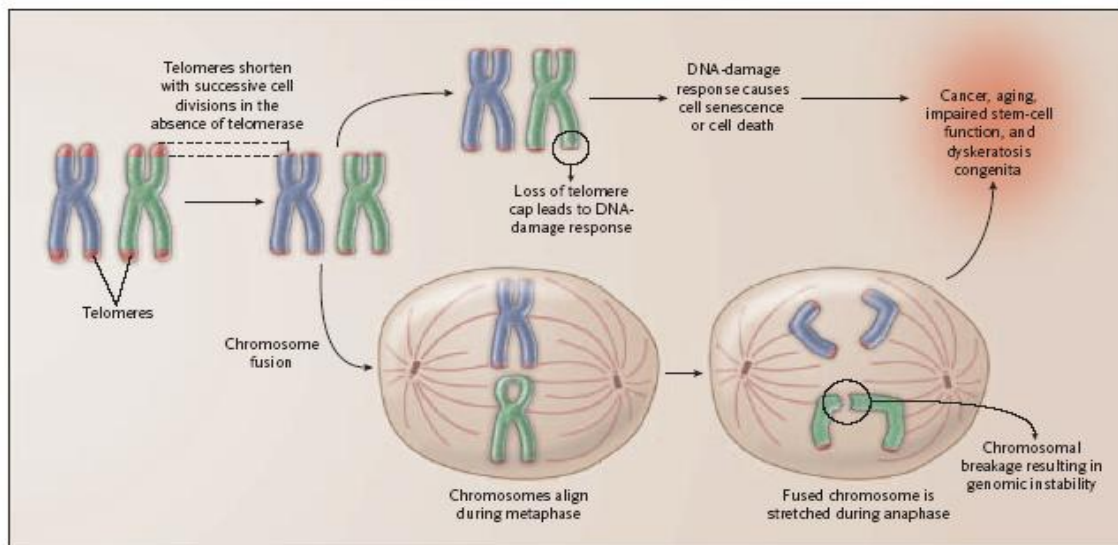


Figura 2: En las células somáticas normales, que carecen de telomerasa, los telómeros se acortan progresivamente con la división celular debido a la incapacidad de la ADN polimerasa para replicar completamente los extremos de los cromosomas. En presencia de telómeros disfuncionales, se desencadenan los mecanismos de respuesta al daño en el ADN, conduciendo a la célula a la senescencia o a la muerte celular programada. Alternativamente, la pérdida de protección puede causar la inapropiada unión de los telómeros para producir cromosomas condensados, que son altamente vulnerables a la rotura, lo que resulta en la inestabilidad genómica (Artandi SE, 2006).

A pesar de esto, algunas células son inmortales como las células germinales con telómeros largos de hasta 10kb (Hastie *et al*, 1990) o células tumorales (Draskovic y Londono Vallejo, 2013). Estas células muestran LT estables, ya sea por activación de la expresión de la enzima telomerasa o mecanismos alternativos a esta enzima que involucran procesos de recombinación entre extremos cromosómicos.

5.3 La telomerasa (TERT)

La telomerasa es una ribonucleoproteína compleja formada por varias subunidades (Fig. 3). Por un lado se encuentra su núcleo principal, que está compuesto por la subunidad catalítica llamada hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase/* Telomerasa Transcriptasa Reversa de humanos) de naturaleza proteica y con actividad de transcriptasa reversa. Por el otro lado está la subunidad de ARN llamada hTR (*human Telomerase RNA/* Telomerasa de humanos RNA) que tiene una estructura secundaria específica y hace de molde para la síntesis de ADN telomérico (Artandi SE, 2006). El mecanismo de acción de la telomerasa se puede describir en tres pasos: en primer lugar la subunidad hTERT se une por complementariedad de bases a la región telomérica simple cadena; luego se produce la elongación, donde se adicionan nucleótidos y en tercer lugar ocurre la translocación que permite repetir el proceso empleando el mismo sitio de unión (Brown T, 2008).

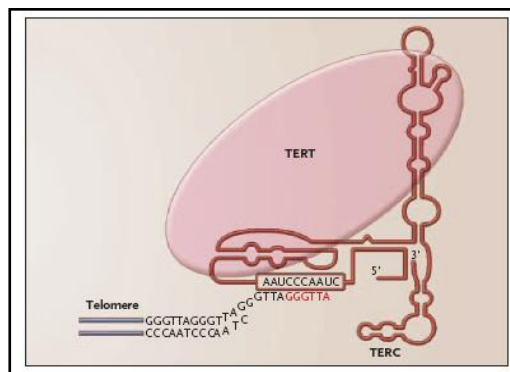


Figura 3: Estructura de la enzima telomerasa (Artandi SE, 2006)

La actividad de la telomerasa está determinada por el tipo de tejido y el momento del desarrollo. En humanos, la telomerasa se encuentra ausente en la mayoría de las

células somáticas normales, presenta bajos niveles en poblaciones celulares con alto potencial proliferativo como linfocitos activados, y muestra altos niveles de expresión en células germinales, *stem* y tumorales así como en líneas celulares inmortalizadas (Collins y Mitchell, 2002; Forsyth *et al*, 2002). La actividad de la telomerasa está determinada por el tipo de tejido y el momento del desarrollo. Luego del nacimiento, la telomerasa es silenciada en la mayoría de las células somáticas por lo que los telómeros se acortan progresivamente con el tiempo (Harley *et al*, 1990; Canela *et al*, 2007). Ciertos tipos celulares, como células hemotopoyéticas, células madre y células germinales tienen la habilidad de activar la telomerasa, pero esto no es suficiente para evitar el acortamiento de los telómeros con el tiempo. Telómeros críticamente cortos no pueden ser rescatados por ningún método de reparación del ADN conocido y consecuentemente desencadena una respuesta de daño celular persistente, que lleva a la célula a la senescencia o a la muerte celular programada (apoptosis) (Deng *et al*, 2008; Collado *et al*, 2007).

Muchas células cancerosas derivan de células somáticas, y se ha comprobado la presencia de telomerasa en el 75-80% de las formas de cáncer en humanos. Esto, sin embargo, no quiere decir que la telomerasa induzca el cáncer. En este sentido, Kathleen Collins y colaboradores (Wong y Collins, 2006) encontraron que pacientes con una enfermedad muy poco frecuente, la disqueratosis congénita, tenían niveles de telomerasa anormalmente bajos, siendo la causa de muerte en muchos casos el cáncer gastrointestinal. A pesar de esta incongruencia, se sabe que la agresividad de las células tumorales está relacionada con sus niveles de telomerasa y que niveles altos de esta enzima son indicativos de la malignidad del tumor.

A modo de resumen los telómeros se relacionan con las siguientes funciones celulares:

- ✓ Mantenimiento de la estabilidad cromosómica formando estructuras que evitan la fusión de cromosomas o la acción de mecanismos degradativos, evitando así la muerte celular y la pérdida de genes importantes para la vida de la célula.
- ✓ La mitosis: la longitud de los telómeros es uno de los parámetros que determinan el número de divisiones de una célula y por lo tanto la duración de su vida.

- ✓ La meiosis: facilitan el reconocimiento de cromosomas homólogos.
- ✓ La activación o desactivación de la telomerasa influye en el desarrollo y el envejecimiento de los tejidos de un organismo.

Teniendo en cuenta lo importante que son los telómeros, la medición de su longitud permite comprender su rol en la fisiología del envejecimiento y en procesos de transformación maligna. Hoy en día existen distintas técnicas que permiten abordar la medición de la LT: la técnica de Fragmentos de Restricción Terminal (TRF), PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), y técnicas de hibridización con Fluorescencia en situ (FISH).

El objetivo principal de la medición de telómeros es detectar pequeñas variaciones en la longitud de los mismos entre muestras provenientes de diferentes pacientes o provenientes de uno solo a lo largo del tiempo. La habilidad de poder detectar pequeños cambios puede estar influenciado por el método usado, por lo tanto es muy importante elegir el método más sensible para la muestra disponible. Además, se deberá tener en cuenta la cantidad de material del que se dispone, el número de muestras, el escalado y los niveles de detección, entre otros (Vera y Blasco, 2012).

5.4 TRF (Fragmentos de Restricción Terminal)

La metodología de TRF emplea la técnica de Southern Blot para cuantificar la cantidad de fragmentos de restricción que contengan telómeros (Allshire *et al*, 1989). Es un método que no da información precisa acerca de las repeticiones teloméricas presentes en la muestra, ya que los fragmentos de restricción terminales no sólo incluyen las repeticiones teloméricas, sino también una cantidad variable de secuencias subteloméricas.

Esta técnica se basa en la digestión diferencial del ADN genómico, utilizando enzimas de restricción que liberarán un fragmento de restricción terminal del cromosoma que contendrá las repeticiones teloméricas. Este no tendrá sitios para que la enzima corte, pero si secuencias subteloméricas. Estos grandes fragmentos de ADN son separados por una electroforesis en gel de agarosa, transferidos a una membrana de Nylon, e hibridizados con una sonda telomérica específica que presenta marcación radioactiva o luminiscente mediante

el método de Southern Blot. Los resultados se analizan mediante densitometría, luego de aproximadamente 10 días de exposición en placa radiográfica. El tamaño promedio de los fragmentos de restricción otorga una estimación de la longitud telomérica promedio de la muestra.

Si bien la técnica TRF es la más utilizada y reconocida a nivel mundial, la más empleada actualmente como estándar para el desarrollo de nuevas estrategias de evaluación, presenta serias desventajas dentro de las cuales se pueden mencionar:

a. El método es laborioso y consume mucho tiempo (aproximadamente 1 mes desde la purificación de ADN), además de requerir una gran cantidad de ADN (10 μ g) de muy buena calidad y alto peso molecular.

b. El tamaño de los fragmentos de restricción terminal es sólo un estimativo de la longitud de las repeticiones teloméricas, ya que estas contienen secuencias subteloméricas. Estas secuencias pueden variar su longitud dependiendo del último sitio de restricción situado en un determinado brazo del cromosoma, por lo tanto aumentando así la heterogeneidad de los fragmentos y enmascarando la verdadera longitud de las repeticiones teloméricas.

c. El análisis mediante Southern Blot subestima la longitud y el número de telómeros cortos en la muestra, ya que los fragmentos cortos corren una gran distancia en el gel en comparación con los fragmentos más largos. Proveen además una señal de hibridización menor.

d. Se requiere electroforesis de campo pulsado para dilucidar telómeros de gran tamaño como el de los ratones.

e. La técnica requiere de manejo de radioactividad. Si bien existen sondas luminiscentes (kit Telo TATTG¹) las mismas son costosas para el número de muestras que se pueden analizar por unidad de kit.

A pesar de estas limitaciones, los análisis mediante TRF permitieron revelar las primeras asociaciones entre la longitud telomérica y la edad, así como también con el pronóstico de algunas de las enfermedades humanas antes mencionadas (Vera y Blasco, 2012).

5.5 Q-FISH (Hibridación Fluorescente in situ cuantitativa)

Permite la cuantificación de la LT de cromosomas individuales por célula, otorgando una cuantificación de telómeros muy cortos y la longitud telomérica promedio por célula.

La técnica está basada en el uso de microscopía de fluorescencia digital para determinar la fluorescencia de telómeros luego de la hibridación en un cromosoma metafásico con una sonda fluorescente contra las regiones teloméricas (Lansdorp *et al*, 1996). Estas sondas presentan una modificación química que permite una alta eficiencia de hibridación. Dado que cada sonda reconoce tres repeticiones teloméricas, la intensidad de la señal fluorescente de una sonda telomérica que hibridiza a un telómero dado, es directamente proporcional a la longitud telomérica. Esta señal es cuantificada por imágenes de microscopía fluorescente, donde señales individuales de telómeros son capturadas y analizadas para obtener una estimación de la longitud de cada cromosoma individual (O'Sullivan *et al*, 2005).

Q-Fish otorga valores expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia, que pueden ser convertidas a kilobases mediante la utilización de plásmidos clonados con repeticiones teloméricas de largo definido (Hanish *et al*, 1994); o bien utilizando líneas celulares (McIlrath *et al*, 2001) con telómeros estables y de una longitud conocida.

Las desventajas que este método presenta son:

- a. Es un método laborioso y consume mucho tiempo, por lo que no permite realizar análisis high-throughput.
- b. Requiere un sistema técnico y muy caro.
- c. Necesita calibración externa.
- d. Se deben usar muchos controles para evitar variabilidad inter-intra/sesión.
- e. Muy pocas muestras son analizadas al mismo momento.

5.6 qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)

La PCR cuantitativa es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta

el producto de la amplificación de ADN molde. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, al menos un par de *primers* específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (Watson JD, 2006). Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real (es decir, PCR inmediata, simultánea).

Higuchi y colaboradores (1992) fueron los primeros en reportar la técnica de qPCR, y ésta fue rápidamente incorporada en laboratorios de investigación y clínicos. La qPCR permite que los procesos de amplificación y visualización se generen en simultáneo en un único tubo cerrado, a diferencia de la PCR convencional donde es necesario visualizar los productos amplificados en geles, comúnmente de agarosa o acrilamida (Bustin y Nolan, 2004). De esta manera se minimizan los tiempos asociados a la manipulación y se reducen los costos y posibles contaminaciones, facilitando a su vez los procesos de automatización y la capacidad de analizar un gran número de muestras (Dorak T, 2007). La técnica de qPCR presenta alta sensibilidad y especificidad, por lo cual es utilizada a diario en laboratorios de diagnóstico molecular y aplicado en diferentes campos de la ciencia, como ser oncología, genética médica, detección de agentes infecciosos y diagnóstico prenatal.

La amplificación del ADN de interés se puede detectar en cada tubo de reacción mediante la fluorescencia generada por el uso de agentes intercalantes al finalizar cada ciclo de PCR. Por último, el análisis de los productos sintetizados se analizan con la ayuda de un *software* mediante curvas de desnaturalización.

Las curvas de desnaturalización o “*melt*” permiten discriminar de manera simple la especificidad y sensibilidad de la reacción de qPCR. La técnica consiste en someter a los productos amplificados en la reacción de PCR a un gradiente de temperatura, al tiempo que se registra la fluorescencia. Para realizar esta técnica se utilizan agentes intercalantes como Sybr Green, o sondas fluorescentes siendo las más comunes: FRET, Beacons, *primers* scorpions, y sondas HyBeacons (Dorak T, 2007).

Durante el aumento gradual de la temperatura el ADN se separa en simple hebra, generando un decaimiento de la fluorescencia que es analizado por el *software* del equipo. En el gráfico resultante, los puntos máximos de fluorescencia en función de la temperatura reflejan (en el caso del uso de agentes intercalantes) la temperatura del *melting* o T_m del producto amplificado. A diferencia de las sondas fluorescentes la T_m corresponde a la hibridación de esta en la hebra de ADN.

Un instrumento de qPCR es un termociclador que tiene adosado un sistema de emisión y detección de luz de diferentes longitudes de onda. En este, la recolección de los datos y análisis se da mediante un *software*. La ventaja de estas plataformas en comparación con las de PCR convencional radica en que la amplificación y detección se realiza en un mismo paso y en tubos cerrados, pudiéndose determinar asimismo la concentración inicial de ADN (Dorak T, 2007). Podemos clasificar las técnicas de PCR cuantitativa según el empleo de fluorocromos no específicos o bien de sondas secuencia-específicas. En el primer caso, se detecta de manera inespecífica la generación exponencial de ADN de doble cadena. Un ejemplo que permite esta detección es el SYBR Green (Verde SYBR), que, excitado mediante luz azul ($\lambda_{max} = 488 \text{ nm}$) emite luz verde ($\lambda_{max} = 522 \text{ nm}$) (Zipper *et al*, 2004).

En la actualidad existen, en el mercado, diferentes plataformas con variadas características (ver Tabla I). La elección de la plataforma va a depender del uso y estrategia de cada laboratorio. Es importante destacar algunas características técnicas tales como: la capacidad para emitir y detectar a diferentes longitudes de onda (canales) el número de muestras máxima, la velocidad de termociclador, prestaciones y robustez del *software*, volumen de reacción, consumibles plásticos (disponibilidad y costos) y el servicio técnico.

Tabla I. Comparación técnica de las plataformas PCR en tiempo real más comunes en el mercado. (Modificado de Dorak, 2007)

Prestaciones	ABI 7500	ABI 7900	Bio Rad iQ5	Cehield SmartCycler	Corbett Roto Gene	Eppendorf MasterCycler realplex	Roche LightCycler480	Stratagene MX 3005p
Fuente de luz	Lámpara de halógeno-tungsteno	Láser de Argón	Lámpara de halógeno-tungsteno	4 LEDs	4 LEDs	96 LEDs	Lámpara de Xenón	Lámpara de halógeno-tungsteno
Detector	Cámara CCD	Cámara CCD	Cámara CCD	4 fotodetectores	4 PMTs	2 PMTs	Cámara CCD	PMT
Sistema de escaneo	Toda la placa	Por fila	Todo la placa	Por pocillo	Por tubo	96 cables de fibraóptica	Sin dato	Toda la placa
Longitud de onda de excitación (nm)	450-650	488	400-700	450-650	470-625	470	450-615	350-635
Longitud de onda de emisión (nm)	500-700	500-660	400-700	500-650	510-665	520-605	500-670	440-610
Número de muestras máximo por ciclo	Placas de 96 pocillos	Placas de 96 o 384 pocillos	Placas de 96 pocillos	16 pocillos independientes	Rotor de 36 a 72	Placas de 96 pocillos	Placas de 96 o 384 pocillos	Placas de 96 pocillos
Volumen de reacción (µl)	20-100	20-100 (96) y 5-20 (384)	oct-50	25-100	20-200	oct-50	20-100 (96) y 5-20 (384)	25
Sistema de control de temperatura	Peltier	Peltier	Peltier	Cerámica y aire	Aire	Peltier	Peltier	Peltier modificado
Sensibilidad	9 log.	9 log.	6 log.	Sin dato	12 log	9 log	8 log	10 log

En el año 2002 se desarrolló la primer técnica de qPCR para la determinación de la longitud telomérica, empleando *primers* modificados en 5' para amplificar la región telomérica altamente repetitiva (Cawthon RM, 2002). A su vez se debe amplificar un gen de copia única, de esta manera el método puede producir relaciones de señal telómeros/ gen de copia única, los cuales son proporcionales a la longitud promedio de los telómeros.

Años más tarde se diseñó la técnica de cuantificación absoluta de la longitud telomérica, la cual emplea curvas de calibración con oligonucleótidos sintéticos perfectamente cuantificados (O'Callaghan, N. *et al*, 2008). El resultado de interpolar muestras incógnita en dichas curvas de calibración, permite la obtención de un resultado absoluto de longitud telomérica en cada muestra de reacción. Las ventajas de este método radican en la rapidez para la obtención del resultado (2 días desde la purificación del ADN), poca cantidad de muestra para poder llevarse a cabo (20ng), y la posibilidad de hacer análisis *high-throughput*.

A modo de resumen, la Tabla II destaca lo más importante de cada técnica.

Tabla II. Comparación de métodos para la medición de longitud telomérica (Modificado de Vera y Blasco, 2012)

Método	Approach	Ventajas	Desventajas
Fragmentos de restricción telomérica	<ul style="list-style-type: none"> - Hibridización por Southern Blot usando sondas específicas de telómeros. - El análisis se realiza sobre ADN. 	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica más usada a nivel mundial y la empleada como estándar para la puesta a punto de otras técnicas. - No tiene requerimientos en cuanto a equipos o reactivos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tiempo requerido para la obtención de resultados (aproximadamente 1 mes). - Requiere mucha cantidad de ADN (10 µg). - Provee un estimativo de la longitud telomérica de todas las células presentes en la muestra. - La presencia de polimorfismo subteloméricos. - Se necesita habilitación para poder trabajar con material radioactivo.
FISH	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopía de fluorescencia digital. Hibridización con sonda PNA fluorescente específica de telómeros sobre células en metafase. - La técnica debe llevarse a cabo sobre células vivas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Permite la medición de telómeros en cromosomas individuales. - Permite la cuantificación de terminales libres de fluorescencia (cuando estos son menores a 1.5 - Alta exactitud. - Alta sensibilidad, límite de detección de 0.15 kb. 	<ul style="list-style-type: none"> - Método laborioso y consume mucho tiempo. - Requiere un sistema técnico muy caro. - Necesita calibración externa. - Se deben usar muchos controles para evitar la variabilidad inter-intra/sesión. - Muy pocas muestras son analizadas al mismo momento.
qPCR	<ul style="list-style-type: none"> - Mide la relación entre el número de repeticiones teloméricas y el número - Se lleva a cabo sobre ADN. 	<ul style="list-style-type: none"> - Simple. - Rápida. - Escalable, permite hacer estudios high- throughput. - Requiere poca cantidad de muestra inicial (20 ng). 	<ul style="list-style-type: none"> - Cuantifica el promedio de la longitud telomérica por muestra. No puede cuantificar telómeros individuales.

5.7 “Longitud telomérica y patologías asociadas”

Diferentes estudios han demostrado que el acortamiento telomérico contribuye directamente a la presencia de anormalidades cromosómicas usualmente encontradas en diversos tipos de cáncer (Gisselsson *et al*, 2001; Wu *et al*, 2003). Además, se han identificado

numerosos factores que aumentan la probabilidad de que los telómeros se fusionen o asocien a otros extremos cromosómicos, incluyendo la reducción crítica en el número de repeticiones teloméricas y la presencia de mutaciones en los genes que codifican para proteínas de regulación de la LT (Denchi y de Lange, 2007).

Como se mencionó anteriormente, las células somáticas normales no expresan niveles de telomerasa detectables, en tanto que más del 85% de los tumores humanos presentan elevados niveles de expresión y son capaces de mantener estable su LT (Hahn WC, 2005; Shay JW, 1997) (Fig. 4). En humanos, se conoce que el límite de divisiones celulares tendría un rol importante como supresor de tumor. Aquellas células capaces de evitar el primer punto de control, continúan dividiéndose con una gran desprotección telomérica. Esta etapa (crisis) es caracterizada por las frecuentes fusiones y rearrreglos cromosómicos, resultando en una alta inestabilidad genómica, generalmente letal para las células. Ocasionalmente, los telómeros son estabilizados por activación de la telomerasa, permitiéndole a estas células sobrepasar los límites normales de proliferación e inmortalizarse (Osterhage y Friedman, 2009).

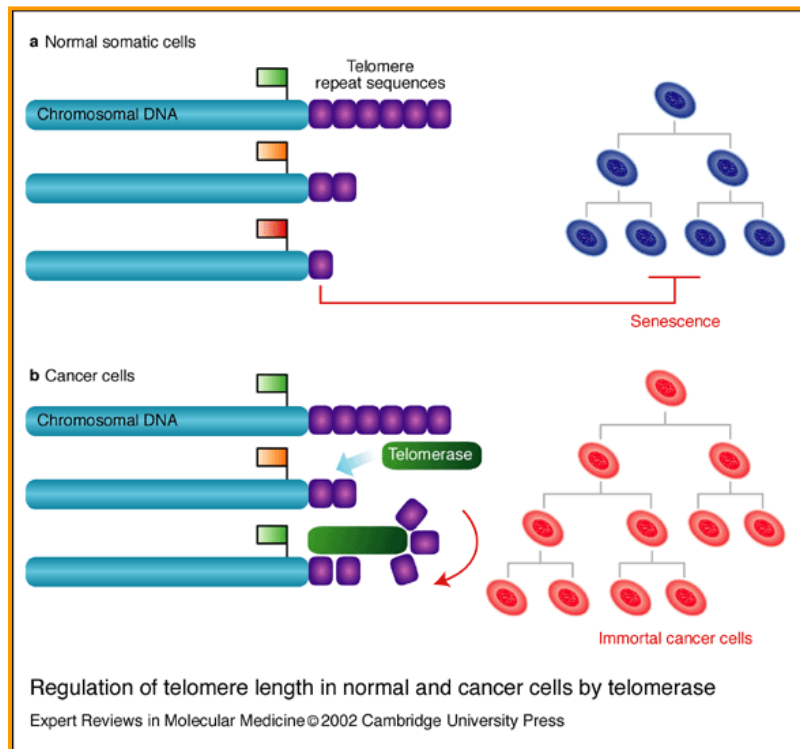


Figura 4: Regulación de la LT en células normales y tumorales. (a) En células somáticas normales la telomerasa se encuentra ausente. La secuencia telomérica (color violeta) se acorta con las sucesivas divisiones celulares. Eventualmente, luego de muchas divisiones, los telómeros alcanzan longitudes críticas iniciando la cascada de señalización que conducirá a la senescencia, resultando en el cese de la proliferación celular. (b) En células tumorales, la expresión de telomerasa permite evadir el programa de senescencia, la LT se mantendrá estable, permitiendo la proliferación indefinida de estas células (Keith *et al*, 2002).

La pérdida de repeticiones teloméricas y la consiguiente inestabilidad genómica serían las fuerzas que promueven el proceso de transformación. Diferentes estudios empleando ratones knock-out para la enzima telomerasa sustentan esta hipótesis y muestran un progresivo acortamiento telomérico, similar al comportamiento en células humanas normales (Blasco *et al*, 1997).

Por otro lado, sabemos también que la acumulación de daño oxidativo juega un rol importante en el envejecimiento y las enfermedades asociadas, incluyendo las

cardiovasculares (Finkel y Holbrook, 2000; Griendling y FitzGerald, 2003). Las consecuencias del acortamiento telomérico en el organismo han sido estudiadas en ratones deficientes para el gen hTR. Estos animales muestran síntomas de envejecimiento prematuro y de patologías asociadas, tales como infertilidad, encanecimiento, alopecia, disfunción cardíaca, hipertensión, atrofia y disminución de la capacidad de regeneración de diferentes tejidos (Blasco *et al*, 1997; Rudolph *et al*, 1999; Leri *et al*, 2003; Pérez-Rivero *et al*, 2006). Estos hallazgos indican que se requiere una LT mínima para mantener la homeostasis tisular y sustenta la noción que el acortamiento telomérico puede estar involucrado en la patogénesis de las enfermedades relacionadas con la edad. Acorde con este concepto, las patologías humanas asociadas a envejecimiento prematuro, como disqueratosis congénita (Vulliamy *et al*, 2001), síndrome de Werner (Chang *et al*, 2004) o ataxia telangiectasia (Metcalf *et al*, 1996) presentan actividad de telomerasa defectuosa y telómeros cortos.

La genética y el estilo de vida son factores fundamentales que afectan a la longitud de los telómeros y la velocidad a la que éstos se acortan. No todos los individuos envejecen a la misma velocidad, independientemente de que puedan tener la misma edad cronológica. Por tanto, es importante tener marcadores moleculares (diferentes de la edad cronológica) que puedan estimar el grado de envejecimiento de un organismo. Esta información puede ser de utilidad para que médicos y profesionales sanitarios puedan predecir el desarrollo prematuro de ciertas enfermedades relacionadas con la edad e intentar reducir al mínimo este riesgo modificando el estilo de vida. En este sentido, Valdes y colaboradores (2005) han demostrado que la obesidad y el tabaquismo llevan a una pérdida acelerada de telómeros (Valdes *et al*, 2005). Asimismo, la obesidad o el estrés psicológico aumentan el estrés oxidativo que contribuye a mayores índices de acortamiento de los telómeros a lo largo de la vida (Von Zglinicki T, 2002). Se piensa que otros factores como determinados suplementos nutricionales (Richards *et al*, 2007), el ejercicio (Puterman *et al*, 2010) y el sueño también influirían en el envejecimiento biológico (Fig. 5).

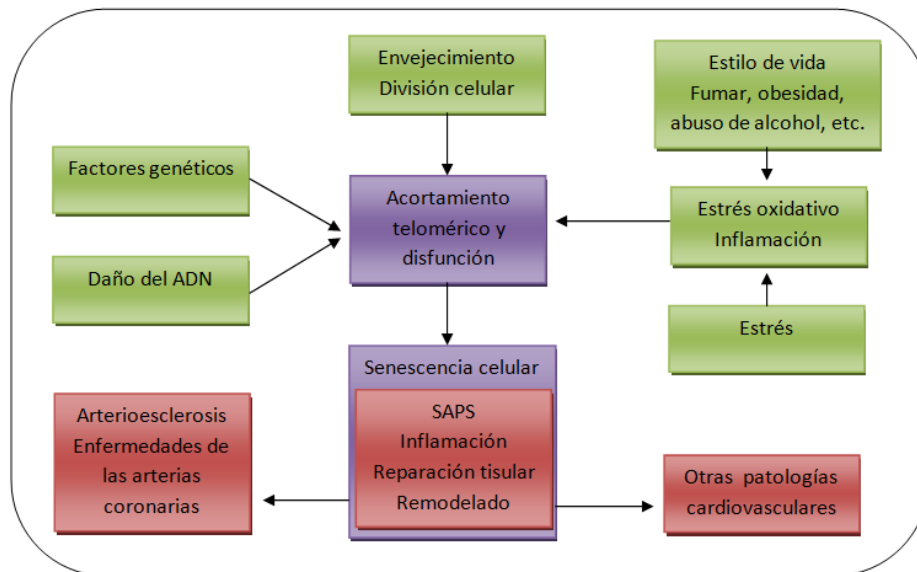


Figura 5: Esquema que muestra cómo estilos de vida, factores genéticos y daño al ADN se correlacionan para influir en el largo de los telómeros produciendo como consecuencia final diversas patologías.

La longitud telomérica es heterogénea dentro de un núcleo individual, ya que el extremo de cada cromosoma tiene una longitud diferente de repeticiones teloméricas (hay 2 telómeros por cromosoma y 23 pares de cromosomas por célula). El promedio de la LT es la longitud media de todos los telómeros considerados conjuntamente, generalmente dentro de una población de células (no por célula individual). Sin embargo, la evidencia científica (Anexo A) muestra que son los telómeros cortos los que causan el envejecimiento y la enfermedad. Esto es debido a que los telómeros críticamente cortos infringen un daño permanente a la célula.

Una medición de telómeros por sí misma no tiene ninguna significancia biológica, pero sí la comparación con longitudes de telómeros de una muestra representativa de la población. El conocimiento de esta información en individuos sanos de distintas edades permite la comparación de una determinada LT perteneciente a un individuo, con su edad y género, otorgando una estimación de su edad biológica. A su vez, la medición de los telómeros a lo largo del tiempo puede brindar una nueva forma de caracterizar efectos positivos o negativos de diversos tratamientos o cambios en el estilo de vida.

Resulta importante conocer la LT porque es un excelente indicador de la edad biológica. El paso de los años es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de la mayoría de las enfermedades mortales y crónicas que afectan a los países desarrollados. Además, el conocimiento de la misma permite comprender mejor qué estilos de vida influyen en el envejecimiento y nos ofrece la oportunidad de llevar a cabo las modificaciones apropiadas. Por último, a medida que los médicos y la comunidad médica introduzcan e incorporen la medición de la LT en su actividad diaria, permitirá progresivamente ofrecer una medicina más personalizada al considerar en cada paciente su edad biológica².

Teniendo en cuenta todo lo expresado, el objetivo de nuestra empresa llamada **Bebri S.A.** radica en ofrecer un kit para la medición de la longitud telomérica mediante la técnica de qPCR. El mismo se llamará **Telolength®** y contendrá los reactivos necesarios, con excepción de la enzima polimersa, para llevar a cabo la metodología, con excepción de la taq polimerasa. En nuestro caso la señal de fluorescencia estará producida por el EvaGreen^{®3}, un agente intercalante que actúa de manera análoga al Sybr Green, por lo que se une de forma inespecífica a los amplicones DNA que se van formando. Se brindará a su vez oligonucleótidos sintéticos para realizar una curva de calibración necesaria para cuantificar de manera absoluta la longitud telomérica. Contendrá además un manual para el usuario, donde podrá visualizarse un gráfico con las longitudes teloméricas promedio medidas en individuos sanos de diferentes edades cronológicas. De esta manera se podrá comparar los resultados obtenidos con la longitud promedio estándar, correspondiente a la misma edad cronológica.

Cabe destacar que el parametro de LT se emplea actualmente como factor pronóstico, indicando el grado de severidad de distintas patologías. Esto se debe principalmente a que la presencia de telomeros cortos se asocia a mayor inestabilidad cromosómica, presencia de cariotipos complejos y fusiones cromosómicas. Así por ejemplo en leucemia linfocítica crónica (Lin *et al*, 2014) observaron que pacientes con telomeros muy cortos presentaban menor sobrevida que aquellos con telomeros más largos que la media de la población, independientemente del grupo citogenético de riesgo al que correspondan y de la presencia de marcadores clínicos típicos de la patología. Por otro lado, la LT se emplea como un parámetro más dentro de un pool que permite mejorar el diagnóstico de pacientes con

disqueratosis congénita (Alter et al, 2012). En ningún caso la longitud telomérica ha sido empleada para modificar la conducta terapéutica, si bien trabajos recientes muestran asociación entre telómeros cortos y pobre respuesta al tratamiento con inmunosupresores en anemia aplásica.

Telolength® permitirá medir la longitud de los telómeros de cualquier muestra ya sea tejidos, sangre, médula, entre otros. El resultado del análisis dependerá de la calidad de la muestra tomada y de cómo se trate a la misma previamente a la utilización del kit.

5.8 La longitud telomérica en el mercado

Hoy en día distintos hospitales de nuestro país que deseen evaluar la LT en muestras de pacientes que presenten patologías asociadas a la edad, diferentes formas de cáncer, entre otras enfermedades, deben enviar las muestras a los laboratorios que cuentan con líneas de investigación relacionadas al tema en Buenos Aires. Estos laboratorios efectúan la medición de la LT mediante diferentes metodologías (ver pág. 16). **Telolength®** ofrece la posibilidad de medir la LT de manera rápida y sencilla mediante un kit para la técnica de qPCR. En este sentido, los hospitales y médicos interesados se podrían independizar de la necesidad de enviar las muestras a laboratorios de Buenos Aires, pudiendo desarrollar la metodología en su propia Institución.

Cabe destacar que en la actualidad no existen productos semejantes en nuestro país. El único antecedente, es una empresa llamada Life Length⁴, de origen español, que presta el servicio de medición telomérica mediante la técnica de Q-FISH (ver pág. 18). La misma se encuentra en el mercado desde el año 2010, y presta sus servicios tanto a investigadores como a individuos particulares de España.

En el mercado argentino los diferentes equipos de qPCR (necesaria para que el cliente realice el protocolo) requieren de los insumos de la propia marca para ser efectivos; siendo que los termocicladores de Roche, por ejemplo, sólo podrían usar reactivos de Roche los cuales son considerablemente caros. **Telolength®** ofrece la ventaja competitiva de poder ser usado en laboratorios que contengan un equipo de qPCR, sin importar su marca.

Tabla V. Contenido de los tubos del kit.

CONTENIDO	CANTIDADES
MgCl ₂ , dATPs, dTTPs, dGTPs, dCTPs.	Volumen total 472 µl pertenecientes a: 50 µl MgCl ₂ 50mM, 100 µl de cada dNTP 2mM.
EvaGreen®	50 µl 20X
MgCl ₂	50 µl MgCl ₂ 50mM
<i>Primers</i> forward para secuencia telomérica.	20 µl 10µM
<i>Primers</i> reverse para secuencia telomérica.	20 µl 10µM
<i>Primers</i> forward para el gen de copia única.	20 µl 10µM
<i>Primers</i> reverse para el gen de copia única.	20 µl 10µM
Secuencia telomérica estándar en solución.	10 µl a 15pg/µl, 150 pg totales
Secuencia del gen de copia única estándar en solución.	10 µl a 15pg/µl, 150 pg totales

A continuación se detalla lo que constituirá el “manual del usuario”, ofrecido con nuestro kit. El mismo describe información relevante para el buen uso de nuestro producto, sin revelar información que podría ser usada por competidores para su imitación.



Kit para la medición de la longitud telomérica.

Lote N°: 21565411
Fecha de vencimiento: 17/12/2016

Bebri S.A.

Índice

1. Acerca del producto	3
1.1 Cómo funciona este producto	4
1.2 Almacenado y estabilidad	5
1.3 Equipamiento y reactivos adicionales requeridos	6
2. Cómo usar el producto	6
2.1 Antes de comenzar	6
2.2 Preparación de la mix de PCR	7
2.3 Condiciones de ciclado	8
3. Análisis de resultados	8
3.1 Curvas de calibración	8
3.2. Cuantificación absoluta	8
3.3 Procesamiento y análisis de datos	9
3.4 Ejemplo de un análisis de resultados	11
4. Posibles Problemas	13
5. Información adicional	16
5.1 Licencia	16
5.2 Asuntos regulatorios	16
5.3 Trademark	16
CONTACTO Y SOPORTE	16

1. Acerca del producto

Telolength® permite medir de manera absoluta la longitud telomérica. El mismo provee al consumidor de los reactivos necesarios para analizar 50 muestras en un volumen final de PCR de 20 µl cada una, a excepción de la Taq Polimerasa. El producto entrega además los *primers* y oligonucleótidos sintéticos para llevar a cabo las curvas de calibración, necesarias para realizar la cuantificación del largo de los telómeros de manera absoluta. Los oligonucleótidos están representados por los tubos estándar A y B, los cuales contienen la secuencia estándar de los telómeros y del gen de copia única en solución, respectivamente. La Tabla I indica la composición de los distintos tubos que conforman el kit.

Tabla I. Componentes del kit.

RÓTULO TUBO	CONTENIDO
Solución 1	MgCl ₂ , dATPs, dTTPs, dGTPs, dCTPs.
Solución 2	EvaGreen®
MgCl₂	MgCl ₂
Primer A_f	<i>Primers</i> forward para secuencia telomérica.
Primer A_r	<i>Primers</i> reverse para secuencia telomérica.
Primer B_f	<i>Primers</i> forward para el gen de copia única.
Primer B_r	<i>Primers</i> reverse para el gen de copia única.
Estándar A	Secuencia telomérica estándar en solución.
Estándar B	Secuencia del gen de copia única estándar en solución.

1.1 Generalidades

TeloLength® es un kit para PCR en tiempo real (qPCR) que utiliza Eva Green®, análogo al SYBR Green, para la detección de los productos amplificados. El protocolo a seguir con nuestro kit incluye dos PCRs consecutivas que permitirán amplificar la región específica de telómeros y un gen de copia única, respectivamente. Este último es útil para normalizar la cantidad de repeticiones telomérica en la muestra y además para controlar la calidad del ADN a evaluar. Simultáneamente, será necesario construir curvas de calibración para cada PCR con oligonucleótidos sintéticos, de manera de poder cuantificar absolutamente la cantidad de producto generado en cada tubo de reacción.

TeloLength® brinda conveniencia, alto rendimiento y reproducibilidad, a la vez que reduce la posibilidad de contaminaciones, ya que provee los reactivos necesarios. Únicamente deberá agregar la enzima taq polimerasa y el templado de ADN de interés.

Principio del test: La generación de productos de PCR puede ser detectada por la señal fluorescente emitida por el Eva Green®, el cual se intercala en el ADN de doble cadena. En solución, el Eva Green® no unido exhibe muy poca fluorescencia; sin embargo, la fluorescencia emitida (525 nanómetros) es aumentada luego de la unión al ADN. Por lo tanto, durante la reacción de PCR, el aumento en la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena generado.

Los pasos básicos en la detección del Eva Green®, durante una qPCR son:

- 1- Al inicio de la amplificación, la solución de reacción contiene el ADN desnaturalizado, los *primers*, los oligonucleótidos y el Eva Green®. Las moléculas de fluoróforo no unidas emiten señal de fluorescencia muy débil, produciendo una línea de base o ruido de señal fluorescente.
- 2- Luego de la hibridización de los *primers*, una pequeña cantidad de Eva Green® pueden unirse al ADN doble cadena que se va generando. La unión al ADN de doble cadena resulta en un aumento significativo de la fluorescencia emitida luego de la excitación con la longitud de onda adecuada.
- 3- Durante la elongación, cantidades crecientes de Eva Green® se unen a nuevas cadenas de ADN doble cadena sintetizadas. Si la reacción es monitoreada continuamente, un

aumento en la fluorescencia es visible a tiempo real. Durante la etapa de desnaturalización del siguiente ciclo, las moléculas de Eva Green® son liberadas por lo que la señal de fluorescencia decae.

4- En cada ciclo de PCR, al finalizar la etapa de elongación, se realiza la medición de la fluorescencia de manera de monitorear la cantidad creciente de ADN doble cadena.

Para demostrar que sólo su ADN de interés ha sido amplificado durante la reacción, se recomienda realizar una curva de *melting* luego de la PCR. En el análisis de la curva de *melting*, la solución de reacción es calentada lentamente hasta los +95°C, lo que causa la desnaturalización de la doble cadena del ADN y como consecuencia una disminución en la fluorescencia emitida por el Eva Green®, ya que el ADN queda como simple hebra y este se disocia. El equipo monitorea continuamente el decaimiento de la fluorescencia y lo muestra como picos de *melting*. Cada pico de *melting* representa la temperatura de *melting* (T_m) característica de cada producto de PCR (en donde el 50% del producto se encuentra como doble hebra y el otro 50% se encuentra como simple hebra). Los factores más importante que determinan la T_m de un ADN de doble cadena son: la longitud y el contenido de GC de los fragmentos. Si la PCR generó sólo un producto, el análisis de la curva de *melting* mostrará sólo un pico de *melting*. Si se generaron dímeros de *primers*, hubo alguna contaminación o se amplificó algo de manera inespecífica habrá más de un pico de *melting*.

Es importante aclarar que en el caso de la curva de *melting* correspondiente al gen de copia única, se obtendrá un solo pico ya que su longitud y el contenido de GC no varían en los productos amplificados. Por el contrario, en el caso de los telómeros estos tendrán diferentes picos de *melting* ya que el producto de los mismos tiene distinto tamaño, así como también diferente contenido de GC.

1.2 Almacenado y estabilidad

El producto será trasladado en hielo seco, una vez que el kit sea abierto se lo deberá guardar a temperaturas que estén dentro del rango -25°C a -15°C hasta la fecha de vencimiento del producto.

Es muy importante mantener el tubo que contiene el Eva Green® alejado de la luz (Frasco solución 2), ya que el mismo es fotolábil. El Eva Green® es estable por al menos

12 meses desde la fecha de envasado, siempre y cuando se lo guarde en las condiciones apropiadas (4°C o menos y alejado de la luz). Cuando se vaya a utilizar el tubo que contenga el fluoróforo, se recomienda vortexear la solución por algunos segundos, por si quedara algo de Eva Green® adosado a la pared del tubo, y además para asegurarse la disolución del mismo.

1.3 Equipamiento y reactivos adicionales requeridos

- ✓ Un termociclador para llevar a cabo la reacción de amplificación. El kit puede ser utilizado en cualquier aparato de qPCR disponible en el mercado.
- ✓ Enzima taq polimerasa para llevar a cabo la reacción de amplificación.
- ✓ Tips con filtro y estériles
- ✓ Micropipetas
- ✓ Tubos eppendorfs estériles para preparar las *mixes* y las diluciones.

2. Cómo usar el producto

2.1 Antes de comenzar

Templado: Utilizar ADN genómico proveniente de cualquier tipo de muestra (sangre, tejido, médula, etc), con su correspondiente procesamiento para obtener ADN de muy buena calidad para una reacción de qPCR en términos de pureza, concentración y ausencia de inhibidores.

Se recomienda llevar a cabo la metodología con 20 ng de ADN genómico, ya que usar mayores cantidades de templado puede reducir el máximo de la señal de fluorescencia, mediante la competición con el Eva Green®.

Primers: Utilizar *primers* a una concentración final entre 0,2 μM y 1 μM . La concentración recomendada para comenzar es 0,5 μM de cada *primer*.

Cloruro de Magnesio: La mix se brinda con la concentración adecuada de Magnesio para llevar a cabo las reacciones de cuantificación de longitud telomérica. Dado que diferentes termocicladores pueden necesitar modificaciones en las cantidades de magnesio a emplear, el kit provee un tubo con Cloruro de Magnesio adicional.

Control Negativo: Siempre se debe amplificar un control negativo con las muestras. Para preparar un control negativo, se debe reemplazar el templado de ADN por agua de PCR.

2.2 Preparación de la mix de PCR

Preparar la mix de PCR (ver Tabla II) teniendo en cuenta la cantidad de muestras a evaluar, el control negativo, los cinco estándares de la curva de calibración (ver sección 3.1) y considerar un adicional del 5% por errores de pipeteo.

Tabla II. Componentes de la mix de PCR.

	Componentes	Volumen para una muestra (μl)
Mix	H ₂ O ultra pura	2 μl
	Solución 1	11 μl
	Solución 2	1 μl
	<i>Primer forward</i> *	1 μl
	<i>Primer reverse</i> *	1 μl
	Enzima taq polimera	1-5 unidades
	ADN genómico (5ng/ul)	4 μl (20 ng totales)
Volumen total		20 μl

*En caso de efectuar la qPCR para amplificar telómeros utilizar los *primers* rotulados Af y Ar; para llevar a cabo la qPCR del gen de copia única emplear los *primers* rotulados Bf y Br.

Protocolo

1	Descongelar el agua ultra pura.
2	Descongelar el tubo con solución 1 y el tubo correspondiente a la solución 2.
3	Vortexear el tubo con Eva Green® (solución2) para hacer descender cualquier resto que haya quedado adosado a la pared del tubo, además de asegurar que el fluoróforo está completamente diluido.
4	Tomar el volumen necesario del tubo con solución 1 y del tubo con solución 2. Agregárselo al tubo con el agua.
5	Mezclar gentilmente por pipeteo. Guardar en hielo.
6	Tomar el volumen de <i>primers</i> correspondiente. Agregarlos al tubo con la mix.
7	Agregar a la mix las unidades necesarias de la enzima taq polimerasa.
8	Agregar con sumo cuidado la cantidad ADN muestra o agua si se trata del control negativo. Centrifugar suavemente y colocar los tubos en el equipo de qPCR.

2.3 Condiciones de ciclado

Una vez preparados los tubos de PCR, encender el termociclador. A continuación, identificar el orden de las muestras a analizar y la cantidad de cada uno de los estándares en el software del equipo. Las condiciones de ciclado son: 95°C 10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C 15 s y 60°C 1 min; la curva de *melting* se deberá realizar con 1 ciclo de 95°C 20 s, 50°C 15 s y 98°C con una rampa de temperatura de 0,1°C/s. Una vez finalizada la qPCR descartar los tubos de reacción.

3. Análisis de resultados

3.1 Curvas de calibración

Para la realización de las curvas de calibración, se deberán efectuar diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000) del oligonucleótido sintético que contiene 14 repeticiones de la secuencia telomérica TTAGGG (Estándar A) para la qPCR de telómeros. Repetir los pasos con el oligonucleótido del gen de copia única (Estándar B) para la amplificación del mismo.

3.2 Cuantificación absoluta

Dado que ambas curvas de calibración se efectúan con oligonucleótidos sintéticos, se puede calcular el número de repeticiones teloméricas y de copias del gen de copia única presentes en cada dilución del estándar. Los cálculos se realizan de la siguiente manera:

Para el estándar telomérico:

- La secuencia presenta una longitud de 84 pb, cuyo peso molecular (PM) es de 26667,2.
- El peso de una molécula es su PM/número de Avogadro. Por lo tanto, el peso de una molécula de estándar es $26667,2/6,02 \times 10^{23} = 0,44 \times 10^{-19}$ g/molécula.
- El primer punto de la curva de calibración, que contendrá el estándar más concentrado, se efectúa con 60 pg de oligonucleótido (60×10^{-12} g) por reacción.
- El mismo contiene $60 \times 10^{-12} \text{ g} / 0,44 \times 10^{-19} \text{ g/molécula} = 1,36 \times 10^9$ moléculas de oligonucleótido.

- La cantidad de secuencia telomérica en el punto más concentrado del estándar es entonces: $1,36 \times 10^9$ moléculas \times 84 pb = $1,18 \times 10^8$ kb.

Para el gen de copia única:

- El estándar presenta una longitud de 75 pb, con un PM de 23268,1.
- El peso de una molécula del estándar es su PM/número de Avogadro: $23268,1/6,02 \times 10^{23} = 0,38 \times 10^{-19}$ g/molécula.
- El punto de la curva más concentrado tendrá 200 pg de oligonucleótido estándar (200×10^{-12} g).
- El mismo contiene $200 \times 10^{-12} \text{ g} / 0,38 \times 10^{-19} = 5,26 \times 10^9$ copias del amplicón.
- Dado que se tienen 2 copias del gen de copia única por genoma diploide, el estándar más concentrado tendrá $2,63 \times 10^9$ copias por genoma diploide.

A modo de ejemplo, las figuras 1A y 1B indican las curvas de amplificación de los estándares (cada estándar se amplifico por duplicado) y los picos de *melting* que el usuario debería de obtener con **Telolength®**.

3.3 Procesamiento y análisis de datos

- Chequear que no hubo amplificación en el tubo considerado como control negativo.
- Observar que tanto las muestras como los estándares de las curvas de calibración hayan amplificado.
- Revisar la variación de los duplicados. Únicamente se aceptaran aquellas muestras que tengan desviaciones menores a un ciclo de amplificación entre replicas. De este modo se asegura que el análisis de los resultados sea correcto.
- Chequear la linealidad de las curvas de calibración (eficiencia entre 90- 100%). Descartar del análisis de resultados aquellas muestras que hayan amplificado por fuera del rango lineal de la curva de calibración.

Los resultados obtenidos de ambas qPCRs (telómeros y gen de copia única) deberán ser exportados a una planilla de Excel para efectuar los cálculos finales. Para una muestra dada, el resultado obtenido de la qPCR de telómeros (kilobases/reacción) dividido el número de copias del gen de copia única (resultado de la qPCR del gen de copia única) indicara la longitud telomérica absoluta de esa muestra (kilobases/genoma diploide). Además,

este resultado podría ser empleado para estimar una longitud por telómero, dividiendo al mismo por 92 (92 es el número total de telómeros encontrados en 23 pares de cromosomas en células normales humanas).

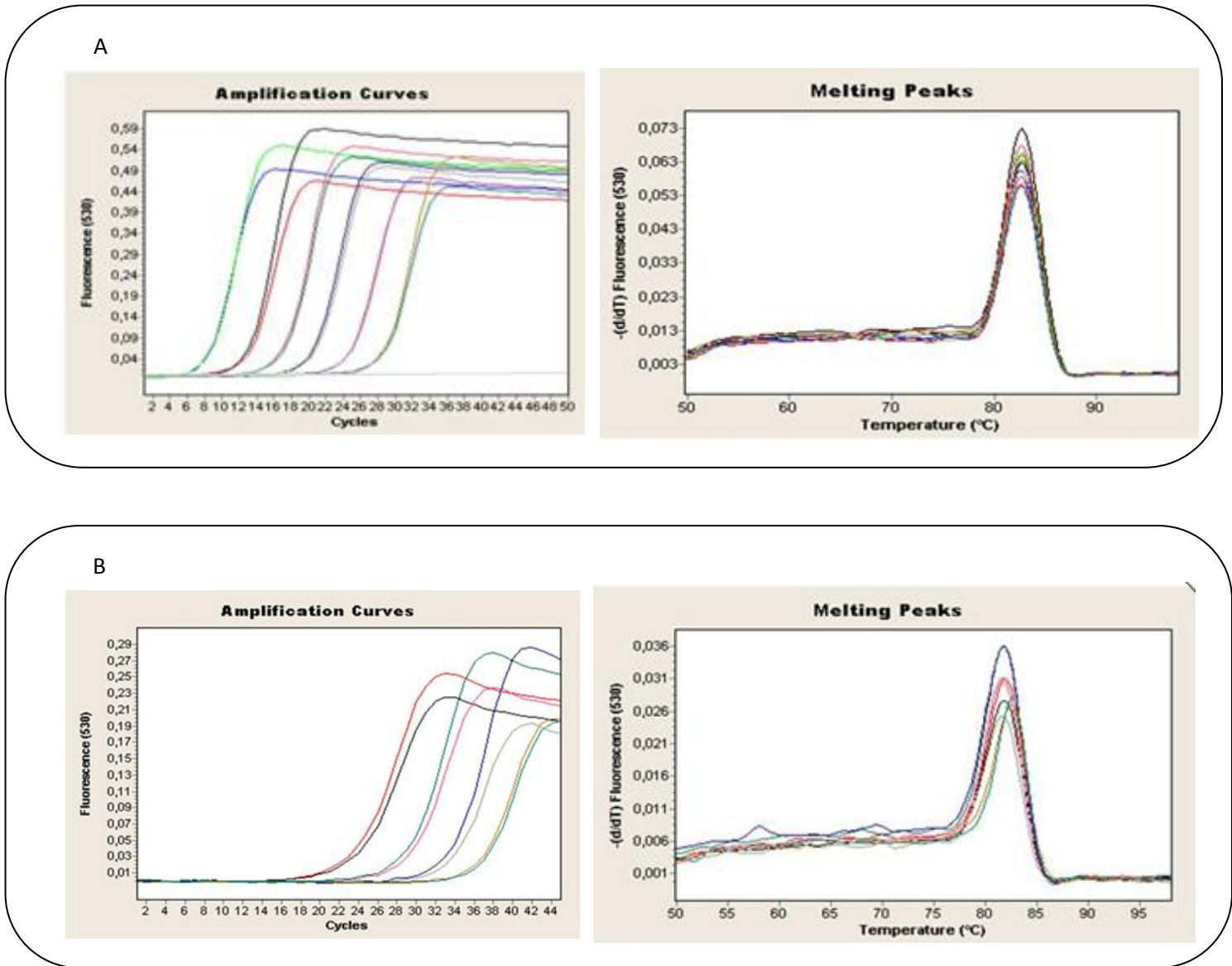


Figura 1: Curvas de calibración y picos de *melting* con el estándar del gen de copia única. (A) y telómeros (B). Nota: el termociclador empleado para el ejemplo fue Roche, no obstante los mismos resultados serán obtenidos con los diferentes equipos de qPCR.

3.4 Ejemplo de un análisis de resultados

La Figura 2 muestra las curvas de amplificación de un set de muestras de ADN de sangre periférica de individuos sanos de diferentes edades cronológicas efectuada por nuestra empresa, utilizando el aparato de qPCR de Roche. Los picos de *melting* del gen de copia única deberán tener la misma temperatura de *melting* para todas la muestras, dado que a igual cantidad de ADN por muestra igual cantidad de copias del gen 36B4. Contrariamente, los picos de *melting* de los telómeros comprenderán diferentes temperaturas que derivan del largo que presenten los mismos en cada tubo de reacción.

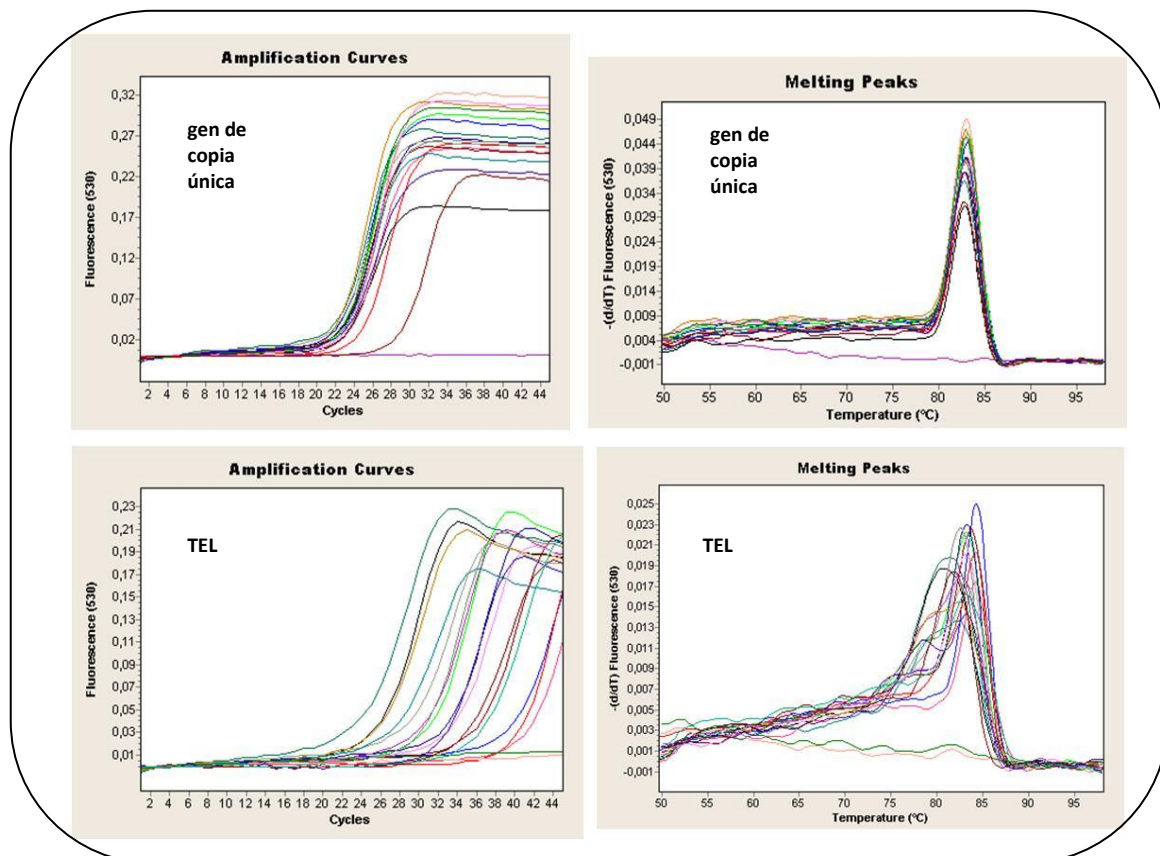


Figura 2: Ejemplo de curvas de amplificación y picos de *melting* en muestras de ADN genómico de individuos sanos. Se analizó la longitud de los telómeros (TEL) y la cantidad de copias del gen de copia única presente en una misma muestra mediante reacciones de qPCR separadas.

Asimismo, la Figura 3 muestra la correlación ente la longitud telomérica de estos individuos y su edad cronológica. La misma puede ser considerada únicamente a modo de ejemplo, dado que los valores pueden verse modificados en función del tipo de tejido a emplear y el equipo de qPCR que el usuario tenga a disposición.

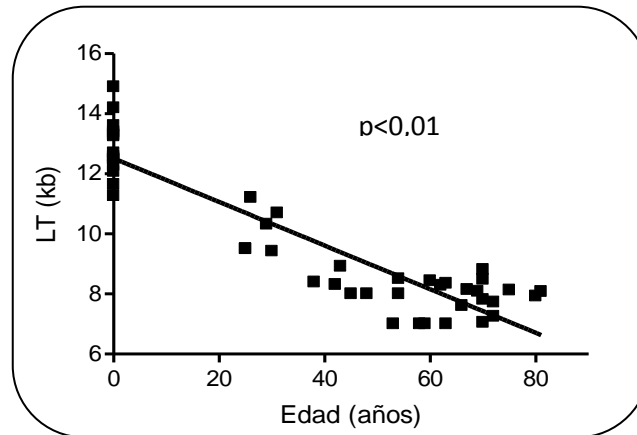


Figura 3: Correlación inversa entre LT y la edad cronológica de individuos sanos.
Nota: se considera como edad cero a las muestras de cordón umbilical por ser un tejido joven que no presenta reducción de la longitud telomérica (LT).

4 Posibles Problemas

	Posibles causas	Recomendaciones
La amplificación alcanza la fase <i>plateau</i> antes que el programa termine.	Una gran cantidad de ADN de partida.	Hacer una curva de calibración con diluciones de ADN para encontrar la cantidad apropiada.
	El número de ciclos es muy alto.	Reducir el número de ciclos en el programa de amplificación
La fase log-lineal de la amplificación recién empieza cuando el programa de amplificación termina.	Muy poca cantidad de ácido nucleico.	*Mejorar condiciones de PCR *Utilizar concentraciones mayores de templado. *Repetir la qPCR.
	El número de ciclos es muy bajo.	Aumentar el número de ciclos en el programa de amplificación
No hay amplificación.	Se eligió un canal erróneo para la visualización de la amplificación.	Cambiar la configuración del canal en la pantalla de programación.
	La enzima no esté funcionando correctamente.	Chequear efectuando una qPCR con otro stock de enzima.
	Errores de pipeteo u olvido de algún reactivo.	*Chequear reactivos faltantes. *Hacer curva de magnesio para ver si es necesario aumentar su cantidad.
	Escala en los ejes del gráfico no sea la adecuada para el análisis.	Cambiar los valores para los ejes "x" e "y" a valores más adecuados para el análisis. Si su termociclador es Roche, se puede guiar a través de la Figura 1.
	No ocurre la medición.	Chequear el programa de amplificación. Es importante que se chequee que la configuración sea la correcta para detectar la señal emitida por el Eva Green®.

	Impurezas en el templado que inhiban la reacción.	*Diluir la muestra 1:10 y repetir el análisis. *Re-purificar los ácidos nucleicos de manera de asegurar la remoción de los agentes inhibidores.
	Baja concentración o deterioro del Eva Green® en las mezclas de reacción, debido a malas condiciones de almacenamiento del kit.	*Guardar el Eva Green® a temperaturas que estén dentro del rango -15°C y -25°C. Además, mantenerlo fuera del alcance de la luz. *Evitar repetidas congelaciones y descongelaciones. *Luego del descongelado, guardar la mix con el Eva Green® entre +2°C y +8°C por un máximo de una semana, y siempre alejándolo de la luz.
	Las condiciones de reacción no estén optimizadas, llevando así a una pobre eficiencia de la PCR.	*Revisar las condiciones sugeridas para TeloLength® , sección 2.3. *Siempre se debe correr un control positivo junto con la muestra.
La señal fluorescente es muy baja.	La cantidad de ADN genómico de partida es muy alta; el DNA captura el Eva Green®, llevando a un aumento del ruido en la reacción.	*No utilizar más de 20 ng de ADN genómico en una reacción de 20 µl.
	Ocurrió <i>quenching</i> en el tubo que contiene Eva Green®.	Asegurarse que todos las mixes que contenían Eva Green® hayan sido almacenadas fuera del alcance de la luz. Evitar repetidas congelaciones y descongelaciones.

<p>La curva de amplificación alcanza el <i>plateau</i> a un nivel de señal menor que otras muestras.</p>	<p>Contaminación o presencia de dímeros de <i>primers</i>.</p>	<p>*Rehacer todas las soluciones. *Pipetear los reactivos en un recipiente limpio.</p>
<p>El control negativo da positivo.</p>	<p>Variaciones en las mixes de reacción (por ejemplo concentración de sales)</p>	<p>*Chequear la pureza de la mezcla que contiene el templado. *Reducir variaciones en parámetros como Cloruro de Magnesio, preparación de <i>primers</i> y la configuración del programa de qPCR.</p>
<p>Presencia de más de un pico de <i>melting</i> para el gen de copia única.</p>	<p>Dímeros de <i>primers</i> superan la amplificación de productos específicos de PCR.</p>	<p>*Mantener todas las muestras entre +2°C y +8°C hasta efectuar la qPCR. *Reducir lo máximo posible el tiempo que existe entre la preparación de la muestra y el comienzo de la qPCR. *Aumentar la cantidad de ADN de partida. *Aumentar la temperatura de <i>annealing</i>, con el fin de aumentar la astringencia.</p>
<p>Aparece sólo un pico de dímeros de primer, sin un producto específico de PCR; o bien picos de dímeros de <i>primers</i> muy altos.</p>	<p>Contaminación en todas las muestras.</p>	<p>*Usar soluciones frescas. *Trabajar con el máximo cuidado para evitar contaminaciones.</p>

5 Información adicional

5.1 *Licencia*

Eva Green® es producido por la empresa Biotum y es suministrado bajo licencia de Biotum, para uso directo en las reacciones de PCR.

5.2 *Asuntos regulatorios*

Para uso en investigación únicamente. No para uso en diagnóstico.

5.3 *Trademark*

Telolength® es marca de **Bebri S.A.**

Eva Green® es una marca registrada de Biotum.

CONTACTO Y SOPORTE

Si usted tiene preguntas o problemas con el producto, por favor no dude en contactarnos.

Para llamar, enviar un fax o un mail, por favor visite nuestra página web⁵ en dónde encontrará toda la información necesaria para entrar en contacto con la empresa. Además, en la página web, especialmente en la pestaña referida al kit **Telolength®** se podrán visualizar las preguntas y respuestas frecuentes (*FAQs*), el *Data Sheet* en formato digital, y las hojas de seguridad de los distintos reactivos contenidos en el producto.

6.2 Análisis del mercado

Los modelos para comprender el entorno de las organizaciones se organizan en una serie de capas. La capa más general suele conocerse como el macroentorno. Consiste en los factores generales del entorno que afectan en mayor o menor medida a casi todas las organizaciones. Es importante comprender cómo es probable que afecten los cambios del macroentorno a las organizaciones individuales. En este sentido, la herramienta PESTEL permite identificar cómo pueden afectar a las organizaciones las tendencias políticas, económicas, sociales, tecnológicas, ecológicas y legales.

La siguiente capa es la de industria o el sector. Se trata de un grupo de organizaciones que fabrican los mismos productos u ofrecen los mismos servicios. El modelo de las cinco fuerzas de Porter puede resultar útil para comprender cómo cambia la dinámica competitiva dentro y fuera del sector.

Por último, está la capa de los competidores y los mercados. En la mayoría de las industrias o sectores habrá muchas organizaciones distintas con sus propias características y compitiendo sobre bases diferentes. (Johnson *et al*, 2006)

6.2.1 Análisis del macroentorno

El análisis del macroentorno está formado por variables que afectan directa e indirectamente la actividad comercial; es por ello que este análisis es de suma importancia, ya que permite anticiparse a los competidores y a los cambios en el mercado (Rivera Camino y López Rúa, 2012).

Se seleccionó la herramienta PESTEL (político, económico, social, tecnológico, ecológico y legal) para realizar este análisis, ya que abarca por completo el macroentorno.

POLÍTICO

- Estabilidad del Gobierno: Es una línea política establecida desde el 2003, la cual no ha presentado grandes cambios dentro de su ideología política. Todos sus proyectos han sido muy fuertemente protegidos frente a las potenciales solicitudes de cambio. La estabilidad en

las decisiones del gobierno nos ayuda a proyectar nuestras conclusiones políticas hasta por lo menos el tiempo que siga el Gobierno en el poder.

- Política Fiscal: El gobierno ha mantenido a lo largo del tiempo una fuerte presión fiscal, exteriorizada por las autoridades de aplicación las cuales son entidades descentralizadas del Gobierno Nacional y distintos Gobiernos Provinciales de su línea política. No nos afectaría demasiado, ya que al estar situados en el Parque Industrial se nos exime de numerosos impuestos como ser: los de derechos de construcción y tasas de servicios generales, los de tasas de habilitaciones, los provinciales contemplados en la Ley Provincial N° 13.656 de Promoción Industrial, y los de Tasa de Servicios Generales con la Habilitación definitiva. Si debemos pagar la tasa de Seguridad e Higiene pero con un diferencial del 2,5 por mil sobre facturación. En lo que si podríamos sufrir una fuerte presión fiscal es en los impuestos a las ganancias y en los impuestos a los ingresos brutos. Una cantidad mucho menor de impuestos que el resto de las empresas a las cuales se les suman los impuestos provinciales.

- Reglamentos sobre Comercio: Se ha modificado la reglamentación sobre las empresas de medicina prepaga. Las relaciones comerciales están a cargo del Secretario de Comercio, Guillermo Moreno, cuya figura es bastante polémica para una gran parte de la población; por los resultados adversos derivados de su política comercial. Nos puede llegar a afectar tanto negativa como positivamente las decisiones arbitrarias de Moreno.

- Transparencia en los actos de Gobierno: La Organización Mundial de Comercio destacó en su último análisis que existe una aparente falta de transparencia en la aplicación de medidas dispuestas por el Gobierno. Así como también cuestiona las mediciones que realiza el Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina (INDEC). Al no haber transparencia en los actos de Gobierno se nos hará muy difícil poder fundamentar nuestras proyecciones, ya que datos como los de la inflación y situación de los ciudadanos Argentinos están publicados por el INDEC, institución que no se destaca por publicar la realidad.

ECONÓMICO

- Restricción a las importaciones: Favorece el desarrollo de la Industria Nacional, será una ventaja competitiva para nuestro producto, el cual estará mayormente hecho por componentes nacionales. El país se caracteriza por un aumento en el uso de restricciones de tipo no

arancelario, principalmente relacionadas con requisitos de registro y procedimientos de importación y exportación y licencias de importación.

- Ciclos de expansión y contracción: Según un estudio reciente realizado por Juan Marío Jorrat^{6, 7 y 8}, investigador y director del proyecto Ciclos Económicos y Crecimiento de la Universidad Nacional de Tucumán, la economía Argentina entró en recesión en noviembre de 2011. Esta situación nos afecta negativamente, ya que implica la disminución generalizada de la actividad económica del país.

- Préstamos: Tanto el Gobierno de la Ciudad como el Gobierno Nacional otorgan préstamos a jóvenes emprendedores. Se solicitó un crédito BICE del Banco Credicoop (TNA 17%) para cubrir la inversión inicial del proyecto (Anexo B). El mismo está destinado a la adquisición de bienes de capital nuevos (nacionales e importados), e inmuebles destinados a la actividad productiva de la Pyme o Empresa (excepto terrenos y campos) en pesos.

- Inflación: La inflación anual perteneciente al año 2013, según Consultoras privadas llegó a un 28,38%⁹. En contraposición, el Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina plantea una inflación anual de 10,9%¹⁰. La inflación hace difícil la realización de presupuestos y planes a largo plazo, por lo que no se la incluyo en el análisis de costos del proyecto. A su vez la misma puede actuar como un lastre para la productividad de nuestra empresa, que puede verse obligada a detraer capital destinado a la producción de bienes y servicios con el fin de recuperar las pérdidas causadas por la inflación de la moneda. Sumado a esto, el cepo cambiario aplicado en nuestro país desde el año 2011 dificulta de sobremanera la obtención de dólares, moneda con la cual se sentiría menos la suba de los precios.

SOCIO-CULTURAL

- Demografía: La población de la República Argentina de acuerdo con el censo del 27 de octubre de 2010 que realizó el INDEC asciende a 40.117.096 habitantes, con una densidad media de 14,4 habitantes/km². Es un país con baja densidad de población (14,4 habitantes/km²), muy concentrada en el Aglomerado Gran Buenos Aires (38,9%), mayoritariamente urbana y con una gran proporción de personas mayores de 60 años (14,3%). Tiene altas tasas de esperanza de vida (77,14 años). Dentro del rango 15-64 años hay

12.654.528 varones y 14.135.603 mujeres representando el 64,3% de la población total. Por último dentro del rango de los 65 años en adelante hay 1.674.142 varones y 2.490.846 mujeres los cuales representan el 10,2% de la población total. Nuestro producto apunta a estos dos segmentos mencionados, los cuales representan la mayoría de la población. Así como también está principalmente destinado a comercializarse en Capital y Gran Buenos Aires, lugar donde se encuentra la mayor concentración de personas.

- Movilidad Social: Utilizando datos de la Encuesta Permanente de Hogares, el estudio llevado a cabo por Pablo Dalle (Cambios recientes en la estratificación social en Argentina (2003-2011). Inflexiones y dinámicas emergentes de movilidad social) muestra el crecimiento de estratos de clase media asalariada y de la clase obrera calificada desde 2003. El intenso proceso de asalarización junto a la expansión del empleo registrado en la seguridad social abrió canales de movilidad ascendente desde un estrato no calificado y precarizado de las clases populares. Una mayor movilidad ascendente nos permitiría tener un segmento más poblado al cual apuntar nuestra mezcla de marketing mix.

- Consumismo: Nuestra unidad estratégica de negocio no entra dentro de la categoría de producto estacional ya que no tiene un período crítico de venta. Este estudio será solicitado por el médico cuando lo considere pertinente para cada paciente.

TECNOLÓGICO

- Gasto Público en Investigación y Desarrollo: La Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) apoya, a través del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FonCyT), proyectos de investigación cuya finalidad sea la generación de nuevos conocimientos científicos y tecnológicos. Se puede pedir subsidios para el desarrollo de nuevos productos de manera de ampliar nuestra cartera de negocios.

- Tecnología disponible: Se encuentra disponible actualmente en la Argentina la tecnología necesaria para el desarrollo del producto.

ECOLÓGICO

- Leyes de protección medio ambiental: Detalladas en el Anexo C. Estas leyes deberán regir la forma de trabajo en el laboratorio de manera “amigable” con el medio ambiente,

implicando una inversión, principalmente de esfuerzos, en desechar los residuos como corresponden y contaminar en la menor medida posible.

LEGAL

- Legislación sobre la competencia: En Argentina la ley 25.156 establece la ley de “Defensa de la competencia”, la cual en su articulado habla de que “todas las personas físicas o jurídicas en todo o en parte del territorio nacional, y las que realicen actividades económicas fuera del país, en la medida en que sus actos, actividades o acuerdos puedan producir efectos en el mercado nacional” quedan comprendidas en esta ley.

Además, establece las conductas que quedan prohibidas por dicha ley en los artículos 1 y 2 (ver Anexo D). **Bebri S.A.** deberá seguir los requisitos de esta legislación para poder operar en el país; si bien actualmente la competencia directa no existe, es potencial y en algún momento podría surgir.

- Legislación laboral: se deberá realizar contratos de trabajo por tiempo indeterminado, contando con un plazo llamado período de prueba, el cual será de 3 meses. Se le deberá abonar un sueldo, el cual es una contraprestación por el trabajo realizado por el trabajador, teniendo como base el sueldo mínimo vital y móvil (\$3.600 mensual) y el SAC (sueldo anual complementario) más conocido como “aguinaldo” el cual es el pago de una doceava parte de la suma de todos los sueldos en 1 año de trabajo.

- La jornada laboral no podrá superar las 8 horas diarias, o 48 horas semanales, debiendo haber una pausa no menor de 12 horas entre el cese de una jornada y el comienzo de otra.

- Queda prohibida la ocupación del trabajador desde las trece (13) horas del día sábado hasta las veinticuatro (24) horas del día siguiente, salvo en los casos de excepción previstos en el artículo precedente y los que las leyes o reglamentaciones prevean, en cuyo caso el trabajador gozará de un descanso compensatorio de la misma duración, en la forma y oportunidad que fijen esas disposiciones atendiendo a la estacionalidad de la producción u otras características especiales.

- El trabajador gozará de un período mínimo y continuado de descanso anual remunerado por los siguientes plazos establecidos en la norma.

- El empleador también deberá contribuir al Sistema Integrado de Jubilaciones y Pensiones, Asignaciones Familiares, Fondo Nacional de Empleo, Obra Social y Fondo Solidario de Redistribución y el trabajador aportará a los mismos fines, en lo que engloba a la seguridad social.

Todo lo mencionado aquí es relevante para la empresa, ya que implica costos que se deberán tener en cuenta; como por ejemplo, los sueldos, las cargas sociales, etc.

- Salud y Seguridad: A los trabajadores se les deberá proveer las herramientas necesarias para su trabajo, y todo lo que concierne a su seguridad incluyendo elementos tales como: guantes, antiparras, calzado especial, etc. Asimismo, el empleador deberá contar con una Aseguradora de Riesgo de Trabajo para eventuales accidentes que el trabajador pueda tener dentro del establecimiento donde desarrolla su actividad o en el trayecto que tiene desde su hogar al establecimiento y viceversa. Este aspecto influye en los costos de la empresa.

- El trabajador debe permanecer con buena salud, lo cual es el completo bienestar físico, mental y social y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades. El entorno del lugar de trabajo deberá cumplir las normas de higiene, limpieza y salubridad; garantizando así la buena salud de los trabajadores.

- Registro del producto en la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica: Nuestro producto pertenece a la categoría A (todos los productos destinados al diagnóstico de enfermedades no infecciosas o no transmisibles) según la disposición 2674/99, por lo tanto debería ser registrado mediante la disposición 2275/06. Dentro de la misma hay un apartado que especifica las excepciones dentro del grupo A que deben registrarse mediante la utilización de otra disposición. Una de estas excepciones refiere a productos destinados a la detección de marcadores tumorales como puede llegar a ser nuestro caso, si esto es así el mismo debería ser registrado mediante la disposición 2674/99.

- Habilitación inicial de Empresa: Se deberá solicitar la Autorización de funcionamiento inicial de empresa de acuerdo al formulario AFE-HI, para poder empezar las actividades de **Bebri S.A.**

6.2.2 Análisis del microentorno

El análisis del microentorno está orientado al estudio de los clientes/usuarios potenciales, la competencia, los intermediarios y los proveedores. Este análisis es fundamental puesto que las pequeñas empresas pueden influir sobre él, al definir estrategias para atraer clientes y competir. El mismo fue realizado por medio de la herramienta FODA (ver Tabla VI) que consiste en estudiar cuáles son los puntos fuertes y débiles de la empresa, en relación con las amenazas y oportunidades que ofrece el mercado. A partir del análisis, se desarrollaron las siguientes estrategias:

- ✓ Estrategias FO (Fortalezas con Oportunidades): En un mercado creciente y con diversidad de equipos, ofrecemos un kit compatible con todos ellos. Frente a la restricción a las importaciones presentamos un kit de uso universal y producción nacional.

- ✓ Estrategias DO (Debilidades ante Oportunidades): Desarrollar campañas de concientización sobre la importancia de la medición de telómeros como herramienta de prevención, y poder así convertirla en una oportunidad de negocios (ampliando el conocimiento, se amplía la demanda). Hacer que las obras sociales incorporen la medición telomérica en sus estudios cubiertos.

- ✓ Estrategias FA (Fortalezas para enfrentar las Amenazas): Innovaciones tecnológicas y de calidad para poder controlar la posible entrada de competidores.

- ✓ Estrategias DA (Debilidades para resistir Amenazas): Acelerar la instalación en el mercado con el fin de disminuir la afección que los problemas económicos y políticos puedan causar la empresa. Lograr consolidar **Bebri S.A.** en el mercado.

Asimismo, se analizó la rivalidad competitiva de la empresa dentro de la industria mediante las cinco fuerzas de Porter (Fig. 6): las amenazas de los nuevos integrantes, el poder de negociación de los proveedores, el poder de negociación de los compradores, la amenaza de productos o servicios sustitutos y la rivalidad entre los actuales participantes (De Kluyver C, 2001).

Tabla VI. Análisis FODA

Fortalezas	Debilidades
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Se podrá utilizar en cualquier equipo de qPCR ✓ Protocolo práctico y sencillo. ✓ Se requiere poca cantidad de ADN muestra. ✓ Largo plazo de vencimiento ya que el Eva Green® dura más que el Sybr Green (reactivo que cumple la misma función) ✓ Proveemos de los oligonucleótidos sintéticos que permiten construir una curva de calibración. ✓ Proveemos curva estándar de individuos sanos para comparar los resultados obtenidos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nuevos en el mercado. ✓ Falta de experiencia. ✓ Ofrecemos un solo producto del cual dependemos enteramente para el éxito. ✓ El público desconoce la importancia de los telómeros en la salud.
Oportunidades	Amenazas
<ul style="list-style-type: none"> ✓ El producto no tiene competidores directos. ✓ Nueva categoría en el mercado Argentino. ✓ Proteccionismo del Estado a empresas nacionales. ✓ Aumento estudio de los telómeros. ✓ Dificultad de aprovisionamiento de kits para algunas marcas extranjeras de equipos por restricciones a la importación. ✓ Diversidad de equipos con diferentes kits específicos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Imprevisibilidad política que afecta más a una empresa <i>start-up</i> ✓ Inestabilidad económica que afecta más a una empresa <i>start-up</i> ✓ Potencial de copia por parte de competidores. ✓ Aumento competencia en el mercado. ✓ Dudoso mantenimiento de equipos por falta de repuestos. ✓ Mal manejo del kit.

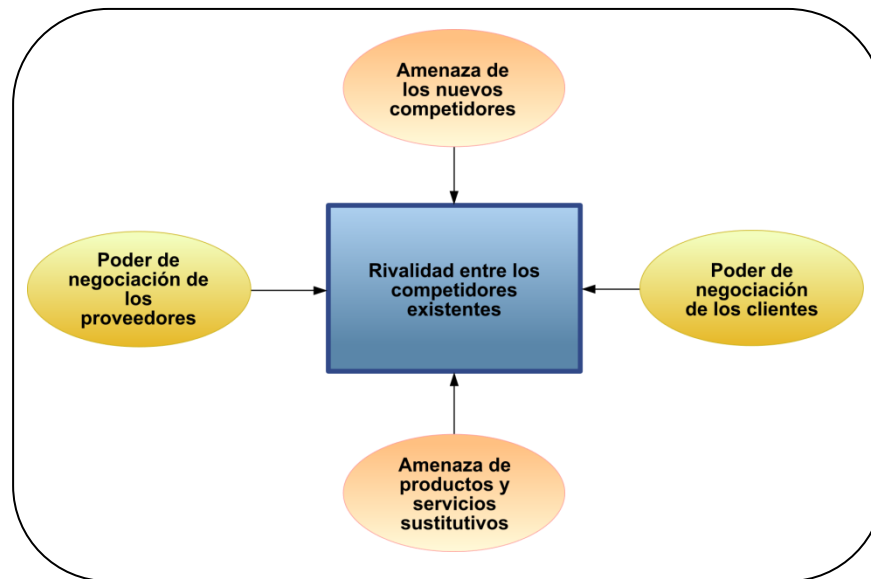


Figura 6: Modelo de las cinco fuerzas de Porter (Porter M, 2002).

La amenaza de entrada: La amenaza de entrada dependerá del grado en que existan barreras de entrada. Estas barreras son factores que tienen que superar los nuevos entrantes si quieren competir con éxito. Las barreras a las que nos enfrentamos son:

- Las economías de escala. Son las ventajas en términos de costos que una empresa obtiene gracias a la expansión. En el caso de **Bebri S.A.**, no se competiría a escala con las demás empresas del sector porque nuestra empresa apunta a un nicho específico del mercado.
- El requisito de capital para la entrada. El costo de capital de la entrada dependerá de la tecnología y de la escala. Nuestras barreras de entrada no son significativamente altas ya que nos especializamos en un segmento muy específico del mercado, el cual no es muy tenido en cuenta por las grandes empresas.
- El acceso a los canales de abastecimiento o distribución. En muchas industrias los fabricantes tienen control sobre los canales de abastecimiento y/o distribución, ya sea por una integración vertical o por una cuestión de lealtad de los consumidores o proveedores. En un principio debemos buscar con precisión nuestros proveedores y consumidores, de manera de poder ingresar en el mercado sin generar un alerta en las empresas del sector. Luego de un poco, a medida que **Bebri S.A.** gane la confianza y lealtad de los primeros proveedores y

consumidores podremos expandirnos, principalmente hacia otros consumidores. La entrada en las redes de distribución no nos plantearía dificultades debido a que no distribuimos de manera masiva nuestro producto (por ejemplo mediante droguerías) sino que procuramos ofrecer nuestro producto a lugares específicos tales como hospitales, centros de investigación, centros de análisis clínicos.

- Lealtad de los consumidores o de los proveedores. Resulta difícil para un competidor entrar en una industria si hay uno o más operadores establecidos que se conocen bien entre sí o que tienen buenas relaciones con los compradores y proveedores clave. Lo más importante que debemos lograr como empresa es crear nuestra propia lealtad con los proveedores y consumidores presentes en el mercado. Esto es algo que se logra de a poco y requiere mucho trabajo pero estamos dispuestos a llevarlo a cabo. Los consumidores a los que **Bebri S.A.** apunta no tienen un producto con las características de **Telolength®** en el mercado. Es decir, no hay ningún kit que ofrezca todo lo necesario para llevar a cabo la determinación de la longitud telomérica mediante qPCR. Si bien existen kits en el mercado con los reactivos básicos para llevar a cabo una qPCR, los mismos no proveen las secuencias de los *primers* ya que son específicos del templado a analizar. Con **Telolength®** ofrecemos los *primers* de mejor calidad para llevar a cabo dichas reacciones, de manera que los consumidores no tendrán que buscar y mandar a sintetizar las secuencias más adecuadas para llevar a cabo la medición telomérica. Brindamos un kit completo, donde el único adicional que se requiere es la muestra a analizar y la enzima polimerasa de uso común en la clase de laboratorios a los que nos orientamos.

- Experiencia. Los primeros entrantes en una industria adquieren experiencia antes que los demás. Es por eso que **Bebri S.A.** cuenta con personal de calidad y con experiencia previa, permitiéndonos competir con las demás empresas del sector.

- Represalias por parte de las empresas que se encuentran en el sector hacia las entrantes. Debido a esto nuestra estrategia es empezar con un pequeño grupo de consumidores, de manera de ir ganando su confianza y lealtad. Sobre esta base, se ira avanzando sobre otros consumidores mayores, pero siempre con la precaución en un principio de no alterar a las empresas líderes del sector. Hay que tener en cuenta también que nuestra

empresa no ataca los intereses de las grandes firmas, ya que no pensamos darle un uso masivo a **Telolength®** ganándoles cuota de su mercado.

- Diferenciación: Por diferenciación se entiende la provisión de un producto o servicio considerado por el usuario como aquel que tiene un mayor valor percibido que el de la competencia. Como se dijo anteriormente, no existe producto en el mercado con las características de **Telolength®**. Asimismo, nuestro producto, además de ofrecer la mejor combinación de reactivos para llevar a cabo el experimento, puede emplearse en cualquier aparato de qPCR presente en el mercado, diferencia clave respecto de las grandes firmas que solo permiten el uso de sus kits en los aparatos de su propia marca. De esta manera, **Bebri S.A.** ofrece diferenciación con alta calidad y a bajo costo.

La amenaza de sustitutos: La sustitución reduce la demanda de una determinada clase de productos porque los consumidores cambian a diferentes alternativas, al punto de dejar obsoleta determinada clase de productos o servicios. Esto se debe a que el producto sustituto ofrece un beneficio o valor percibido superior. La sustitución puede adoptar diversas formas: sustitución producto por producto, sustitución de la necesidad o una sustitución general. En nuestro caso, si bien **Telolength®** no existe en el mercado actual, nos debemos cuidar de los intentos de nuestros competidores por lanzar al mercado un producto idéntico al nuestro. Tenemos que lograr la fidelidad de nuestros compradores, ya sea por el bajo precio de nuestro kit y por la alta calidad que este ofrece. Algo importante que se debe destacar es la ventana de tiempo que tenemos como empresa para instalarnos en el mercado antes que salga un producto sustituto al mercado. En la actualidad no se está desarrollando ningún método de medición de la LT tan práctico y eficiente como lo es la técnica de qPCR. Este hecho nos favorece, brindándonos un mayor tiempo para poder penetrar y aumentar nuestra participación en el mercado. La mayor amenaza de **Bebri S.A.** son empresas de renombre, como por ejemplo Roche, que podrían sacar al mercado un kit idéntico al nuestro. De todas formas consideramos esta opción lejana y poco probable, ya que en un comienzo nuestra empresa no representara una gran preocupación para estas grandes firmas. Consecuentemente, pondremos nuestros esfuerzos en apuntar a un sector reducido del mercado hasta tanto ganemos participación para instalarnos definitivamente en él.

El poder de los compradores y los proveedores: Estas fuerzas se pueden analizar juntas ya que tienen efectos similares al limitar la libertad estratégica de una organización y afectar a sus márgenes.

El poder de los compradores será probablemente elevado si se cumplen algunas de las siguientes condiciones: una concentración de compradores y que el costo de cambiar de proveedor sea reducido o que implique pocos riesgos. En nuestro caso particular, el poder de los compradores será bajo, ya que los volúmenes adquiridos por los compradores no son elevados y además actualmente no existe otro proveedor de nuestro mismo producto, impidiendo así cambiar de proveedor.

El poder de los proveedores será elevado cuando haya una concentración de proveedores y cuando los costos de cambiar de proveedor sean elevados. Para **Bebri S.A.** el poder de los proveedores es intermedio ya que varios de los reactivos que componen **Telolength®**, como dNTPs, buffer y magnesio, son comprados a grandes empresas (por ejemplo Fischer Scientific, entre otras) las cuales tienen una amplia gama de consumidores, lo que aumenta su poder. No obstante, dada la situación de necesitar cambiar de proveedor porque los costos no siguen siendo rentables para **Bebri S.A.**, existen otros proveedores en el mercado a quienes podríamos acudir sin un costo elevado de cambio. La mayor problemática se plantearía con el abastecimiento del fluoróforo Eva Green® ya que es marca registrada de la empresa Biotum. Con el fin de evitar inconvenientes, se compró la licencia del mismo, permitiéndonos de este modo ejercer los derechos de marketing y del Eva Green.

Rivalidad Competitiva: Los rivales competitivos son organizaciones con productos y servicios parecidos que quieren atender al mismo grupo de consumidores. Hay una serie de factores que afectan al grado de rivalidad competitiva en un sector:

- El grado en que los competidores están equilibrados. Cuando los competidores son aproximadamente del mismo tamaño existe el peligro de que se produzca una intensa competencia cuando un competidor intenta predominar sobre el otro. En nuestro caso, **Bebri S.A.** no tiene el mismo tamaño que otras grandes empresas del sector como ser Roche, es por eso que nuestra estrategia de comercialización inicial es focalizarnos en un nicho. Nuestra empresa no tiene ninguna intención, por ahora, de alterar el equilibrio de los competidores,

sino simplemente de atender a consumidores que no están siendo tomados en cuenta y a consumidores que se dediquen a un tema específico de investigación. En consecuencia no estaríamos quitándoles a las demás empresas del sector compradores.

- Las tasas de crecimiento de la industria. Una organización puede esperar lograr crecer aprovechando la expansión del propio mercado; por el contrario, cuando los mercados son maduros el crecimiento debe lograrse quitando cuota de mercado a los competidores. El sector en el cual se desarrollará **Bebri S.A.** no está maduro, por lo que no deberíamos competir de forma directa contra otras empresas. Hay todavía un grupo de consumidores no atendidos a los cuales pensamos conquistar, ganando así espacio y reconocimiento en el sector. Luego, plantaremos la expansión hacia otros targets de consumidores luchando si es necesario con otras empresas ya establecidas.

Resumiendo, el arma clave de **Bebri S.A.** es la diferenciación: ofrecerle al cliente un producto único como **Telolength®**, que no pueda encontrar en el mercado y que le facilite de manera significativa el trabajo en el laboratorio. En un mercado de materias primas, donde los productos no están diferenciados, no hay nada que impida a los consumidores intercambiar de un competidor a otro, elevando así la rivalidad.

6.2.3 Análisis de oferta y demanda

Actualmente no existe un competidor directo de nuestro producto, con lo cual no hay una oferta en este momento. Los potenciales competidores serían quienes fabrican los reactivos por separado, pero la diferenciación de **Telolength®** es muy clara, ya que ofrecemos todo en un solo kit y con las indicaciones para llevar a cabo la medición de la LT exitosamente. No obstante, en nuestro país se encuentran establecidos laboratorios, tales como Roche o Illumina que podrían imitar nuestro producto de forma sencilla, y contarán con su prestigio como ventaja competitiva.

A pesar de lo mencionado, existe en este momento una demanda indirecta de nuestro producto. Hoy en día distintos hospitales cuentan con servicios de biología molecular que podrían desarrollar la metodología de medición de la LT. A pesar de ello, los mismos envían muestras de sus pacientes a laboratorios de referencia en el análisis de regiones teloméricas, como ser la Academia Nacional de Medicina en Buenos Aires y el Instituto

IMBICE en La Plata, para que realicen el estudio. Esto significa que existe un interés por la realización del protocolo, situación en la que nos basamos para el desarrollo de nuestro producto y que pensamos aprovechar al máximo para ofrecerlo.

Por último, con el objetivo de analizar la posición estratégica del producto se realizó la matriz del *Boston Consulting Group*. La misma es un modelo de análisis de la cartera de negocios, también conocida como "análisis de Portafolio" o como matriz BCG.

En esta matriz de 2x2 (Fig. 7), se clasifican los productos según la tasa de crecimiento del mercado, el cual sirve de indicador de atractivo del mismo y la participación relativa o cuota de mercado que se utiliza como indicador de la competitividad.

A su vez los cuatro cuadrantes de la matriz representan distintas categorías de los productos muy importantes. Estas cuatro categorías no sólo nos sirven para saber qué estrategias de marketing aplicar sino también superponen elementos de análisis financiero, tales como generación y requerimientos de fondos según cada etapa del producto, y es una redefinición del concepto tradicional del ciclo de vida del producto.

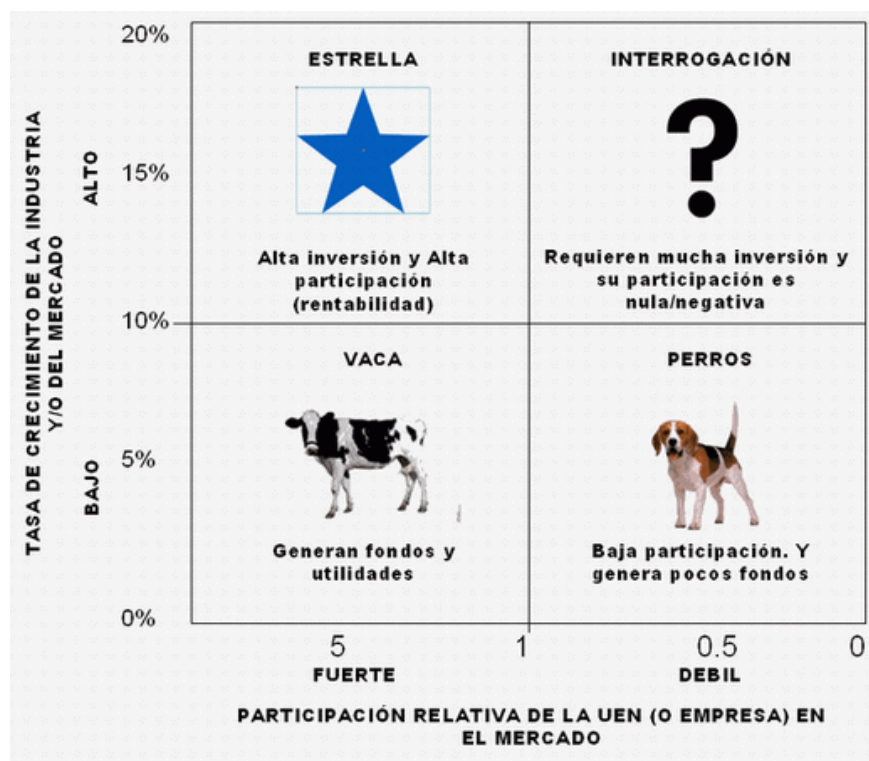


Figura 7: Matriz del Boston Consulting Group (Henderson, 1973).

El kit **Telolength®** será un producto incógnita dado que su participación en el mercado es baja y la tasa de crecimiento del mercado es alta. Como empresa debemos poder llevar ese producto incógnita hacia un producto estrella, el cual tiene una alta participación en el mercado junto con un alto crecimiento del sector. A tal fin, proponemos llevar a cabo diversas estrategias como para lograr ese cambio. Particularmente, invertir tiempo, esfuerzo y dinero para lograr una eficiente campaña comercial y de concientización. Estos esfuerzos incluyen presentar **Telolength®** en congresos y hospitales, así como también ofrecer reuniones informativas y de capacitación sobre la utilidad y facilidad de nuestro producto en el sitio que el consumidor desee. Asimismo, para comodidad de algunos consumidores, nuestra página web⁵ contendrá un video demostrativo a cerca de la utilidad y la aplicación de su resultado en las distintas áreas de la medicina. En cuanto a la concientización, se harán campañas fundamentalmente en hospitales donde se resaltarán a la comunidad médica la importancia que tiene medir los telómeros en pacientes con patologías asociadas a la edad, envejecimiento, y edad biológica de individuos sanos. De esta manera, como se mencionó previamente, si generamos conocimiento aumentamos la demanda potencial.

Más allá de la concientización social, consideramos que debemos hacer también hincapié en la importancia de las buenas prácticas de laboratorio por parte de los usuarios de **Telolength®**; si el kit no es usado en las condiciones detalladas en el manual de usuario (ver pág. 31), **Bebri S.A.** no se hace responsable bajo ningún punto de vista de la veracidad de los resultados obtenidos.

6.2.4 Investigación de mercado

Se llevó a cabo una segmentación geográfica del mercado, por la cual se decidió vender en CABA y GBA, ya que como empresa reciente no contamos aún con la logística necesaria para atender mayores territorios. Dentro de este espacio, se focalizarán los esfuerzos en los hospitales y laboratorios tanto de investigación, como de diagnóstico molecular que trabajen con las patologías relacionadas a la longitud telomérica mencionadas anteriormente (ver pág. 23).

El mercado potencial será CABA y GBA, con un total de 766 establecimientos hospitalarios^{11 y 12}, 199 laboratorios de análisis clínicos y 37 laboratorios de investigación. De

un total de 1002 clientes potenciales, consideramos abarcar un 4%, quedándonos con un mercado meta de 40 clientes. Se resalta también que la cantidad de habitantes en CABA es de 2.830.816 y en GBA es de 9.863.045.

Es importante destacar, que si bien los médicos no serán quienes comprarán **Telolength®**, se deberán aplicar esfuerzos de marketing orientados a ellos, ya que son quienes se encargarán de indicar la medición de la LT a sus pacientes. Se hará especial foco en doctores especializados en las temáticas en las cuales la longitud telomérica es relevante.

6.3 Plan comercial

6.3.1 Marketing mix

- Producto:

TeloLength® (Fig. 8a) es un kit con los reactivos necesarios para la medición de la longitud telomérica, a excepción de la taq polimerasa, mediante la técnica de qPCR. El mismo se presentará en una caja que contendrá en tubos separados cada una de las soluciones necesarias para la qPCR, a excepción de la Taq Polimerasa, el protocolo correspondiente y los estándares para realizar las curvas de calibración de telómeros y de gen de copia única (Fig. 8b y 8c).

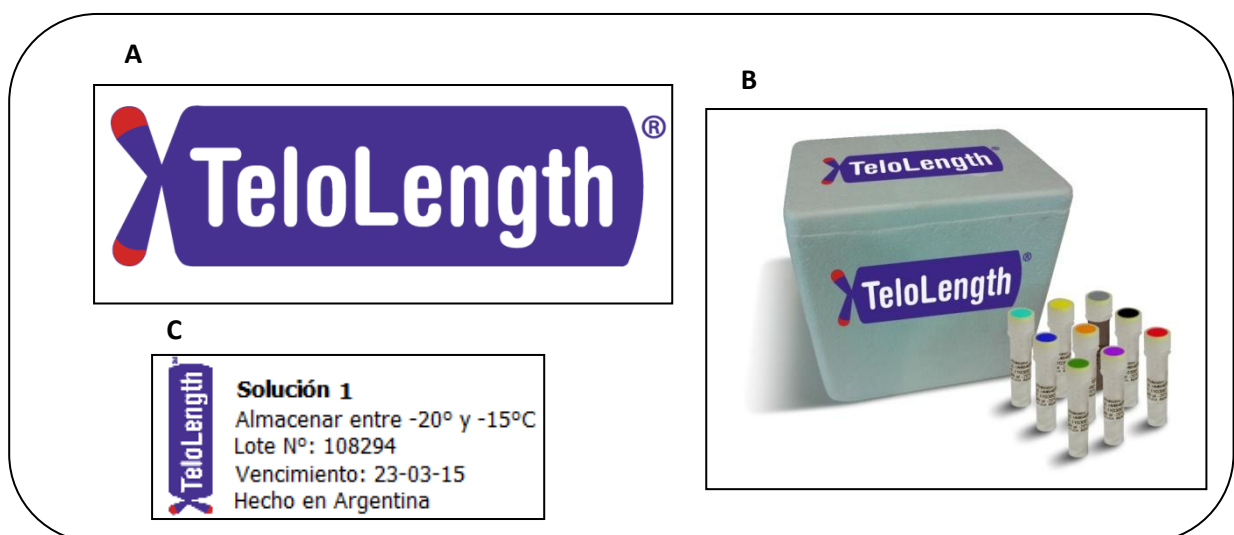


Figura 8: Presentacion del Telolength. A) Logo del producto; B) packaging; C) Ejemplo de etiqueta de los tubos contenidos en el kit.

Como se mencionó previamente, nuestro kit no cuenta con competidores directos. Además, una de las mayores ventajas competitivas radica en que los reactivos utilizados son compatibles con los distintos equipos de qPCR disponibles en el mercado, condición que no cumplen otros numerosos kits que son específicos de la marca del equipo. Ofrecemos versatilidad porque a través de distintas investigaciones logramos crear un kit con reactivos que logran la misma calidad de resultados en aparatos de cualquier marca.

Una característica relevante del producto es que la técnica es sencilla de realizar y de aprender si no se la conoce aún.

Teniendo en cuenta las necesidades de los clientes nuestra propuesta de valor es entregar un producto versátil y con muy buen desempeño. Por otro lado, no existe aún en el mercado un kit que ofrezca los reactivos necesarios para la medición de la longitud de los telómeros, actividad que adquiere cada vez más importancia en el campo de la investigación por presentar relación directa con las patologías previamente descriptas (ver pág. 23)

- **Precio:**

El precio de **Telolength®** se determinó llevando a cabo una fijación basada en el costo ya que el mismo está controlado por el producto. Se diseñó el producto, se calcularon los costos de la fabricación (fijos y variables), se asignó un precio que cubriera todos los costos y de una utilidad neta. Esta fijación, se correlaciona con la estrategia de diferenciación ya que, primeramente se diseñó el producto teniendo en cuenta la calidad y el servicio del mismo para luego dentro de un sobrepeso razonable fijar el precio del kit. **TeloLength®** se vende en el mercado a un precio de \$4500 pesos. Cada kit permite hacer un total de 50 reacciones, a 84 pesos cada reacción.

Se consideró como precio de referencia un kit con propiedades similares a nuestro producto llamado “*LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit*” de Sigma-Aldrich®, el cual ofrece 24 reacciones a un precio de \$4,321.48 (aproximadamente \$180 por reacción).

- **Plaza:**

Bebri S.A. se ubicará en el Parque Industrial de Almirante Brown, el cual brinda beneficios impositivos como eximición de derechos de construcción y tasas de

servicios generales, eximición de tasas de habilitaciones, eximiciones Impositivas de Impuestos provinciales contemplados en la Ley Provincial N° 13.656 de Promoción Industrial, eximición de Tasa de Servicios Generales con la Habilitación definitiva, tasa de Seguridad e Higiene diferencial del 2,5 por mil sobre facturación. El Parque Industrial se encuentra a corta distancia de puntos importantes como el Puerto de Buenos Aires, el aeroparque Jorge Newbery, el aeropuerto de Ezeiza, a 30 minutos de la Ciudad de Buenos Aires, y a 45 minutos de La Plata.

Se llevará a cabo la venta del producto a través de un canal de marketing directo, el cual no tiene niveles intermediarios; nuestra compañía vende directamente a los consumidores ya sea a través de catálogos por Internet y teléfono. Una vez hecha la compra se le acercará el producto al cliente, sin costo adicional, gracias a la utilización de una camioneta. Se dejará el producto en el lugar que solicite el cliente, siempre que se localice dentro de capital y Gran Buenos Aires.

Se hará la distribución del producto en un principio una vez a la semana, de manera de realizar la menor cantidad de viajes posibles. A medida que nuestra empresa gane una mayor cantidad de clientes, se hará la distribución del producto más de una vez por semana teniendo en cuenta la zona y la cantidad de kits a entregar.

- **Promoción:**

Como principal enfoque de marketing **Bebri S.A.** adoptará el marketing directo. El mismo consiste en conexiones directas con consumidores individuales cuidadosamente elegidos. Con la ayuda de bases de datos, logramos identificar a los hospitales, médicos, centros de investigación y análisis clínicos que trabajen con las enfermedades relacionadas a la longitud de los telómeros. Adaptamos así nuestras ofertas y comunicaciones de marketing en base a las necesidades de los compradores. Los anuncios y ofertas se enviarán por correo directamente a los clientes potenciales y nuestra página web⁵ contará la historia de la empresa y destacara las ventajas de nuestro producto. Elegimos el espacio digital como principal medio de comunicación ya que desde la comodidad de su hogar u oficina los clientes tendrán la oportunidad de visitar el sitio web de nuestra empresa en cualquier momento del día. A su vez el marketing directo es inmediato e interactivo, ya

que los compradores tienen la oportunidad de interactuar con la empresa por teléfono o en nuestro sitio Web para consultar las dudas que puedan surgir y hacer el pedido en el momento. Por último, el marketing directo nos ofrece como nueva empresa una alternativa eficiente y de bajo costo para llegar a nuestro mercado.

En complementación con nuestra estrategia de marketing llevaremos a cabo una promoción de ventas mediante visitas médicas, exposiciones en congresos de ciencia relacionados con el tema de telómeros y enfermedades derivadas de su longitud, exposiciones en los hospitales meta y publicaciones en revistas científicas. En las visitas médicas, se hará hincapié en lo importante que es medir la longitud de los telómeros en pacientes con patologías asociadas. En las exposiciones, tanto en congresos como en hospitales, se hará una demostración a través de videos del funcionamiento del kit en los distintos aparatos de qPCR y de los resultados que se obtienen con el mismo. Se destacará además la importancia de tener en un único kit todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la medición de la LT. Por último en las revistas científicas se hará hincapié en la seriedad de la empresa así como también en las ventajas que provee **TeloLength®**.

6.4 Plan operativo

6.4.1 Proceso productivo

El proceso productivo (Fig. 9) comienza con la preparación de las soluciones necesarias para el kit. En paralelo, se etiquetan todas las botellas con las indicaciones necesarias, para luego introducir cada solución en la botella correspondiente. Una vez que todo se encuentra etiquetado y embotellado, se procede a posicionar las botellas en las cajas previamente armadas. Por último, se depositan las cajas en el sector del laboratorio destinado a almacenamiento (Fig. 10) o si el producto sale a distribución se colocara el mismo directamente en la camioneta de envíos.

En relación a la distribución espacial (Fig. 10), contaremos con un amplio laboratorio con dos sectores fundamentales: la mesada de trabajo y el sector de control de calidad. En el primero se realizará el kit en su totalidad, y en el segundo, como su nombre indica, se realizarán controles de calidad.

En la oficina, habrá dos escritorios con sus correspondientes computadoras, donde los empleados administrativos coordinarán tanto la compra de materiales, como la venta de los kits. Por último contaremos con un depósito en donde se almacenarán en frío los kits antes de su distribución.

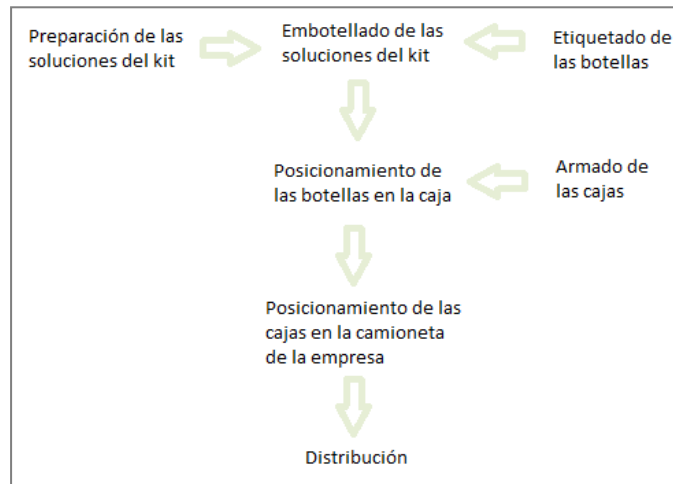


Figura 9: Proceso productivo

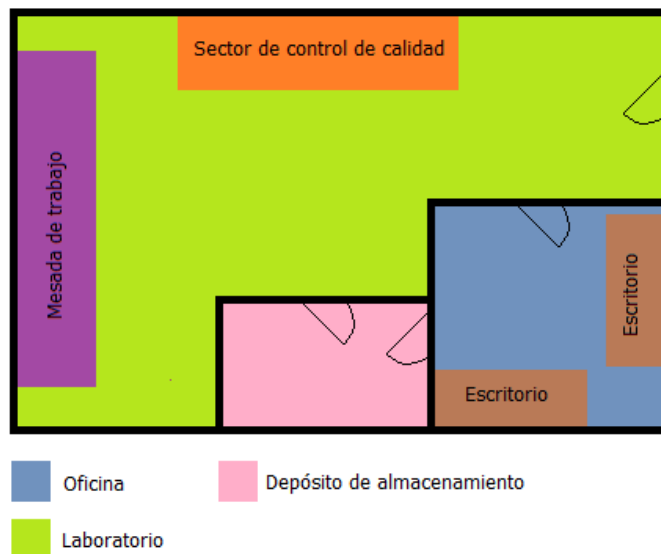


Figura 10: Plano de la empresa

6.4.2 Bill of materials

El “*bill of materials*” (BOM) es la lista de componentes que conforman un sistema; en este caso el BOM representa la lista de materiales necesarios para el desarrollo del kit, desde los reactivos, hasta las etiquetas de los tubos (ver Tabla VII).

Tabla VII. *Bill of materials*

	Materiales	Cantidad necesaria(unidad)	Precio Unitario (\$)	Unidad del vendedor (unidad)	Precio por unidad básica (\$)
Mix	Agua destilada	0,25(lt)	7,50	5(lt)	0,38
	Eva Green	50(μl)	2175,74	5000(μl)	22,42
	MgCl ₂	0,0000238(g)	16,16	1000(g)	0,01
	dNTPs (10 mM)	0,1(ml)	46,17	1(ml)	4,62
	Primer F (telómeros)	20(μl)	27,21	400(μl)	1,36
	Primer R (telómeros)	20(μl)	27,21	400(μl)	1,36
	Primer F (copia única)	20(μl)	27,21	400(μl)	1,36
	Primer R (copia única)	20(μl)	27,21	400(μl)	1,36
	Gen de copia única	13(ng)	150,00	1333360(ng)	0,01
	Oligo telómeros	5(ng)	150,00	1163405(ng)	0,01
Packaging	Caja de telgopor	1(m ²)	70,00	30 (m ²)	2,33
	Tubos de plástico	9(tubos)	433,33	10000(tubos)	0,39
	Hielo seco	0,5(kg)	70,00	10(kg)	3,50
	Separadores de cartón	1(separador)	4,00	1(separador)	4,00
	Etiquetas	15(etiquetas)	28,23	50(etiquetas)	7,70
Total					50,80

Unidad básica de Medida: 1 kit (50 reacciones)

Los reactivos se obtendrán de distintas empresas de biología molecular, y tanto los primers, como los oligos se enviarán a sintetizar.

6.5 Plan de recursos humanos

Se buscará personal técnico capacitado para el desarrollo de los reactivos necesarios para el kit. Además, se necesitara personal que se encargue de cuestiones comerciales y administrativas, tales como organización de envíos y compra de materiales. Se valorará en la búsqueda de personal el espíritu emprendedor, buenas relaciones interpersonales y la capacidad de trabajo en equipo. Los cargos serán:

- Gerente general: se encargará de todas las cuestiones administrativas y de recursos humanos de la empresa. Sueldo neto: \$15.000
- Empleado administrativo: su ocupación será asistir al gerente general en cuestiones administrativas, tales como la compra de materiales y venta de kits. Sueldo neto: \$6.000
- Visitador médico: realizará el trabajo de comunicación hacia los médicos, por medio de visitas y entrega de incentivos para que promocionen el producto. Sueldo neto: \$8.000
- Gerente de laboratorio: estará a cargo de la dirección de todo el proceso productivo, control del trabajo de los técnicos, y obtención de insumos para hacer el producto. Sueldo neto: \$10.000
- Técnico de laboratorio: es quien llevarán a cabo el proceso productivo en sí, desde la producción de las soluciones, hasta el envasado del producto final. Sueldo neto: \$6.000
- Técnico de control de calidad: controlará en distintos puntos del proceso la calidad del producto, siguiendo diferentes protocolos preestablecidos. Sueldo neto: \$6.000

Se contratará un empleado para cada una de las tareas mencionadas. El organigrama de la empresa se encuentra representado en la (Fig. 11) Como integrantes de la fuerza de ventas contamos con un visitador médico y un empleado administrativo. Ellos tendrán la tarea de encontrar nuevos clientes, comunicarles la información relevante del producto y de la empresa, así como también la tarea de responder ante las objeciones del cliente y dar por finalizadas las ventas. En especial el empleado administrativo se dedicará a trabajar vía mail y teléfono con los clientes, mientras que el visitador médico se encargará de promocionar el kit a los diversos centros de salud y médicos particulares.



Figura 11: Organigrama de la empresa

Buscamos vendedores con características como motivación intrínseca, empatía, estilo de trabajo disciplinado, con capacidad de concretar una venta y con capacidad de establecer relaciones con los clientes.

Nuestro programa de capacitación para la fuerza de venta constará en hacerles conocer los objetivos de la organización, los clientes a los cuales apuntar y la descripción del mercado en el cual deseamos penetrar, además de instrucciones técnicas correspondientes al kit, tales como almacenamiento o utilización, para informar a los compradores.

Por otro lado se deberá desarrollar un programa de capacitación para los técnicos y el encargado del control de calidad sobre el manejo de materiales presentes en el kit y estándares de calidad que deseamos obtener.

7. Resultados

7.1 Plan económico y financiero

7.1.1 Inversión inicial

Se calcularon inicialmente los activos intangibles (ver Tabla VIII), teniéndose en cuenta la patente del producto, una contingencia del 5% (dinero extra en caso de necesitarse), la licencia a Biotum, capacitación de empleados y la inscripción IGJ (Inspección

General de Justicia). Por otro lado, la Tabla IX especifica los activos tangibles, considerándose como tal el equipamiento detallado en la Tabla X y la instalación de bioseguridad (BioS).

Tabla VIII. Activos intangibles

Activo	Costo
Patente	\$ 40.000,00
Cotigencia	\$ 2.560,00
Licencia	\$ 80.000,00
Capacitación	\$ 1.000,00
Inscripcion IGJ	\$ 7.000,00
Total	\$ 130.560,00

Tabla XI. Activos tangibles

Activo	Costo
Equipamiento	\$ 894.944,60
Instalacion BioS	\$ 8.000,00
Total	\$ 902.944,60

Tabla X. Equipamiento

Bienes de uso	Vida útil (en años)	Valor de origen	Amortización anual	Amortización mensual
Freezer (800L)	10	\$ 8.000,00	\$ 800,00	\$ 66,67
Termociclador	10	\$ 56.623,00	\$ 5.662,30	\$ 471,86
Autoclave	15	\$ 8.300,00	\$ 553,33	\$ 46,11
Flujo Laminar	15	\$ 533.680,00	\$ 35.578,67	\$ 2.964,89
Cinta Transportadora	5	\$ 13.000,00	\$ 2.600,00	\$ 216,67
Heladera	10	\$ 2.399,00	\$ 239,90	\$ 19,99
Camioneta (nueva)	20	\$ 208.100,00	\$ 10.405,00	\$ 867,08
Centrifuga	10	\$ 44.400,00	\$ 4.440,00	\$ 370,00
Computadora (completa)	8	\$ 5.419,00	\$ 677,38	\$ 56,45
Computadora (completa)	8	\$ 5.419,00	\$ 677,38	\$ 56,45
Micro Pipetas (8)	15	\$ 6.800,00	\$ 453,33	\$ 37,78
Mesa	30	\$ 800,00	\$ 26,67	\$ 2,22
Mesa	30	\$ 800,00	\$ 26,67	\$ 2,22
Impresora Multifunción	12	\$ 634,90	\$ 52,91	\$ 4,41
Teléfono	20	\$ 189,90	\$ 9,50	\$ 0,79
Teléfono	20	\$ 189,90	\$ 9,50	\$ 0,79
Teléfono	20	\$ 189,90	\$ 9,50	\$ 0,79
Total		\$ 894.944,60	\$ 62.222,01	\$ 5.185,17

En función de este análisis, se calculó una inversión inicial necesaria de \$1.078.651,83 (ver Tabla XI). La misma será obtenida a partir de un préstamo del banco Credicoop, de Sistema Francés con un TNA del 17% (Anexo B). Se seleccionó este banco, ya que fue creado por pequeños y medianos industriales y comerciantes argentinos, y es por esta razón que está orientado a fomentar el desarrollo de PyMEs. Si bien el Banco Nación y el Banco Provincia ofrecen la misma tasa que el Banco Credicoop, algunos de sus requisitos nos excluían de la posibilidad de obtenerlos (por ejemplo, solicitan balance de los últimos dos años, siendo que **Bebri S.A.** aun no comenzó a operar).

Se seleccionó el crédito Capital de Trabajo en lugar de un préstamo personal, debido a que estos últimos presentan tasas de interés mucho más elevadas.

Tabla XI. Inversión Inicial

Activo	Costo
Activos Fijos	\$ 902.944,60
Capital de trabajo	\$ 45.147,23
Activos Intangibles	\$ 130.560,00
Total	\$1.078.651,83

*Capital de trabajo son los recursos que requiere la empresa para poder operar

Se evaluó como se vería afectada la inversión inicial si se incluía la enzima Taq Polimerasa en el kit, desarrollando su producción en nuestras instalaciones. Con este fin se calculó cuanto se deberá gastar en equipamiento adicional necesario para sintetizar la enzima (ver Tabla XII).

Tabla XII. Equipamiento para producción de Taq Polimerasa

Equipo	Precio
Freezer -70°C/-80	\$ 280.000,00
Shaker	\$ 37.900,00
Espectrofotómetro	\$ 7.718,00
Centrífuga refrigerada	\$ 56.500,00
Estufa 75°C	\$ 4.227,00
Baño termostático	\$ 2.370,00
Mechero	\$ 49,00
Sistema de electroforesis	\$ 8.800,00
Total	\$ 397.564,00

Incluir la Taq Polimerasa en el kit significa un incremento de la inversión inicial del 36,86% (ver Tabla XIII), por lo que se decidió no incluirla. Además, consideramos que este hecho no afectara a la venta de **TeloLength®**, ya que todos nuestros posibles compradores deberán contar con un laboratorio de biología molecular donde llevar a cabo la medición de la LT. En la actualidad, las enzimas polimerasas son de uso frecuente en estos laboratorios por lo cual estimamos que no será una problemática.

Tabla XIII. Incremento de la inversión inicial por producción de Taq Polimerasa

Inversión inicial sin taq	\$ 1.078.651,83
Inversión inicial con taq	\$ 1.476.215,83
Incremento (%)	36,86

7.1.2 Flujo temporal

La Figura 12 muestra el diagrama de Gannt, mediante el cual se describen las actividades a realizar durante el año “cero”, es decir antes de que la empresa comience a operar. Se distribuyeron las compras de manera tal que los gastos más grandes no se superpongan para no tener que desembolsar una gran cantidad de dinero de una sola vez.

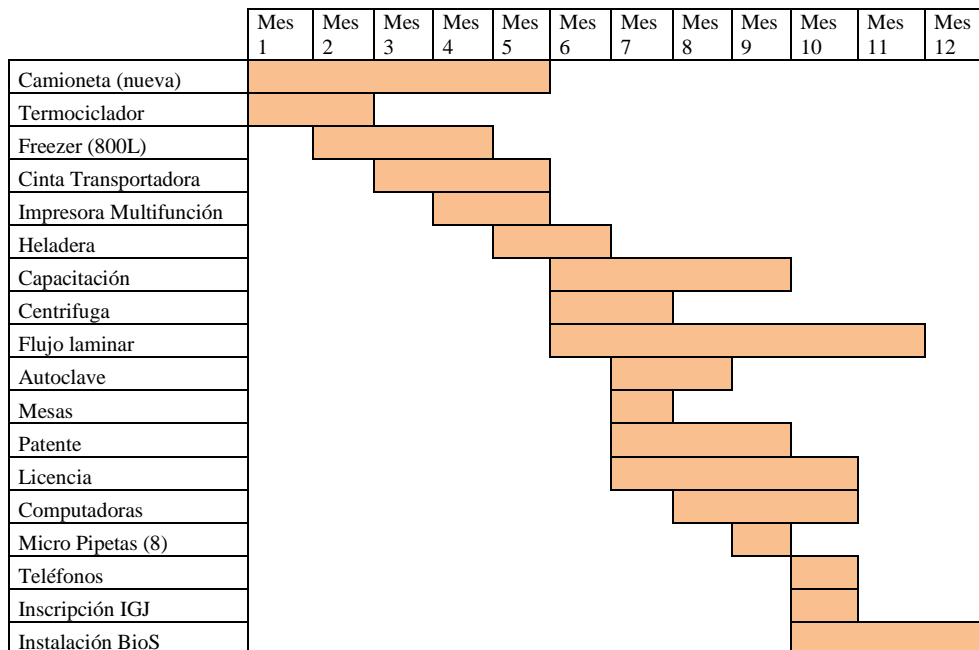


Figura 12: Diagrama de Gannt.

7.1.3 Estructura de costos

Se evaluaron los costos fijos (ver Tabla XIV) y los costos variables (ver Tabla XV) de la empresa, y luego los costos totales mensuales (ver Tabla XVI). Para los costos variables se definieron siete divisiones temporales: mes 1-3, mes 4-5, mes 6-12, año 2, año 3, año 4 y año 5.

Tabla XIV. Costos fijos

Costos Fijos	Costo Mensual	Costo Anual
Luz	\$ 19,94	\$ 239,28
Gas	\$ 13,21	\$ 158,49
Alquiler	\$ 4.916,67	\$ 59.000,00
Seguros	\$ 220,00	\$ 2.640,00
Mantenimiento	\$ 7.059,29	\$ 84.711,50
Tips	\$ 288,56	\$ 3.462,72
Papelería/librería	\$ 300,00	\$ 3.600,00
Nafta	\$ 600,00	\$ 7.200,00
MOI	\$ 38.536,67	\$ 462.440,00
Gastos de Asesoramiento	\$ 333,33	\$ 4.000,00
Total	\$ 52.287,67	\$ 627.451,99

*MOI: Mano de obra indirecta

Tabla XV. Costos variables

Costos Variables Mensual	Mes 1-3	Mes 4-5	Mes 6-12	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Nivel de produccion	30	40	50	60	63	66	70
Ventas esperadas	25	35	45	55	55	60	65
Materias primas	\$ 1.523,96	\$ 2.031,95	\$ 2.539,94	\$ 3.047,93	\$ 3.200,32	\$ 3.352,72	\$ 3.555,91
MOD	\$ 45.553,33	\$ 45.553,33	\$ 45.553,33	\$ 45.553,33	\$ 45.553,33	\$ 45.553,33	\$ 45.553,33
Total	\$ 47.077,30	\$ 47.585,28	\$ 48.093,27	\$ 48.601,26	\$ 48.753,66	\$ 48.906,05	\$ 49.109,25

*MOD: Mano de obra directa

Tabla XVI. Costo total de un kit.

	Mes 1-3	Mes 4-5	Mes 6-12	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
TOTAL COSTO ANUAL	-	-	-	\$ 1.340.742,30	\$ 1.342.571,06	\$ 1.344.399,81	\$ 1.346.838,15
TOTAL COSTO MENSUAL	\$ 110.204,56	\$ 110.712,55	\$ 111.220,54	\$ 111.728,52	\$ 111.880,92	\$ 112.033,32	\$ 112.236,51
TOTAL COSTO VARIABLE UN KIT	\$ 1.569,24	\$ 1.189,63	\$ 961,87	\$ 810,02	\$ 773,87	\$ 741,00	\$ 701,56
TOTAL COSTO FIJO UN KIT	\$ 2.104,24	\$ 1.578,18	\$ 1.262,55	\$ 1.052,12	\$ 1.002,02	\$ 956,47	\$ 901,82
TOTAL COSTOS UN KIT	\$ 3.673,49	\$ 2.767,81	\$ 2.224,41	\$ 1.862,14	\$ 1.775,89	\$ 1.697,47	\$ 1.603,38
PRECIO UN KIT	\$ 4.500,00	\$ 4.500,00	\$ 4.500,00	\$ 4.500,00	\$ 4.500,00	\$ 4.500,00	\$ 4.500,00

Los niveles esperados de ventas se estimaron considerando el tamaño del mercado meta de 40 clientes (ver pág. 47) y el potencial de venta que tiene este producto. Debido a que el precio del kit se definió en \$4500 (ver pág. 63), desde un comienzo el costo unitario del kit será menor que su precio de venta.

7.1.4 Punto de equilibrio

El punto de equilibrio (ver Tabla XVII) es el volumen de ventas requerido para que los ingresos totales igualen a los costos operativos totales (Aching Guzmán y Aching Samatelo, 2006). En nuestro caso, se definió como unidad de venta un kit, que corresponde a la evaluación de 50 muestras mediante qPCR. En los periodos del primer año se utilizó para el análisis un promedio de las ventas proyectadas, ya que las mismas varían cada mes. Se estima alcanzar un nivel de ventas de 25 kits a partir del segundo mes, por lo que se sobrepasaría sin inconvenientes el punto de equilibrio con las ventas esperadas.

Tabla XVII. Punto de equilibrio

	Mes 1-3	Mes 4-5	Mes 6-12	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Contribución Marginal	\$ 2.930,76	\$ 3.310,37	\$3.538,13	\$3.689,98	\$3.726,13	\$3.759,00	\$3.798,44
Punto de equilibrio (unidades)	22	19	18	18	17	18	17
Margen de seguridad	1,14	1,84	2,50	3,24	3,24	3,53	4,06

7.1.5 Estado de resultados

Se analizaron tres escenarios posibles: pesimista, moderado y favorable. En el escenario pesimista se alcanzaría un 70% de las ventas esperadas, en el moderado un 85% y en el favorable 100%. Se realizaron los cálculos mes a mes para el primer año (Anexos E, F y G), y luego los cálculos anuales hasta el quinto año (ver Tabla XVIII, XIX y XX). Cabe aclarar que no se tuvo en cuenta la inflación en ninguna de las planillas, ya que el entorno cambiante en la Argentina dificulta la estimación de la inflación en los años próximos.

Tabla XVIII. Estado de resultados pesimista

	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Ventas	\$ 1.738.800,00	\$ 2.494.800,00	\$ 2.721.600,00	\$ 2.903.040,00	\$ 3.039.120,00
(Costos)	\$ 21.945,07	\$ 489.900,69	\$ 491.436,85	\$ 492.973,00	\$ 495.021,21
Margen Bruto	\$ 1.716.854,93	\$ 2.004.899,31	\$ 2.230.163,15	\$ 2.410.067,00	\$ 2.544.098,79
(Gastos de administracion)	\$ 1.030.847,19	\$ 1.030.847,19	\$ 1.030.847,19	\$ 1.030.847,19	\$ 1.030.847,19
(Gastos de comercializacion)	\$ 92.400,00	\$ 92.400,00	\$ 92.400,00	\$ 92.400,00	\$ 92.400,00
Resultado Operativo	\$ 593.607,74	\$ 881.652,12	\$ 1.106.915,96	\$ 1.286.819,81	\$ 1.420.851,60
(Amortizaciones)	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01
Resultado antes de intereses e impuestos	\$ 531.385,73	\$ 819.430,11	\$ 1.044.693,95	\$ 1.224.597,80	\$ 1.358.629,59
(Intereses)	\$ 640.060,61	\$ 640.157,26	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
Resultado imponible	-\$ 108.674,88	\$ 179.272,85	\$ 1.044.693,95	\$ 1.224.597,80	\$ 1.358.629,59
(Impuestos)	\$ 60.858,00	\$ 150.063,50	\$ 460.898,88	\$ 530.215,63	\$ 581.889,56
Resultado Neto	-\$ 169.532,88	\$ 29.209,35	\$ 583.795,07	\$ 694.382,17	\$ 776.740,03

Nota: Los valores en rojo se restan a los valores en negro

Tabla XIX. Estado de resultados moderado

	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Ventas	\$ 2.111.400,00	\$ 3.029.400,00	\$ 3.304.800,00	\$ 3.525.120,00	\$ 3.690.360,00
(Costos)	\$ 26.943,66	\$ 594.879,41	\$ 596.744,74	\$ 598.610,07	\$ 601.097,18
Margen Bruto	\$ 2.084.456,34	\$ 2.434.520,59	\$ 2.708.055,26	\$ 2.926.509,93	\$ 3.089.262,82
(Gastos de administracion)	\$ 1.304.167,19	\$ 1.304.167,19	\$ 1.304.167,19	\$ 1.304.167,19	\$ 1.304.167,19
(Gastos de comercializacion)	\$ 120.000,00	\$ 120.000,00	\$ 120.000,00	\$ 120.000,00	\$ 120.000,00
Resultado Operativo	\$ 660.289,15	\$ 1.010.353,40	\$ 1.283.888,07	\$ 1.502.342,74	\$ 1.665.095,63
(Amortizaciones)	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01
Resultado antes de intereses e impuestos	\$ 598.067,14	\$ 948.131,39	\$ 1.221.666,06	\$ 1.440.120,73	\$ 1.602.873,62
(Intereses)	\$ 640.060,61	\$ 640.157,26	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
Resultado imponible	-\$ 41.993,47	\$ 307.974,13	\$ 1.221.666,06	\$ 1.440.120,73	\$ 1.602.873,62
(Impuestos)	\$ 59.201,28	\$ 213.819,94	\$ 543.251,12	\$ 627.421,45	\$ 690.168,37
Resultado Neto	-\$ 101.194,76	\$ 94.154,18	\$ 678.414,94	\$ 812.699,27	\$ 912.705,25

Tabla XX. Estado de resultados optimista

	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Ventas	\$ 2.484.000,00	\$ 3.564.000,00	\$ 3.888.000,00	\$ 4.147.200,00	\$ 4.341.600,00
(Costos)	\$ 31.698,43	\$ 699.858,13	\$ 702.052,64	\$ 704.247,15	\$ 707.173,16
Margen Bruto	\$ 2.452.301,57	\$ 2.864.141,87	\$ 3.185.947,36	\$ 3.442.952,85	\$ 3.634.426,84
(Gastos de administracion)	\$ 1.304.167,19	\$ 1.304.167,19	\$ 1.304.167,19	\$ 1.304.167,19	\$ 1.304.167,19
(Gastos de comercializacion)	\$ 132.000,00	\$ 132.000,00	\$ 132.000,00	\$ 132.000,00	\$ 132.000,00
Resultado Operativo	\$ 1.016.134,38	\$ 1.427.974,68	\$ 1.749.780,17	\$ 2.006.785,66	\$ 2.198.259,66
(Amortizaciones)	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01	\$ 62.222,01
Resultado antes de intereses e impuestos	\$ 953.912,37	\$ 1.365.752,67	\$ 1.687.558,16	\$ 1.944.563,65	\$ 2.136.037,65
(Intereses)	\$ 640.060,61	\$ 640.157,26	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
Resultado imponible	\$ 313.851,76	\$ 725.595,41	\$ 1.687.558,16	\$ 1.944.563,65	\$ 2.136.037,65
(Impuestos)	\$ 196.788,12	\$ 378.698,39	\$ 726.725,36	\$ 825.749,28	\$ 899.569,18
Resultado Neto	\$ 117.063,64	\$ 346.897,02	\$ 960.832,80	\$ 1.118.814,38	\$ 1.236.468,47

El análisis efectuado muestra para el caso de un escenario pesimista y moderado un año de pérdidas debido a que las ventas esperadas son las menores. Este hecho no se observa si tenemos en cuenta un escenario favorable. De todas formas, consideramos que aun contar con pérdidas sólo en el primer año de trabajo no es un escenario desfavorable, por lo que creemos firmemente que el proyecto cuenta con altas probabilidades de éxito.

7.1.6 Indicadores de rentabilidad

Teniendo en cuenta los tres escenarios previamente mencionados y los resultados obtenidos en las Tablas XVIII, XIX y XX, se procedió a calcular el valor acumulado neto (VAN), la tasa interna de retorno (TIR) y el tiempo requerido para que los ingresos igualen la inversión inicial del proyecto (*pay back*). El VAN es un procedimiento que permite calcular el valor presente de un determinado número de flujos de caja futuros, originados por una inversión, y la TIR de una inversión es el promedio geométrico de los rendimientos futuros esperados de dicha inversión, y que implica el supuesto de una oportunidad para "reinvertir" (Brealey, 2006). A mayor TIR, mayor rentabilidad (Meza Orozco *et al*, 2008; Lahoud D, 2006); así, se utiliza como uno de los criterios para decidir si aceptar o rechazar una inversión (Hamilton Wilson y Pezo Paredes, 2005). Para ello, la TIR se compara con la tasa mínima o de corte. Si la tasa de rendimiento del proyecto supera la tasa de corte, se acepta la inversión; en caso contrario, se rechaza.

Para el escenario pesimista, el VAN a cinco años es de \$ 1.254.662,28, la TIR del 17% y se espera recuperar la inversión inicial a los 3 años y 11 meses desde el comienzo del proyecto. En presencia de un escenario moderado, el VAN a cinco años es de \$ 1.736.847,42, la TIR del 22% y el *pay back* es a 3 años y 6 meses de iniciadas las actividades. En el mejor de los casos ante un escenario optimista, el VAN a cinco años es de 3.120.144,84, la TIR del 37% y se requerirá de 2 años y 8 meses de trabajo para saldar la inversión inicial del proyecto. Estos indicadores demuestran, indistintamente del escenario que se presente, que el proyecto es rentable y atractivo para ser llevado a cabo.

8. Conclusión

En conclusión consideramos que **TeloLegnth®** tiene una alta capacidad de prosperar en el mercado actual argentino. Creemos firmemente que ha sido un acierto apuntar al mercado de la salud que se encuentra en continuo crecimiento, y contar con que cada vez más se encuentran relaciones entre la longitud de los telómeros y enfermedades como ser cáncer, artritis reumatoide, obesidad, osteoporosis, entre otras.

Un desacierto, sería que debemos importar el Evagreen®. Actualmente en la Argentina hay numerosos problemas con las importaciones, ya sea porque no se permite el ingreso del producto al país o porque la importación es muy burocrática y por lo tanto el tiempo se prolonga mucho. Hay casos en los cuales la entrada del producto al país puede tomar desde 2 o hasta 9 meses, y esta variabilidad es la que podría complicar mucho el seguimiento de su stock. Podríamos en el peor de los casos quedarnos sin reactivo necesario para nuestro producto, disminuyendo en este sentido la rentabilidad.

Un eje de mejora a futuro podría ser incluir en el kit la Taq Polimerasa. Si en determinado momento los costos son favorables para la fabricación de la enzima, se podrá incurrir en gastos de ampliación del espacio físico para poder desarrollarla. Por otro lado se podría también vender la enzima de manera individual a laboratorios que la deseen y no estén dispuestos a pagar un sobre-precio por la misma enzima extranjera. De esta forma, con todos los problemas de importación, **Bebri S.A.** les podría otorgar una enzima de calidad y en un tiempo corto debido a que la fabricación es nacional.

Asimismo, el proyecto es técnica y económicamente viable en función de los valores obtenidos de los indicadores tales como del Valor Actual Neto, la Tasa Interna de Retorno y *Pay Back*, independientemente de si se presenta un escenario pesimista, moderado u optimista, por lo que creemos firmemente en el éxito del mismo.

9. Referencias

- Aching Guzmán, César, Aching Samatelo, Jorge L. *Ratios Financieros y Matemáticas de la Mercadotecnia*. Prociencia y Cultura S.A., 2006. 100 p. ISBN: 8468961035, 9788468961033.
- Allshire *et al*, 1989. "Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly". *Nucleic Acids Res* 17:4611-27.
- Artandi SE, 2006. "Telomeres, Telomerase, and Human Disease". *NEJM* 355:1195-97.
- Blackburn EH, 1991. "Structure and function of telomeres". *Nature* 350:569-72.
- Blasco *et al*, 1997. "Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA". *Cell* 91:25-34.
- Brealey, Richard A. *Principios de finanzas corporativas*. 9ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana de España S.L, 2010. 1064p. ISBN: 9701072839, 9789701072837.
- Brown, Terence A. *Genomes*. 3a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2008. 713p. ISBN: 0815341385, 9780815341383.
- Bustin y Nolan, 2004. "Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction". *J Biomol Tech*. 15:155-66.
- Canela *et al*, 2007. "High-throughput telomere length quantification by Fish and its application to human population studies". *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5300-5305.
- Cawthon *et al*, 2003. "Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older". *Lancet* 361(9355):393-395.
- Cawthon RM, 2002. "Telomere measurement by quantitative PCR". *Nucleic Acids Res*; 30:e47.
- Chang *et al*, 2004. "Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome". *Nat Genet*. 36:877-82.

- Collado *et al*, 2007. "Cellular senescence in cancer and aging". *Cell* 130:223-233.
- Collins y Mitchell, 2002. "Telomerase in the human organism". *Oncogene* 21:564-79.
- De Kluyver, Cornelis A. *Pensamiento estratégico: una perspectiva para los ejecutivos*. Pearson Educación, 2001. 226P. ISBN: 9879460596, 9789879460597.
- Denchi EL, 2009. "Give me a break: how telomeres suppress the DNA damage response". *DNA Repair* 8:1118-26.
- Denchi y de Lange, 2007. "Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1". *Nature* 448:1068-71.
- Deng *et al*, 2008. "Telomere dysfunction and tumor suppression: the senescence connection". *Nat Rev Cancer* 8:450-458.
- Dorak, Tevfik. *Real-time PCR*. Garland Science, 2007. 333p. ISBN: 0203967313, 9780203967317.
- Draskovic y Londono Vallejo, 2013. "Telomere recombination and alternative telomere lengthening mechanisms". *Front Biosci (Landmark Ed)* 18:1-20.
- Epel *et al*, 2004. "Accelerated telomere shortening in response to life stress". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(49):17312-17315.
- Figuerola, Morgenfeld, Wirth, 2014. "Prueba piloto: Producción de ADN polimerasa termorresistente recombinante". *Guía de trabajos Prácticos Conceptos y Técnicas de Biotecnología I*. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular FCEN UBA.
- Finkel y Holbrook, 2000. "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing". *Nature*. 2000; 408:239-47.
- Forsyth *et al*, 2002. "Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again". *Differentiation* 69:188-97.
- Gisselsson *et al*, 2001. "Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution to complex chromosome abnormalities in human malignant tumors". *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12683-8.
- Griendling y FitzGerald, 2003. "Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS". *Circulation*, 108: 1912-1916.
-

- Hahn WC, 2005. "Telomere and telomerase dynamics in human cells". *Curr Mol Med* 5:227-31.
- Hamilton Wilson, Martín; Pezo Paredes, Alfredo. *Formulación y evaluación de proyectos tecnológicos empresariales aplicados*. 1ª ed. Colombia: Convenio Andres Bello, 2005. 206p. ISBN: 9586981746, 9789586981743.
- Hanish *et al*, 1994. "Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres". *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:8861-8865
- Harley *et al*, 1990. "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts". *Nature* 345:458-460.
- Hastie *et al*, 1990. "Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing". *Nature* 364: 866-8.
- Hayflick y Moorhead, 1961. "The serial cultivation of human diploid cell strains". *Exp cell res* 25 (3): 585-621.
- Henderson, Bruce C. *The Experience Curve-Reviewed*. 4a ed. Boston Consulting Group, 1973.
- Iwama *et al*, 1998. "Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals". *Hum Genet* 102: 397-402.
- Johnson Gerry, Scholes Kevan, Whittington Richard. *Dirección estratégica*. 7a ed. Madrid: Pearson Educación, 2006. 712 p. ISBN: 9788420546186.
- Keith *et al*, 2002. "Telomerase-directed molecular therapeutics". *Expert Rev Mol Med* 4:1-25.
- Lahoud, Daniel. *Los Principios de Las Finanzas y los Mercados Financieros*. Caracas: Universidad Católica Andrés Bello, 2006. 245p. ISBN: 9802443468, 9789802443468.
- Lansdorp *et al*, 1996. "Heterogeneity in telomere length of human chromosomes". *Hum Mol Genet* 5:685-691.
- Leri *et al*, 2003. "Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation". *EMBO J*. 22:131-9
- Lindsey *et al*, 1991. "In vivo loss of telomeric repeats with age in humans". *Mutat Res* 256:45-8.

- McIlrath *et al*, 2001. "Telomere length abnormalities in mammalian radiosensitive cells".
Cancer Res. 61:912-915
- Metcalfe *et al*, 1996. "Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia". Nat
Genet. 1996; 13:350-3.
- Meza Orozco, Jhonny de Jesús. Matemáticas Financieras Aplicadas. Ecoe Ediciones, 2008.
548p. ISBN: 9586485390, 9789586485395.
- O'Callaghan *et al*, 2008. "A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length".
Biotechniques 44: 807-9.
- Osterhage y Friedman, 2009. "Chromosome end maintenance by telomerase". J Biol Chem
284:16061-5.
- O'Sullivan *et al*, 2005. "Quantitative fluorescence in situ hybridization (QFISH)
of telomere lengths in tissue and cells". Curr Protoc Cytom. Chapter 12:Unit 12.6.
- Pérez-Rivero *et al*, 2006. "Mice deficient in telomerase activity develop hypertension because
of an excess of endothelin production". Circulation. 114:309-17.
- Porter, Michael. Ventaja competitiva. México: S.L (Grupo Patria Cultural) Alay ediciones,
2002. 556p. ISBN: 9789702402039.
- Puterman *et al*, 2010. "The power of exercise: buffering the effect of chronic stress on
telomere length". PLoS One. May 26;5(5):e10837. doi:
10.1371/journal.pone.0010837.
- Richards *et al*, 2007. "Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer
leukocyte telomere length in women". Am J Clin Nutr. 86(5):1420-5)
- Rivera Camino Jaime, López Rúa Mencía de Garcillan. Dirección de Marketing.
Fundamentos y aplicaciones. 3ª ed. Madrid: ESIC Editorial, 2012. 512p. ISBN:
8473568400, 9788473568401.
- Rudolph *et al*, 1999. "Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient
mice". Cell. 96:701-12.
- Shay *et al*, 1996. "Telomeres and telomerase in human leukemias". Leukemia 10:1255-61.
- Shay JW, 1997. "Molecular pathogenesis of aging and cancer: are telomeres and telomerase
the connection?" J Clin Pathol 50:799-800.

- Stewart y Weinberg, 2006. "Telomeres: Cancer to Human Aging". *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:531-57.
- Toftgård, 2009. Maintenance of chromosomes by telomeres and the enzyme telomerase. The Nobel Assembly at Karolinska Institutet - The Nobel Prize in Physiology or Medicine.
- Valdes et al, 2005. "Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women". *Lancet*. 366(9486):662-4.
- Vaziri et al, 1994. "Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age". *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9857-60.
- Vera y Blasco, 2012. "Beyond average: potential for measurement of short telomeres". *Aging (Albany NY)* 4(6):379-92.
- Von Zglinicki T, 2002. "Oxidative stress shortens telomeres". *Trends Biochem. Sci.* 27(7):339-344.
- Vulliamy et al, 2001. "The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenital". *Nature*. 2001; 413:432-5.
- Watson, James D. *Biología Molecular del Gen*. Médica Panamericana, 2006. 776p. ISBN: 8479035056, 9788479035051.
- Wentzensen et al, 2011. "The association of telomere length and cancer: a meta-analysis". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 20(6):1238-50.
- Willeit et al, 2010. "Cellular aging reflected by leukocyte telomere length predicts advanced atherosclerosis and cardiovascular disease risk". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30(8):1649-56.
- Wong y Collins, 2006. "Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenital". *Genes Dev*. 2006; 20(20): 2848–2858.
- Wu et al, 2003. "Telomerase and telomere length in multiple myeloma: correlations with disease heterogeneity, cytogenetic status, and overall survival". *Blood* 101:4982-9.
- Zannolli et al, 2008. "Telomere length and obesity". *Acta Paediatr*. 97(7):952-4.

Zipper et al, 2004. “Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications”. Nucleic Acids Res. 32, e103. PMID 15249599.

Fuentes de internet

- 1- www.roche-applied-science.com
- 2- <http://www.lifelength.com/esp/individuals.html#>
- 3- <http://biotium.com/technology/evagreen-dye-for-qpcr/>
- 4- <http://www.lifelength.com>
- 5- www.bebri.com
- 6- <http://www.cra.org.ar/0/vnc/nota.vnc?id=2550>
- 7- <http://www.lanacion.com.ar/1473299-advierten-incipientes-sintomas-de-recesion-en-la-economia>
- 8- http://www.ieco.clarin.com/economia/titulo_0_703729876.htm
- 9- <http://www.lanacion.com.ar/1655509-consultoras-registraron-una-inflacion-de-2838-en-2013-la-mas-alta-en-una-decada>
- 10- <http://www.lanacion.com.ar/1655797-segun-el-indec-la-inflacion-de-2013-fue-del-109>
- 11- <http://www.ec.gba.gov.ar>
- 12- <http://www.buenosaires.gob.ar>

Anexo A. Papers relacionados con la LT.

Envejecimiento

- Bernardes de Jesus *et al*, 2012. "Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer." *EMBO Mol Med*. May 15.
- Njajou *et al*, 2011. "Shorter telomeres are associated with obesity and weight gain in the elderly." *Int J Obes (Lond)*. Oct 18.
- Lin *et al*, 2011. "Telomeres and lifestyle factors: Roles in cellular aging." *Mutat Res*. Aug 22.
- Puterman, *et al*. 2010. "The power of exercise: buffering the effect of chronic stress on telomere length." *PLoS One*. 5(5):e10837.
- Epel *et al*, 2009. "The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men." *Aging* 1(1):81-88.
- Tomas-Loba *et al*, 2008. "Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice." *Cell* 135(4):609-622.
- Blasco *et al*, 2007. "Telomere length, stem cells and aging." *Nat. Chem. Biol*. 3(10):640-649.
- Von Zglinicki *et al*, 2005. "Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases." *Curr. Mol. Med*. 5(2):197-203.
- Epel *et al*, 2004. "Accelerated telomere shortening in response to life stress." *Proc. Natl. Acad. Sci*. 101(49):17312-17315.
- Vulliamy *et al*, 2004. "Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC." *Nat. Genet*. 36(5):447-449.
- Cawthon *et al*, 2003. "Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older." *Lancet* 361(9355):393-395.

Cardiovascular

- Aviv A, 2011. "Genetics of leukocyte telomere length and its role in atherosclerosis." *Mutat Res.* May 8. Fitzpatrick *et al*, 2011. "Leukocyte telomere length and mortality in the Cardiovascular Health Study." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* Apr;66(4):421-9.
- De Meyer *et al*, 2011. "Telomere length and cardiovascular aging: the means to the ends?" *Ageing Res Rev.* Apr;10(2):297-303.
- Saliques *et al*, 2011. "Circulating leukocyte telomere length and oxidative stress: A new target for statin therapy." *Atherosclerosis.* Sep 16. Willeit *et al*, 2010. "Cellular aging reflected by leukocyte telomere length predicts advanced atherosclerosis and cardiovascular disease risk." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Aug;30(8):1649-56.
- Chen *et al*, 2009. "Leukocyte telomere length is associated with HDL cholesterol levels: The Bogalusa heart study." *Atherosclerosis.* Aug;205(2):620-5.
- Farzaneh-Far *et al*, 2008. "Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jul;28(7):1379-84. Samani *et al*, 2008. "Biological ageing and cardiovascular disease." *Heart* 94(5):537-539.
- Van der Harst *et al*, 2007. "Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure." *J Am Coll Cardiol.* Apr 3;49(13):1459-64.
- Demissie *et al*, 2006. "Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study." *Aging Cell* 5(4):325-330.
- Benetos *et al*, 2004. "Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive subjects." *Hypertension.* Feb;43(2):182-5.
- Brouillette *et al*, 2003. "White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23(5):842-846.
- Benetos *et al*, 2001. "Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relations with pulse pressure and pulse wave velocity." *Hypertension* 37 (2 part 2):381-385.

Sistema Nervioso Central

- Watfa *et al*, 2011. "Study of telomere length and different markers of oxidative stress in patients with Parkinson's disease." *J Nutr Health Aging*. Apr;15(4):277-81.
- Lin *et al*, 2010. "Endogenous estrogen exposure is associated with the telomere maintenance in postmenopausal women at risk for cognitive decline." *Brain Res*. Oct 18.
- Valdes *et al*, 2010. "Leukocyte telomere length is associated with cognitive performance in healthy women." *Neurobiol Aging*. Jun;31(6):986-92.
- Simon *et al*, 2006. "Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging." *Biol. Psychiatry* 60(5):432-435
- Harris *et al*, 2006. "The association between telomere length, physical health, cognitive aging and mortality in non-demented older people." *Neurosci. Lett*. 406(3):260-264.
- Panossian *et al*, 2003. "Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status." *Neurobiol. Aging* 24(1):77-84.

Diabetes

- Testa *et al*, 2011. "Leukocyte telomere length is associated with complications of Type 2 diabetes mellitus." *Diabet Med*. Nov;28(11):1388-1394. doi: 10.1111/j.1464-5491.2011.03370.x.
- Xiao *et al*, 2011. "Telomere dysfunction-related serological markers are associated with type 2 diabetes." *Diabetes Care*. Oct;34(10):2273-8.
- Astrup *et al*, 2010. "Telomere length predicts all-cause mortality in patients with type 1 diabetes." *Diabetologia*. Jan;53(1):45-8.
- Adaikalakoteswari *et al*, 2007. "Association of telomere shortening with impaired glucose tolerance and diabetic macroangiopathy." *Atherosclerosis*. Nov;195(1):83-9.
- Sampson *et al*, 2006. "Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes". *Diabetes Care*. Feb; 29(2):283-9.

Alimentación/Obesidad

- Paul *et al*, 2011. "Diet, nutrition and telomere length." J Nutr Biochem. Oct; 22(10):895-901.
- Lee *et al*, 2010. "Inverse association between adiposity and telomere length: The fels longitudinal study." Am J Hum Biol. Nov 15.
- Nordfjall *et al*, 2010. "Increased abdominal obesity, adverse psychosocial factors and shorter telomere length in subjects reporting early ageing; the MONICA Northern Sweden Study." Scand J Public Health;5(1):e8612.
- Kim *et al*, 2009. "Obesity and weight gain in adulthood and telomere length." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Mar;18(3):816-20.
- Xu *et al*, 2009. "Multivitamin use and telomere length in women." Am J Clin Nutr. 2009 Jun;89(6):1857-63.
- Zannolli *et al*, 2008. "Telomere length and obesity." Acta Paediatr. Jul;97(7):952-4.
- Richards *et al*, 2007. "Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women." Am J Clin Nutr. Nov;86(5):1420-5.

Oncología

- Hofmann *et al*, 2011. "Risk of renal cell carcinoma in relation to blood telomere length in a population-based case-control study." Br J Cancer. Oct 27.
- Calado *et al*, 2011. "Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia." Leukemia. Oct 18.
- Rollison *et al*, 2011. "Telomere length in myelodysplastic syndromes." Leuk Lymphoma. 2011 Aug; 52(8):1528-36.
- Wentzensen *et al*, 2011. "The association of telomere length and cancer: a meta-analysis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Jun;20(6):1238-50.
- Heaphy *et al*, 2011. "The potential utility of telomere-related markers for cancer diagnosis." J Cell Mol Med. Jun;15(6):1227-38.

-
- Folini *et al*, 2011. "Telomeres as targets for anticancer therapies." *Expert Opin Ther Targets*. May;15(5):579-93.
 - Sellmann *et al*, 2011. "Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia." *Int J Hematol*. Jan;93(1):74-82.
 - Valls *et al*, 2011. "Telomere length is a prognostic factor for overall survival in colorectal cancer." *Colorectal Dis*. Nov;13(11):1265-72.
 - Kheirollahi *et al*, 2011. "Alterations of telomere length in human brain tumors." *Med Oncol*. Sep;28(3):864-70.
 - Prescott *et al*, 2010. "Telomere length and genetic analyses in population-based studies of endometrial cancer risk." *Cancer*. Sep 22;304(12):1358-64.
 - De Vivo *et al*, 2009. "A prospective study of relative telomere length and postmenopausal breast cancer risk." *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 18(4):1152-1156.
 - Rossi *et al*, 2009. "Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia Leukemia." Jun;23(6):1062-72.
 - Deng *et al*, 2008. "Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection." *Nat. Rev. Cancer* 8(6):450-458.
 - Harley CB, 2008. "Telomerase and cancer therapeutics." *Nat. Rev. Cancer* 8(3):167-179.
 - Svenson *et al*, 2008. "Breast cancer survival is associated with telomere length in peripheral blood cells." *Cancer Res*. 68(10):3618-3623.
 - McGrath *et al*, 2007. "Telomere length, cigarette smoking and bladder cancer risk in men and women." *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 16(4):815-819.
 - Ohali *et al*, 2006. "Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma." *Cancer* 107(6):1391-1399.
 - Wu *et al*, 2003. "Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor." *J Natl. Cancer Inst*. 95(16):1211-8.
 - Broberg *et al*, 2005. "Constitutional short telomeres are strong genetic susceptibility markers for bladder cancer." *Carcinogenesis*. Feb 22;26(7):1263-127.
-

Respiratorio

- Amsellem *et al*, 2011. "Telomere Dysfunction Causes Sustained Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Am J Respir Crit Care Med*. Sep 8.
- Nouredine *et al*, 2011. "Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease." *Circ Res*. Aug 19; 109(5):543-53.
- Alder *et al*, 2008. "Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 2; 105(35):13051-6.

Estrés

- Babizhayev *et al*, 2011. "Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biologic age, and an independent predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behavior." *Am J Ther*. Nov;18(6):e209-26.
- Sahin *et al*, 2010. "Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing." *Nature*. Mar 25;464(7288):520-8.
- Kananen *et al*, 2010. "Childhood adversities are associated with shorter telomere length at adult age both in individuals with an anxiety disorder and controls." *PLoS One*. May 25; 5(5):e10826.
- Wolkowitz *et al*, 2010. "Depression gets old fast: do stress and depression accelerate cell aging?" *Depress Anxiety*. Apr;27(4):327-38.
- Choi *et al*, 2008. "Reduced telomerase activity in human T lymphocytes exposed to cortisol." *Brain Behav Immun*. May;22(4):600-5.
- Kurz *et al*, 2004. "Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells." *J Cell Sci*. May 1; 117(Pt 11):2417-26.

Anexo B. Préstamo del Banco Credicoop

Banco
Credicoop
sistema
frances

Prestamo \$1.078.651,83 TNA: 17%

Mes N°	Valor cuota	Capital	Interés	Saldo
1	\$ 53.210,33	\$ 38138,77	\$ 15071,56	\$ 1040512,23
2	\$ 53.491,15	\$ 38464,38	\$ 15026,77	\$ 1002047,85
3	\$ 53.491,15	\$ 39019,87	\$ 14471,28	\$ 963027,98
4	\$ 53.232,41	\$ 39776,40	\$ 13456,01	\$ 923251,58
5	\$ 53.479,97	\$ 40146,64	\$ 13333,33	\$ 883104,94
6	\$ 53.243,59	\$ 40904,32	\$ 12339,27	\$ 842200,62
7	\$ 53.468,68	\$ 41305,87	\$ 12162,81	\$ 800894,75
8	\$ 53.468,68	\$ 41902,40	\$ 11566,28	\$ 758992,35
9	\$ 52.863,00	\$ 42969,50	\$ 9893,50	\$ 716022,85
10	\$ 53.434,21	\$ 43093,62	\$ 10340,59	\$ 672929,23
11	\$ 53.254,81	\$ 43852,24	\$ 9402,57	\$ 629076,99
12	\$ 53.422,63	\$ 44337,69	\$ 9084,94	\$ 584739,30
13	\$ 53.266,40	\$ 45096,07	\$ 8170,33	\$ 539643,23
14	\$ 53.410,95	\$ 45617,58	\$ 7793,37	\$ 494025,65
15	\$ 53.410,95	\$ 46276,38	\$ 7134,57	\$ 447749,27
16	\$ 53.289,89	\$ 47033,67	\$ 6256,22	\$ 400715,60
17	\$ 53.399,09	\$ 47612,07	\$ 5787,02	\$ 353103,53
18	\$ 53.301,78	\$ 48368,00	\$ 4933,78	\$ 304735,53
19	\$ 53.387,12	\$ 48986,22	\$ 4400,90	\$ 255749,31
20	\$ 53.387,12	\$ 49693,66	\$ 3693,46	\$ 206055,65
21	\$ 53.264,65	\$ 50482,13	\$ 2782,52	\$ 155573,52
22	\$ 53.362,83	\$ 51116,08	\$ 2246,75	\$ 104457,44
23	\$ 53.325,91	\$ 51866,37	\$ 1459,54	\$ 52591,07
24	\$ 53.350,57	\$ 52591,07	\$ 759,50	\$ 0,00

Anexo C

- Artículo 41 de la Constitución Nacional Argentina: Todos los habitantes gozan del derecho a un ambiente sano, equilibrado, apto para el desarrollo humano y para que las actividades productivas satisfagan las necesidades presentes sin comprometer las de las generaciones futuras; y tienen el deber de preservarlo. El daño ambiental generará prioritariamente la obligación de recomponer, según lo establezca la ley.

Las autoridades proveerán a la protección de este derecho, a la utilización racional de los recursos naturales, a la preservación del patrimonio natural y cultural y de la diversidad biológica, y a la información y educación ambientales.

Corresponde a la Nación dictar las normas que contengan los presupuestos mínimos de protección, y a las provincias, las necesarias para complementarlas, sin que aquéllas alteren las jurisdicciones locales.

Se prohíbe el ingreso al territorio nacional de residuos actual o potencialmente peligrosos, y de los radiactivos.

- Artículo 43 de la Constitución Nacional Argentina: Toda persona puede interponer acción expedita y rápida de amparo, siempre que no exista otro medio judicial más idóneo, contra todo acto u omisión de autoridades públicas o de particulares, que en forma actual o inminente lesione, restrinja, altere o amenace, con arbitrariedad o ilegalidad manifiesta, derechos y garantías reconocidos por esta Constitución, un tratado o una ley. En el caso, el juez podrá declarar la inconstitucionalidad de la norma en que se funde el acto u omisión lesiva.

Podrán interponer esta acción contra cualquier forma de discriminación y en lo relativo a los derechos que protegen al ambiente, a la competencia, al usuario y al consumidor, así como a los derechos de incidencia colectiva en general, el afectado, el defensor del pueblo y las asociaciones que propendan a esos fines, registradas conforme a la ley, la que determinará los requisitos y formas de su organización.

Toda persona podrá interponer esta acción para tomar conocimiento de los datos a ella referidos y de su finalidad, que consten en registros o bancos de datos públicos, o los privados destinados a proveer informes, y en caso de falsedad o discriminación, para exigir la supresión, rectificación, confidencialidad o actualización de aquéllos. No podrá afectarse el secreto de las fuentes de información periodística.

Cuando el derecho lesionado, restringido, alterado o amenazado fuera la libertad física, o en caso de agravamiento ilegítimo en la forma o condiciones de detención, o en el de

desaparición forzada de personas, la acción de hábeas corpus podrá ser interpuesta por el afectado o por cualquiera en su favor y el juez resolverá de inmediato, aun durante la vigencia del estado de sitio.

Anexo D

- **ARTÍCULO 1º** — Están prohibidos y serán sancionados de conformidad con las normas de la presente ley, los actos o conductas, de cualquier forma manifestados, relacionados con la producción e intercambio de bienes o servicios, que tengan por objeto o efecto limitar, restringir, falsear o distorsionar la competencia o el acceso al mercado o que constituyan abuso de una posición dominante en un mercado, de modo que pueda resultar perjuicio para el interés económico general.

Queda comprendida en este artículo, en tanto se den los supuestos del párrafo anterior, la obtención de ventajas competitivas significativas mediante la infracción declarada por acto administrativo o sentencia firme, de otras normas.

- **ARTÍCULO 2º** — Las siguientes conductas, entre otras, en la medida que configuren las hipótesis del artículo 1º, constituyen prácticas restrictivas de la competencia:

Fijar, concertar o manipular en forma directa o indirecta el precio de venta, o compra de bienes o servicios al que se ofrecen o demandan en el mercado, así como intercambiar información con el mismo objeto o efecto;

Establecer obligaciones de producir, procesar, distribuir, comprar o comercializar sólo una cantidad restringida o limitada de bienes, o prestar un número, volumen o frecuencia restringido o limitado de servicios;

Repartir en forma horizontal zonas, mercados, clientes y fuentes de aprovisionamiento;

Concertar o coordinar posturas en las licitaciones o concursos;

Concertar la limitación o control del desarrollo técnico o las inversiones destinadas a la producción o comercialización de bienes y servicios;

Impedir, dificultar u obstaculizar a terceras personas la entrada o permanencia en un mercado o excluirlas de éste;

Fijar, imponer o practicar, directa o indirectamente, en acuerdo con competidores o individualmente, de cualquier forma precios y condiciones de compra o de venta de bienes, de prestación de servicios o de producción;

Regular mercados de bienes o servicios, mediante acuerdos para limitar o controlar la investigación y el desarrollo tecnológico, la producción de bienes o prestación de servicios, o para dificultar inversiones destinadas a la producción de bienes o servicios o su distribución;

Subordinar la venta de un bien a la adquisición de otro o a la utilización de un servicio, o subordinar la prestación de un servicio a la utilización de otro o a la adquisición de un bien;

Sujetar la compra o venta a la condición de no usar, adquirir, vender o abastecer bienes o servicios producidos, procesados, distribuidos o comercializados por un tercero;

Imponer condiciones discriminatorias para la adquisición o enajenación de bienes o servicios sin razones fundadas en los usos y costumbres comerciales;

Negarse injustificadamente a satisfacer pedidos concretos, para la compra o venta de bienes o servicios, efectuados en las condiciones vigentes en el mercado de que se trate;

Suspender la provisión de un servicio monopólico dominante en el mercado a un prestatario de servicios públicos o de interés público;

Enajenar bienes o prestar servicios a precios inferiores a su costo, sin razones fundadas en los usos y costumbres comerciales con la finalidad de desplazar la competencia en el mercado o de producir daños en la imagen o en el patrimonio o en el valor de las marcas de sus proveedores de bienes o servicios.

Anexo E. Estado de resultados mes a mes del primer año para el escenario pesimista

	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
Ventas	\$ 94.500,00	\$ 94.500,00	\$ 94.500,00	\$ 132.300,00	\$ 132.300,00	\$ 170.100,00
(Costos)	\$ 1.280,13	\$ 1.280,13	\$ 1.280,13	\$ 1.706,84	\$ 1.463,00	\$ 2.133,55
Margen Bruto	\$ 93.219,87	\$ 93.219,87	\$ 93.219,87	\$ 130.593,16	\$ 130.837,00	\$ 167.966,45
(Gastos de administracion)	\$ 85.903,93	\$ 85.903,93	\$ 85.903,93	\$ 85.903,93	\$ 85.903,93	\$ 85.903,93
(Gastos de comercializacion)	\$ 7.700,00	\$ 7.700,00	\$ 7.700,00	\$ 7.700,00	\$ 7.700,00	\$ 7.700,00
Resultado Operativo	-\$ 384,06	-\$ 384,06	-\$ 384,06	\$ 36.989,23	\$ 37.233,06	\$ 74.362,52
(Amortizaciones)	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17
Resultado antes de intereses e impuestos	-\$ 5.569,23	-\$ 5.569,23	-\$ 5.569,23	\$ 31.804,06	\$ 32.047,90	\$ 69.177,35
(Intereses)	\$ 53.210,33	\$ 53.491,15	\$ 53.491,15	\$ 53.232,41	\$ 53.479,97	\$ 53.243,59
Resultado imponible	-\$ 58.779,56	-\$ 59.060,38	-\$ 59.060,38	-\$ 21.428,35	-\$ 21.432,07	\$ 15.933,76
(Impuestos)	\$ 3.307,50	\$ 3.307,50	\$ 3.307,50	\$ 4.630,50	\$ 4.630,50	\$ 11.530,32
Resultado Neto	-\$ 62.087,06	-\$ 62.367,88	-\$ 62.367,88	-\$ 26.058,85	-\$ 26.062,57	\$ 4.403,45

	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 11	Mes 12
Ventas	\$ 170.100,00	\$ 170.100,00	\$ 170.100,00	\$ 170.100,00	\$ 170.100,00	\$ 170.100,00
(Costos)	\$ 2.133,55	\$ 2.133,55	\$ 2.133,55	\$ 2.133,55	\$ 2.133,55	\$ 2.133,55
Margen Bruto	\$ 167.966,45	\$ 167.966,45	\$ 167.966,45	\$ 167.966,45	\$ 167.966,45	\$ 167.966,45
(Gastos de administracion)	\$ 85.903,93	\$ 85.903,93	\$ 85.903,93	\$ 85.903,93	\$ 85.903,93	\$ 85.903,93
(Gastos de comercializacion)	\$ 7.700,00	\$ 7.700,00	\$ 7.700,00	\$ 7.700,00	\$ 7.700,00	\$ 7.700,00
Resultado Operativo	\$ 74.362,52	\$ 74.362,52	\$ 74.362,52	\$ 74.362,52	\$ 74.362,52	\$ 74.362,52
(Amortizaciones)	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17
Resultado antes de intereses e impuestos	\$ 69.177,35	\$ 69.177,35	\$ 69.177,35	\$ 69.177,35	\$ 69.177,35	\$ 69.177,35
(Intereses)	\$ 53.468,68	\$ 53.468,68	\$ 52.863,00	\$ 53.434,21	\$ 53.254,81	\$ 53.422,63
Resultado imponible	\$ 15.708,67	\$ 15.708,67	\$ 16.314,35	\$ 15.743,14	\$ 15.922,54	\$ 15.754,72
(Impuestos)	\$ 11.451,54	\$ 11.451,54	\$ 11.663,52	\$ 11.463,60	\$ 11.526,39	\$ 11.467,65
Resultado Neto	\$ 4.257,14	\$ 4.257,14	\$ 4.650,83	\$ 4.279,54	\$ 4.396,15	\$ 4.287,07

Anexo F. Estado de resultados mes a mes del primer año para el escenario moderado

	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
Ventas	\$ 114.750,00	\$ 114.750,00	\$ 114.750,00	\$ 160.650,00	\$ 160.650,00	\$ 206.550,00
(Costos)	\$ 1.554,44	\$ 1.554,44	\$ 1.554,44	\$ 2.072,59	\$ 2.072,59	\$ 2.590,74
Margen Bruto	\$ 113.195,56	\$ 113.195,56	\$ 113.195,56	\$ 158.577,41	\$ 158.577,41	\$ 203.959,26
(Gastos de administracion)	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60
(Gastos de comercializacion)	\$ 10.000,00	\$ 10.000,00	\$ 10.000,00	\$ 10.000,00	\$ 10.000,00	\$ 10.000,00
Resultado Operativo	-\$ 5.485,04	-\$ 5.485,04	-\$ 5.485,04	\$ 39.896,81	\$ 39.896,81	\$ 85.278,66
(Amortizaciones)	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17
Resultado antes de intereses e impuestos	-\$ 10.670,21	-\$ 10.670,21	-\$ 10.670,21	\$ 34.711,64	\$ 34.711,64	\$ 80.093,50
(Intereses)	\$ 53.210,33	\$ 53.491,15	\$ 53.491,15	\$ 53.232,41	\$ 53.479,97	\$ 53.243,59
Resultado imponible	-\$ 63.880,54	-\$ 64.161,36	-\$ 64.161,36	-\$ 18.520,77	-\$ 18.768,33	\$ 26.849,91
(Impuestos)	\$ 4.016,25	\$ 4.016,25	\$ 4.016,25	\$ 5.622,75	\$ 5.622,75	\$ 16.626,72
Resultado Neto	-\$ 67.896,79	-\$ 68.177,61	-\$ 68.177,61	-\$ 24.143,52	-\$ 24.391,08	\$ 10.223,19

	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 11	Mes 12
Ventas	\$ 206.550,00	\$ 206.550,00	\$ 206.550,00	\$ 206.550,00	\$ 206.550,00	\$ 206.550,00
(Costos)	\$ 2.590,74	\$ 2.590,74	\$ 2.590,74	\$ 2.590,74	\$ 2.590,74	\$ 2.590,74
Margen Bruto	\$ 203.959,26	\$ 203.959,26	\$ 203.959,26	\$ 203.959,26	\$ 203.959,26	\$ 203.959,26
(Gastos de administracion)	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60
(Gastos de comercializacion)	\$ 10.000,00	\$ 10.000,00	\$ 10.000,00	\$ 10.000,00	\$ 10.000,00	\$ 10.000,00
Resultado Operativo	\$ 85.278,66	\$ 85.278,66	\$ 85.278,66	\$ 85.278,66	\$ 85.278,66	\$ 85.278,66
(Amortizaciones)	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17
Resultado antes de intereses e impuestos	\$ 80.093,50	\$ 80.093,50	\$ 80.093,50	\$ 80.093,50	\$ 80.093,50	\$ 80.093,50
(Intereses)	\$ 53.468,68	\$ 53.468,68	\$ 52.863,00	\$ 53.434,21	\$ 53.254,81	\$ 53.422,63
Resultado imponible	\$ 26.624,82	\$ 26.624,82	\$ 27.230,50	\$ 26.659,29	\$ 26.838,69	\$ 26.670,87
(Impuestos)	\$ 16.547,94	\$ 16.547,94	\$ 16.759,92	\$ 16.560,00	\$ 16.622,79	\$ 16.564,05
Resultado Neto	\$ 10.076,88	\$ 10.076,88	\$ 10.470,57	\$ 10.099,29	\$ 10.215,90	\$ 10.106,81

Anexo G. Estado de resultados mes a mes del primer año para el escenario optimista

	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
Ventas	\$ 135.000,00	\$ 135.000,00	\$ 135.000,00	\$ 189.000,00	\$ 189.000,00	\$ 243.000,00
(Costos)	\$ 1.828,76	\$ 1.828,76	\$ 1.828,76	\$ 2.438,34	\$ 2.438,34	\$ 3.047,93
Margen Bruto	\$ 133.171,24	\$ 133.171,24	\$ 133.171,24	\$ 186.561,66	\$ 186.561,66	\$ 239.952,07
(Gastos de administracion)	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60
(Gastos de comercializacion)	\$ 11.000,00	\$ 11.000,00	\$ 11.000,00	\$ 11.000,00	\$ 11.000,00	\$ 11.000,00
Resultado Operativo	\$ 13.490,65	\$ 13.490,65	\$ 13.490,65	\$ 66.881,06	\$ 66.881,06	\$ 120.271,48
(Amortizaciones)	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17
Resultado antes de intereses e impuestos	\$ 8.305,48	\$ 8.305,48	\$ 8.305,48	\$ 61.695,89	\$ 61.695,89	\$ 115.086,31
(Intereses)	\$ 53.210,33	\$ 53.491,15	\$ 53.491,15	\$ 53.232,41	\$ 53.479,97	\$ 53.243,59
Resultado imponible	-\$ 44.904,85	-\$ 45.185,67	-\$ 45.185,67	\$ 8.463,48	\$ 8.215,92	\$ 61.842,72
(Impuestos)	\$ 4.725,00	\$ 4.725,00	\$ 4.725,00	\$ 9.577,22	\$ 9.490,57	\$ 30.149,95
Resultado Neto	-\$ 49.629,85	-\$ 49.910,67	-\$ 49.910,67	-\$ 1.113,74	-\$ 1.274,65	\$ 31.692,77

	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes 10	Mes 11	Mes 12
Ventas	\$ 243.000,00	\$ 243.000,00	\$ 243.000,00	\$ 243.000,00	\$ 243.000,00	\$ 243.000,00
(Costos)	\$ 3.047,93	\$ 3.047,93	\$ 3.047,93	\$ 3.047,93	\$ 3.047,93	\$ 3.047,93
Margen Bruto	\$ 239.952,07	\$ 239.952,07	\$ 239.952,07	\$ 239.952,07	\$ 239.952,07	\$ 239.952,07
(Gastos de administracion)	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60	\$ 108.680,60
(Gastos de comercializacion)	\$ 11.000,00	\$ 11.000,00	\$ 11.000,00	\$ 11.000,00	\$ 11.000,00	\$ 11.000,00
Resultado Operativo	\$ 120.271,48	\$ 120.271,48	\$ 120.271,48	\$ 120.271,48	\$ 120.271,48	\$ 120.271,48
(Amortizaciones)	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17	\$ 5.185,17
Resultado antes de intereses e impuestos	\$ 115.086,31	\$ 115.086,31	\$ 115.086,31	\$ 115.086,31	\$ 115.086,31	\$ 115.086,31
(Intereses)	\$ 53.468,68	\$ 53.468,68	\$ 52.863,00	\$ 53.434,21	\$ 53.254,81	\$ 53.422,63
Resultado imponible	\$ 61.617,63	\$ 61.617,63	\$ 62.223,31	\$ 61.652,10	\$ 61.831,50	\$ 61.663,68
(Impuestos)	\$ 30.071,17	\$ 30.071,17	\$ 30.283,16	\$ 30.083,23	\$ 30.146,02	\$ 30.087,29
Resultado Neto	\$ 31.546,46	\$ 31.546,46	\$ 31.940,15	\$ 31.568,86	\$ 31.685,47	\$ 31.576,39