

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

DETERMINACIÓN DE LA REPLICACIÓN VIRAL EN MUESTRAS DE TUMORES GINECOLÓGICOS INFECTADOS CON UN CRAd

Malnero, Cristian Miguel – LU 1010624

Licenciatura en Biotecnología

Bermúdez, Ismael Rodolfo – LU 123433

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Dra. López, María Verónica

Profesora Titular (UADE)

Investigadora (CONICET)

Diciembre 18, 2013



UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

Queremos expresar, mediante las siguientes líneas, nuestro más profundo y sincero agradecimiento a aquellas personas que nos han acompañado en la realización del proyecto final de la carrera.

En primer término a nuestra tutora, la Dra María Verónica López, por su infinita paciencia en el seguimiento de nuestro trabajo, por el apoyo recibido y por haber confiado en nosotros.

Merecen nuestro agradecimiento también, el Dr. Osvaldo Podhajcer, por permitirnos llevar a cabo el trabajo en su laboratorio y la Lic. Mariela Gangemi por la colaboración prestada.

Quisieramos extender nuestra gratitud a todos los docentes de UADE que nos han formado a lo largo de todos estos años.

Finalmente un agradecimiento especial para nuestras familias por el acompañamiento permanente y la motivación brindada durante todo este tiempo.

Muchísimas gracias a todos.

Índice

Resumen	4
Abstract	6
Introducción.....	7
Estado del Arte	9
Cáncer de Cérvix y HPV	9
Cáncer de Ovario	10
Viroterapia	11
Microambiente tumoral del carcinoma.....	13
Hipótesis.....	15
Materiales y Métodos	16
Vectores virales y ADN de líneas celulares	16
Obtención y procesamiento de las muestras.....	16
Extracción de ADN.....	17
Reacción en cadena de la polimerasa	18
Explicación de la técnica.....	18
Puesta a punto de la reacción para detectar HPV en muestras de pacientes.....	22
Amplificación de ADN del virus de HPV en las muestras de pacientes	23
Clonado.....	24
Explicación de la técnica utilizada.....	24
Clonado del producto de la PCR para genotipificar	27
Secuenciación de ADN.....	28
Análisis de las secuencias	29
Real-Time PCR.....	29
Explicación de la técnica utilizada.....	29
Determinación de la replicación viral en muestras de pacientes.....	33
Costos de la investigación	35
Resultados	36
Muestras analizadas	37
Análisis de la replicación viral en muestras de pacientes.....	37
Análisis de la presencia de HPV en muestras de pacientes	43

Puesta a punto de la reacción de PCR.....	43
PCR para genotipificar HPV	44
Clonado de los productos de PCR	47
Secuenciación	49
Análisis de las secuencias de amplificación MY09/11	49
Costos de la Investigación	61
Discusión	67
Conclusiones	69
Bibliografía.....	70
Anexo A	76
Anexo B:.....	82
Anexo C: Propuesta de Tema PFI.....	89

Resumen

El cáncer de cuello de útero (cervix) es el segundo cáncer más frecuente en mujeres después del de mama en el mundo (con aproximadamente 500.000 nuevos casos al año en todo el mundo). Y aunque el cáncer de ovario es el sexto más frecuente entre las mujeres, éste posee una mayor morbilidad, fundamentalmente por la falta de un diagnóstico precoz de la enfermedad con lo cual todas las terapias deben ser aplicadas en estadios avanzados.

Con el propósito de mejorar el tratamiento de las enfermedades neoplásicas resistentes a terapias convencionales se propone el uso de la viroterapia, que reside en el uso de virus replicativos modificados de tal manera que resulten activos en el tumor y no sean dañinos en los tejidos sanos. El laboratorio de Terapia Molecular y Celular del Instituto Leloir ha desarrollado para tal fin dos adenovirus de replicación condicional (CRAd), denominados AdF512v1 y AdF512v4.

Este proyecto tiene como objetivo analizar en un sistema *ex vivo* la eficacia de estos virus oncolíticos en muestras de tumores de pacientes con cáncer de útero u ovario a través del análisis de su replicación. Para evaluar esto se han llevado a cabo Real-Time PCR, que amplifica el gen E4 del vector de ambos virus. Los resultados obtenidos no son concluyentes y deben ser confirmados con más muestras pero se puede inferir que los CRAd funcionan mejor en muestras de cáncer de ovario que las de cérvix.

Por otro lado, el cáncer de cuello uterino (cérvix) y el virus de papiloma humano (HPV) han sido epidemiológicamente vinculados, con lo cual nos propusimos poder correlacionar la replicación viral con el genotipo de HPV presente en la muestras. Es por eso que nos propusimos establecer las condiciones óptimas para una PCR que permita amplificar el virus de HPV. Para esto realizamos extracción de ADN tanto de líneas celulares conocidas como de las muestras, posteriormente amplificamos el gen L1 del HPV por PCR, clonamos el producto obtenido y por último lo secuenciamos.

Se ha corroborado que todas las muestras de cáncer de útero estaban infectadas con HPV y se detectó la presencia de este virus en una muestra de cáncer de ovario, lo que podría abrir una nueva ventana de investigación sobre la etiología de esta enfermedad.

Por último, queremos mencionar que nuestro análisis de costos nos permitió comparar el costo de genotipificar en las condiciones ideales determinadas por nosotros vs.

los kits comerciales disponibles, que resultan a veces poco versátiles y actualmente de difícil acceso por las restricciones de importación.

Abstract

The cervical cancer (cervix) is the second most common type of cancer in women, only after breast cancer, in the world (approximately 500,000 new cases per year worldwide). Although ovarian cancer is the sixth most common type of cancer in women, it has a higher morbidity, mainly because of the absence of an early diagnosis of this disease; due to these all therapies are attempted in advanced stages of the illness.

In order to improve the treatment of neoplastic diseases, which is resistant to conventional therapies, it is proposed the use of virotherapy. It consists in using modified replicative viruses to target tumoral tissues and not normal ones. The Leloir Institute's laboratory has developed for this purpose two conditional replicative adenoviruses (CRAd), known as AdF512v1 and AdF512v4.

This project aims to analyze the effectiveness of these oncolytic viruses applied to an *in vivo* system, which is made of patients' cervical or ovarian tumor samples, through the measurement of the replication rate of these viruses. To test *Real-Time* PCR to amplify E4 gene from the vectors have been done. Although the results are not conclusive and should be confirmed with the inclusion of more tumor samples, it may be inferred that the CRAd viruses act better in ovarian than in cervical cancer.

Furthermore, cervical cancer and human papillomavirus (HPV) have been associated epidemiologically, due to this we proposed to correlate the viral replication rate with the HPV genotype in the infected samples. With this purpose we decided to set up the optimal conditions for PCR that allow the amplification of the HPV virus. We performed DNA extraction from known cell lines and tumor samples, then we amplified by PCR L1 gene of HPV, we cloned the products obtained, and finally we sequenced them.

Finally, we want to mention that our cost analysis allows us to compare the cost of genotyping's cost between using some custom ideal laboratory's conditions and the use of commercial kits, which are very expensive, less versatile and sometimes inaccessible by import restrictions.

Introducción

En la Argentina los principales cánceres ginecológicos corresponden a los de cuello uterino (cérvix) y ovario. Se diagnostican 4900 mujeres anualmente y se producen 1600 muertes por año. El cáncer de ovario tiene una incidencia menor (4/100.000) pero la sobrevivida a los 5 años de los pacientes en estadios avanzados es aún baja. Con el propósito de mejorar el tratamiento de estas neoplasias resistentes a las terapias convencionales (cirugía, quimioterapia y radiación) se propone en este trabajo la utilización de la viroterapia. Esta disciplina utiliza un virus que al replicarse mata al tumor y no al tejido normal. El desarrollo y la progresión de un tumor sólido hacia un fenotipo maligno (metastásico) dependen fundamentalmente de las interacciones entre las células malignas y las células del microambiente del tumor o estroma. Nuestra hipótesis general es que un adenovirus oncolítico (CRAd, del inglés *Conditional Replicative Adenovirus*) puede replicarse en los principales componentes de un tumor (tanto en la célula maligna como en el estroma) y mediar entonces su destrucción.

Es nuestro objetivo general analizar la efectividad de un agente biológico (virus oncolítico) en muestras de pacientes con cáncer de cervix y de ovario. En segundo lugar, poner a punto una PCR para la determinación de HPV (virus del papiloma humano) en las muestras tumorales de pacientes.

La seguridad de los adenovirus oncolíticos de infectar selectivamente el tumor ha sido probada en tratamientos de cáncer a través de numerosos ensayos clínicos. En el laboratorio de Terapia Molecular y Celular del Instituto Leloir se han desarrollado dos adenovirus de replicación condicional (CRAd), denominándolos AdF512v1 y AdF512v4, éste último posee el promotor de la proteína SPARC asociado a dos motivos respondedores a hipoxia e inflamación. A su vez este promotor quimera se encuentra dirigiendo la expresión del gen viral E1AΔRb (que no puede unir la proteína de retinoblastoma) y el virus tiene una fibra quimera 5/3 que le permite ampliar su rango de infección a las células tumorales [1]. El CRAd AdF512v1 fue utilizado para infectar las muestras de los pacientes con cáncer de útero u ovario y posteriormente evaluar la efectividad del mismo a través del análisis de su replicación.

Con respecto a establecer las condiciones óptimas para una PCR que permita amplificar el virus de HPV en muestras infectadas, es sabido que el cáncer de cuello uterino (cérvix) y el virus de papiloma humano (HPV) han sido epidemiológicamente vinculados [2].

A continuación describiremos: el estado del arte de este tema, la hipótesis de nuestra investigación, la metodología que utilizamos en el laboratorio, los resultados obtenidos, el análisis de costos de este proyecto y finalmente realizaremos una discusión de los mismos.

Estado del Arte

En la Argentina los principales cánceres ginecológicos corresponden a los de cuello uterino y ovario. En el caso de cáncer de cérvix se ha identificado la infección con el virus del papiloma humano (HPV) como uno de los principales agentes etiológicos relevantes[3].

Cáncer de Cérvix y HPV

A la fecha se han identificado más de 100 genotipos de HPV, clasificándose como de alto riesgo a las variantes 16, 18, 31 y 33. El HPV 16 es el más oncogénico seguido por el genotipo 18[4]. La amplificación utilizando los primers MY09/11 y posterior análisis por RFLP es uno de los métodos más frecuentes para la detección clínica de infección con HPV. Cuando fue diseñado, se habían reportado solamente las secuencias de 5 de los 20 (o más) genotipos de HPV genitales conocidos, específicamente los tipos 6, 11, 16, 18, y 33. Los cebadores fueron diseñados en una región conservada del gen L1 con la intención de amplificar en una sola reacción los cinco genotipos cuyas secuencias son conocidas y, presumiblemente, otros genotipos que compartan homología de secuencia en esta región. La región elegida no es del todo homóloga entre los cinco tipos de HPV, por lo tanto, los cebadores tienen una composición de bases degenerada. Durante la siguiente década, estudios con estos cebadores demostraron la capacidad de los mismos para amplificar un espectro de más de 30 tipos de HPV genitales, aunque con distintos niveles de sensibilidad [5].

La capacidad oncogénica de algunos tipos virales (16 y 18) reside en la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 [6]. Dado que E6 y E7 actúan a nivel de las vías en las cuales están involucradas las proteínas pRb y p53 el ADN viral de un adenovirus que no contenga E1A o E1B puede ser replicado [7]. De allí que otra de nuestras hipótesis es que el uso de un CRAd se verá potenciado por las proteínas virales E6 y E7, las cuales incrementarían la replicación adenoviral.

Con respecto a la aplicación de la viroterapia en el caso del cáncer de cérvix, donde el HPV, posee más del 90% de la responsabilidad de desarrollar esta enfermedad se están llevando a cabo estudios con adenovirus que buscan sensibilizar las células malignas

para radioterapia [8]o bien suprimir el crecimiento tumoral arretando la celular en la fase del ciclo celular G2/M [9].

Cáncer de Ovario

El cáncer de ovario es una de las principales enfermedades malignas a nivel mundial; Escandinavia, Israel, y Estados Unidos presentan la incidencia más alta dentro de los países desarrollados mientras que Japón se encuentra entre los valores más bajos [10-13]. En Estados Unidos se estiman 21880 nuevos casos por año y 13850 muertes por esta enfermedad en el año 2010 constituyendo la enfermedad ginecológica con mayor índice de mortalidad [14]. En la Argentina el cáncer de ovario tiene una incidencia de 4/100000.

En los últimos años se ha comenzado a investigar una variedad de nuevos agentes biológicos. Si tuviéramos que describir al blanco molecular ideal para que dichos agentes puedan ser utilizados en una terapia clínica, este debería estar diferencialmente expresado en el tumor, debería tener un sitio molecular al cual se podría alcanzar con una droga y además ser imprescindible para la viabilidad de la célula tumoral. El problema del cáncer de ovario reside fundamentalmente en su heterogeneidad genética, que dificulta el hallazgo de dicho blanco molecular para todas las variedades de tumor [15]. Por otra parte, el carcinoma de ovario posee una diversidad de anormalidades, muchas de las cuales son el pivote para el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad.

Los virus replicativos y en especial los adenovirus han sido modificados para su utilización en el tratamiento de los tumores. Son virus en los cuales se intenta acotar la replicación viral al ámbito del tumor. El primer ensayo clínico fue realizado con el virus ONYX-015, un virus oncolítico de amplio espectro que no tiene replicación selectiva [16]. Este primer ensayo no resultó exitoso y en parte se lo atribuyó a la incapacidad del Ad5 de infectar las células de ovario que tienen escasa expresión del receptor CAR [16]. En un segundo estudio se utilizó otro tipo de virus (Edmonston B measles vaccine) y se observó que 14/21 pacientes presentaron una enfermedad estable y los niveles de CA-125 (marcador de tumor de ovario) se redujeron más del 30% en 5/21 pacientes [17]. Recientemente se ha publicado un trabajo en el cual utilizaron un adenovirus oncolítico que porta una mutación en el gen E1A que le impide la unión a retinoblastoma y fue pseudotipeado con el motivo RGD en la fibra viral [18]. En este caso E1A mutado está siendo dirigido por el promotor silvestre

del virus. Los autores del trabajo no encontraron mayores efectos adversos y los niveles de CA-125 se redujeron en 7 de 21 pacientes aunque no se observó una regresión tumoral concreta a lo largo del seguimiento de los mismos [18]. Este año se ha publicado un trabajo en el cual al virus anterior se le modificó la fibra por una fibra quimera 5/3 y fue bien tolerado en pacientes, aunque sólo tres de ellos mostraron disminución del marcador CA-125 [19].

Un temamuy importante que no hay que olvidar cuando se diseñan tratamientos para cáncer es el microambiente tumoral (estroma). El microambiente tumoral es un regulador crucial del desarrollo del tumor, este concepto ha sido propuesto por Paget hace muchos años como la hipótesis del suelo y la semilla [20]. Los tumores heterogéneos son órganos que además de las células malignas están compuestos por fibroblastos asociados a los tumores, células endoteliales e inflamatorias [20, 21]. Estas células que se encuentran acompañando a las células tumorales, y que llamaremos células estromales asociadas al tumor, son las que proveen el suelo en el cual las células malignas crecerán, invadirán y metastatizarán [22-24]. El grupo de Terapia Molecular y Celular del Instituto Leloir ha trabajado muchos años en el diseño de vectores virales que pudieran ser activos tanto en la célula maligna como en el estroma que la ayuda a crecer y metastatizar. En particular en cáncer de ovario han demostrado que la utilización de un fragmento del promotor de la proteína SPARC como elemento regulador de la replicación viral permitió la replicación del virus *in vitro* en líneas de cultivo, *in vivo* en un modelo de metástasis diseminado en el peritoneo y en muestras de pacientes [1]. Por otro lado, la presencia del estroma incrementa su actividad [1].

Viroterapia

Con el propósito de mejorar el tratamiento de las enfermedades neoplásicas resistentes a las terapias convencionales una de las estrategias que se podrían implementar es el uso de viroterapia. La viroterapia es uno de los nuevos enfoques de la terapia génica que se utiliza para el tratamiento del cáncer, en el cual el virus porta un gen terapéutico o su misma replicación constituye el agente anticancerígeno que lleva finalmente a la muerte celular [25, 26]. Esta nueva disciplina utiliza virus replicativos modificados de tal manera que resulten activos en el tumor y no puedan ser dañinos en los tejidos normales que circundan el tumor. En la actualidad existen diversos virus que se desarrollaron para viroterapia, entre ellos:

adenovirus, retrovirus, vaccinia, adeno-asociados, pox-virus, alfa virus, reovirus, Newcastle Disease virus, myoxavirus y herpes virus [27]. En particular los adenovirus han resultado ser uno de los agentes más utilizados por la terapia génica en el tratamiento del cáncer dada su baja patogenicidad en humanos, su escasa integración genómica, su crecimiento en alto título, su facilidad de modificación genética, no requieren que la célula se esté dividiendo para infectarla y que han sido usados en diversos ensayos clínicos [28]. La mayoría de los resultados de los ensayos clínicos fueron obtenidos con adenovirus tipo 5 (Ad5) y revelaron que aún no se ha solucionado la falta de un sistema de transferencia de genes que resulte efectivo y llegue específicamente a la célula blanco [29, 30]. Para poder resolver este problema se han propuesto modificaciones en el genoma viral que alteren el tropismo así como también la transcripción viral [26]. La primera de ellas incluye modificaciones de la cápside de los vehículos virales (sustitución de la fibra¹ por ejemplo) para que el virus llegue específicamente a la célula tumoral (*retargeting* en inglés o redireccionamiento del tropismo) [31]. La segunda opción es la modificación del genoma adenoviral (redireccionamiento transcripcional) con el propósito de lograr selectividad de replicación viral únicamente en la célula tumoral. Los adenovirus de replicación condicional (CRAAd, *Conditionally Replicative Adenovirus*) llevan promotores específicos que son activos en la *célula maligna* dirigiendo la expresión de los genes virales más importantes para la replicación (como por ejemplo E1A) y así lograr que los adenovirus se multipliquen en forma específica en las células tumorales [32]. El tratamiento administrado debe ser seguro y evitar la toxicidad en tejidos normales, es por ello que la principal restricción que se le impondrá al CRAAd a desarrollar es la incapacidad de replicarse en células normales, para ello se utilizan mutaciones de la proteína E1A que reducen la unión a la proteínas de retinoblastoma (Rb) y/o p300/CPB [33].

En cuanto a la construcción de promotores quimera es importante resaltar que están formados por elementos de distinto origen que pueden ofrecer mayor especificidad, así como la posibilidad de aplicación en un amplio rango de tipos tumorales complementando y potenciando las propiedades de los diferentes componentes [34]. En particular se mencionarán los elementos de respuesta a hipoxia e inflamación. Los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) ya han sido utilizados para potenciar la actividad transcripcional de un promotor o elemento respondedor en condiciones de hipoxia. Hernandez-Alcoceba y colaboradores han

¹La fibra viral es una estructura protéica que se une a un receptor celular, permitiéndole al virus infectar la célula.

utilizado los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) para potenciar la respuesta de un promotor conteniendo elementos de respuesta a estrógeno (ERE) en tumores de mama [35]. Estos mismos elementos de respuesta a hipoxia han sido combinados con elementos de respuesta a radiación [36] y con promotores específicos de endotelio y elementos inducibles por citoquinas (NFκB) [37]. Otra de las características del tejido tumoral es la presencia de numerosas células del sistema inmune que producen proteínas pro-inflamatorias que inducen al factor transcripcional denominado Factor Nuclear κ B (NFκB). NFκB pertenece a una familia de proteínas que regulan la expresión de genes relacionados con inmunidad innata, inflamación y apoptosis (revisado en [38]). Los sitios de unión para este factor transcripcional se encuentran en cientos de genes que responden en forma diferencial a su activación. En las células normales los complejos de NFκB se encuentran secuestrados en citoplasma y, por lo tanto, permanecen inactivos. A partir de estímulos como LPS, IL-1α o TNFα, NFκB se acumula en forma activa en el núcleo e induce la transcripción de genes [39].

Microambiente tumoral del carcinoma

En el caso del carcinoma de ovario más del 95% se origina a partir de células epiteliales de la superficie del ovario, conocido como OSE (del inglés, *ovarian surface epithelium*) [40]. El OSE es un mesotelio modificado que cubre la superficie del ovario y está separado del tejido estromal del ovario por una lámina basal [40]. La asociación celular entre el estroma y OSE influyen los filamentos intermedios del OSE y se cree que esto contribuye a inducir los primeros estadios de la progresión neoplásica [41]. Los tejidos tumorigénicos derivados de OSE también están asociados con tejido estromal y la invasión tumoral también requiere de esta asociación [40]. Por lo tanto, las interacciones entre la célula estromal y epitelial tiene un rol muy crítico en la función y el crecimiento del OSE tumorigénico [40].

La proteína SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) fue inicialmente descrita, por el grupo de Terapia Molecular y Celular del Instituto Leloir, jugando un rol central en la malignidad del melanoma humano [42]. El incremento de la expresión de SPARC ha sido descrito en una variedad de cánceres los cuales incluyen principalmente melanoma, colon y páncreas (ver [43-45] y las referencias que allí se

mencionan). En general la sobreexpresión de SPARC, ya sea por la célula maligna (como en el caso de melanoma) o los fibroblastos o células endoteliales del entorno tumoral (como en el caso de melanoma, colon, ovario y páncreas) se asocia a un mal pronóstico [45-47]. En ovario, SPARC fue visto en diferentes patrones de distribución en el estroma de los ovarios neoplásicos [48, 49]. Además, Brown y colaboradores demostraron que SPARC aumenta su expresión en el estroma reactivo asociado con cáncer de ovario invasivo y que existiría la posibilidad de que SPARC secretada por el estroma sea internalizada por la célula de cáncer de ovario y ejerza efectos intracelulares [50]. Finalmente, el promotor de SPARC se encuentra metilado en un porcentaje muy importante de tumores de ovario y este es el factor que ayudaría a la sobrevida de los adenocarcinomas de ovario [51]. Este último punto es muy importante ya que el promotor de SPARC en el contexto adenoviral resulta activo en células en las cuales el silenciamiento de SPARC se deba a metilación del promotor endógeno [52] del mismo modo que sucede con el promotor de cox-2 en un modelo de páncreas [53].

Hipótesis

Nuestra hipótesis es que los adenovirus CRAAd desarrollados en laboratorio, son capaces de replicarse en muestras de tumores de pacientes con cáncer de cérvix y ovario. En segundo lugar en un futuro se espera poder correlacionar la respuesta a la replicación viral con el tipo de HPV que está infectando a la muestra del tumor de cérvix. De ahí la importancia de la puesta a punto de la PCR que se propone en este trabajo.

Materiales y Métodos

Vectores virales y ADN de líneas celulares

El ADN de las líneas celulares: CaSki (código ATCC: CRL-1550), Hela (código ATCC: CCL-2), SiHa (código ATCC: HTB-35) y SK-OV-3 (código ATCC: HTB-77); los vectores adenovirales AdF512-V1 [1], AdF512-V4, el virus silvestre Adwt 5/3 (WT) y los stocks utilizados en la curva de calibración fueron preparados previamente en el Laboratorio de Terapia Molecular y Celular del Instituto Leloir.

Para simplificar a partir de ahora los virus se llamarán v1, v4 y WT.

Obtención y procesamiento de las muestras

Las muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer de cuello de útero o de ovario fueron obtenidas mediante un acuerdo de colaboración firmado con el Hospital de Oncología Marie Curie. Las muestras fueron tomadas en el quirófano por el cirujano y su equipo en cirugías que forman parte del tratamiento estándar de la dolencia de las pacientes. Es importante mencionar que las muestras que se obtuvieron no interfirieron en el normal procesamiento del material remitido al laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital de Oncología Marie Curie. Lo que se solicitó fue el material sobrante, esto es una porción pequeña de aproximadamente 1- 0,5 cm³.

Cada paciente firmó un consentimiento informado en el cual manifiesta estar de acuerdo con que parte del material extraído en la cirugía será utilizado con fines de investigación, la cual fue aprobada por el Comité de Ética del hospital y el Comité de Bioética del Instituto Leloir. Se aclaró que el estudio del material tumoral puesto en presencia del virus para analizar la actividad oncolítica se realizará *in vitro* exclusivamente y no tendrá ninguna consecuencia en el tratamiento de las pacientes donantes ya que las mismas continuarán con el tratamiento estándar a su dolencia, no influyendo en nada la extracción del material para este estudio. Los investigadores y las pacientes no recibieron ningún beneficio económico por este estudio.

Inmediatamente luego de la toma de la muestra, las mismas se conservaron en hielo en medio de cultivo RPMI suplementado con antibióticos (ampicilina y estreptomicina) siendo procesadas en un lapso menor a las 3 horas en el Instituto Leloir. El traslado del material se realizó en un recipiente de transporte acorde a las normas de seguridad biológica que impide la filtración de dicho material y el procesamiento se realizó en una campana (de seguridad biológica nivel 2) alojada en un cuarto de cultivo preparado para trabajar bajo los niveles de seguridad biológica 2. Este cuarto tiene acceso restringido al personal y los investigadores deben entrar con guardapolvos, cofias, barbijos y cubre-calzado, así mismo se tomaron las precauciones necesarias para la manipulación y descarte del material punzocortante contaminado.

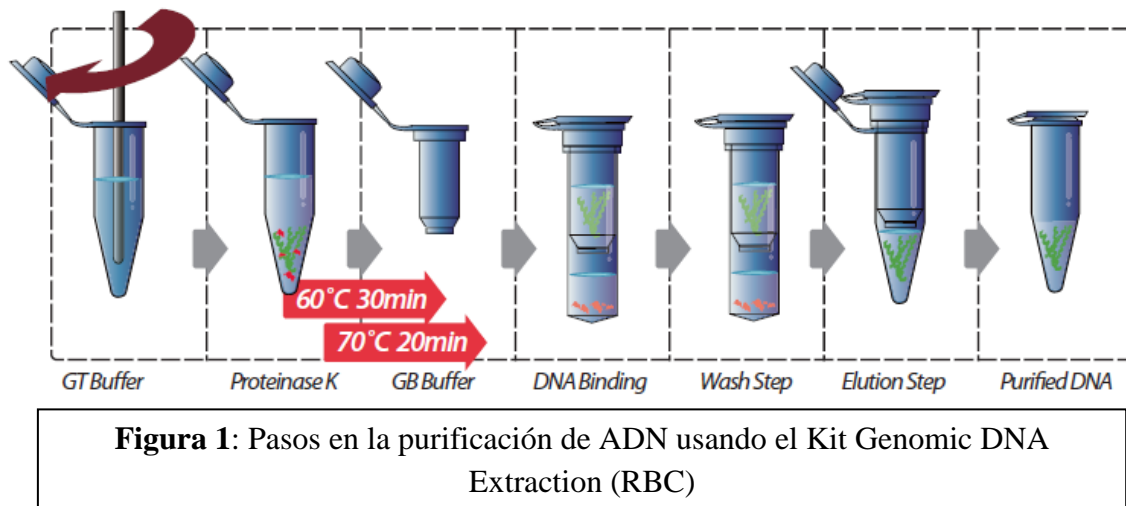
Las muestras fueron procesadas del siguiente modo[1]. Cada muestra se seccionó en trozos pequeños para su posterior utilización. Se colocó cada muestra en un multiwell de 24 y se infectó con cada CRAd (v1, v4 y el virus WT, este último como control positivo) a una MOI de 500 en medio RPMI suplementado con 2% de suero durante 5 horas.

Posteriormente se extrajo la muestra inicial de 5 horas (indicativo del nivel de infección de la muestra), luego se reemplazó el medio por medio fresco pero suplementado con 10% de suero. Finalmente se extrajeron las muestras a las 72 o 96 horas para evaluar la replicación y se conservaron en freezer a -80°C. Dependiendo del tamaño de la muestra inicial (y por lo tanto de la cantidad de trozos generados) se realizaron tres o cuatro réplicas de cada condición. Por un problema de tiempo y la falta de autorización para ingresar al área de cultivo, esta parte fue desarrollada por la Lic. Mariela A. Gangemi.

Extracción de ADN

La purificación de ADN de las muestras con los distintos tratamientos se realizó mediante el Kit comercial Genomic DNA Extraction de la empresa RBC, que permite la purificación de ADN total de gran variedad de tejidos y células animales. El método utiliza la proteinasa K y una sal caotrópica (cloruro de guanidinio) para lisar las células y degradar las proteínas. El ADN en presencia de la sal caotrópica se une fácilmente a la matriz de fibra de vidrio de una columna de centrifugación. Después de eliminar los contaminantes (con el uso de un buffer de lavado), el ADN purificado se eluye mediante una solución de bajo contenido

de sal (Buffer TE o agua) y está listo para ser utilizado en PCR u otras reacciones enzimáticas (Fig. 1).



A continuación se cuantificó la concentración de ADN, para esto se utilizó el equipo NanoDrop Spectrophotometer que funciona del siguiente modo: se coloca 1-2 μL de la solución a cuantificar en el sensor y el equipo se encarga de medir la Absorbancia de la solución a longitudes de onda de 260 y 280 nanómetros.

- La Abs a 260 nm le permite al software del equipo calcular la concentración de la muestra en $\text{ng}/\mu\text{L}$.
- La relación $\text{Abs } 260/\text{Abs } 270$ permite conocer si la muestra es pura o si está contaminada con proteínas. Se considera que una relación mayor a 1,7 indica pureza.

Reacción en cadena de la polimerasa

Explicación de la técnica

La reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) es una técnica que ha revolucionado e impulsado la investigación en biología molecular. Fue descrita en la década del 1980 por Kary Mullis, quien fue ganador del Premio Nobel por este trabajo [54].

Una de las mayores dificultades con que se enfrenta el estudio de una porción de ADN radica en la necesidad de poder disponer de él en estado puro y en grandes

cantidades. La gran utilidad de la PCR reside en la capacidad de producir *in vitro* un número enorme de copias de una determinada secuencia sin la necesidad de recurrir al clonaje de ADN. Esta metodología se ha instalado en los laboratorios de investigación básica, diagnóstico clínico y medicina legal.

La reacción se lleva a cabo *in vitro*, en un medio adecuado y en presencia de los componentes necesarios: cebadores, enzima polimerasa, los 4 dNTPs en exceso, Buffer de reacción (que contiene solución tampón y KCl), ADN molde, Mg^{2+} (en caso de ser requerido por la enzima). La técnica requiere conocer de ante mano las regiones que flanquean al producto deseado, debido a que se deben utilizar un par de cebadores o primers. Cada cebador es un oligonucleótido monocatenario de secuencia idéntica a uno de los extremos de la secuencia que se desea amplificar. Tras la unión de los primers la enzima polimerasa es capaz de realizar la reacción. El producto mayoritario será un fragmento de DNA doble cadena cuyo tamaño está definido la posición de los cebadores en el molde inicial y sus extremos 5' son los cebadores utilizados.

La enzima más utilizada es la denominada Taq-polimerasa, que es termoestable permitiendo realizar el proceso sin la necesidad de estar agregando la enzima luego de cada ciclo de reacción [54]. Además reduce la probabilidad de una unión no específica de cebadores. Actualmente existen muchas polimerasas comerciales, algunas son más fieles e introducen menos errores en la amplificación como por ejemplo la Vent^{MR} (New England Biolabs). También se comercializan polimerasas que sirven para variaciones de la PCR tradicional como la retrotranscriptasa que permite transcribir ARN en ADN copia.

La reacción consiste en la repetición de las siguientes etapas (Fig. 2):

- **Desnaturalización del DNA molde:** mediante la elevación de la temperatura para separar las hebras y permitir la unión de los primers.
- **Hibridación de primers:** se lleva la temperatura a un nivel adecuado, llamado temperatura de *annealing* (generalmente entre 40-68°C), para inducir la unión de los primers por complementariedad de bases a las regiones flanqueantes del producto. La Temperatura de la etapa depende de los cebadores y suele requerir varias pruebas hasta definir su valor óptimo. Se plantea un balance entre eficacia de la hibridación y la especificidad de la amplificación. Bajar la Temperatura implica la posibilidad de hibridación inespecífica, pero aumentarla puede producir que la misma se débil o no se produzca.

- Elongación:** Se lleva a la solución a la temperatura adecuada para el funcionamiento de la polimerasa (generalmente 72 °C). Como puede verse abajo únicamente la concentración del segmento limitado por ambos cebadores crece de manera exponencial(Fig. 3). El tiempo necesario para la síntesis de la región de DNA deseada es función de su longitud, a mayor longitud mayor tiempo de elongación se requerirá.

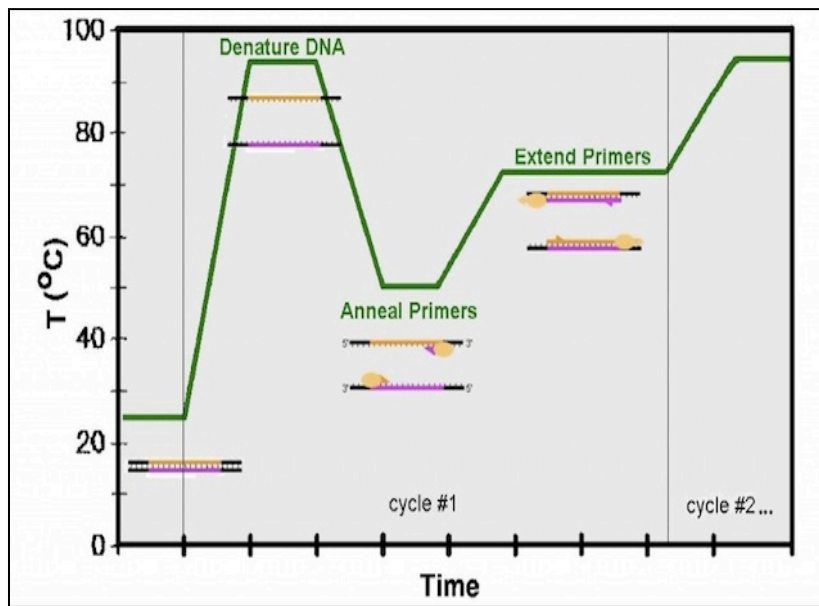


Figura 2: Etapas de una reacción de PCR.

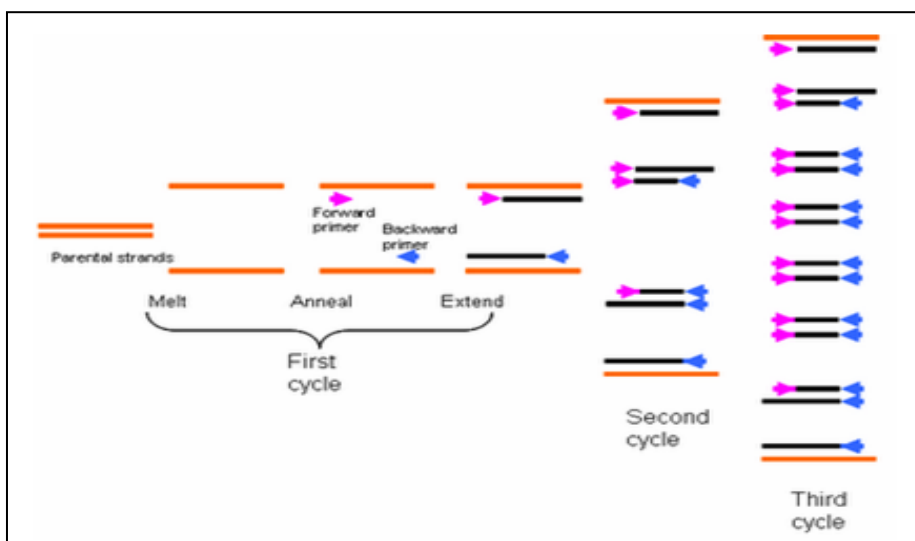


Figura 3: Crecimiento exponencial del producto de amplificación deseado.

La reacción se lleva a cabo en aparatos llamados termocicladores que pueden programarse para repetir cíclicamente las etapas antes mencionadas.

Los factores a tener en cuenta a la hora de diseñar los primers para una reacción de PCR son:

- La longitud de los oligonucleótidos (15-30 nt)
- La probabilidad de que se asocien a secuencias no perfectamente complementarias (para evitar productos no específicos)
- La composición de bases de los cebadores, lo ideal es que tengan un 50% de GC.
- Deben evitarse secuencias con bases repetidas (más de 3 o 4 seguidas), para dificultar uniones no correctas.
- La posibilidad de formación de estructuras bicatenarias, intermoleculares o intramoleculares, no productivas.

El método convencional utilizado para visualizar el resultado de una reacción de PCR es la electroforesis en gel de agarosa. Electroforesis se define como el movimiento de moléculas con carga en un campo eléctrico: las moléculas con carga negativa, como el ADN, migran hacia el electrodo positivo y las moléculas con carga positiva hacia el electrodo negativo. La agarosa es un polisacárido que forma geles con poros que varían de 100 nm a 300 nm de diámetro; el tamaño depende de la concentración de agarosa del gel.

Los factores que influyen en la velocidad de migración son la forma de la molécula y su carga eléctrica. Las moléculas de DNA tienen la misma forma (lineal) y, aunque su carga depende de su longitud, las diferencias de carga no son suficientes para determinar una separación eficaz. Por lo tanto en un gel la longitud molecular es el determinante crítico de la velocidad de migración ya que las moléculas más grandes se ven más obstaculizadas que las pequeñas por los poros. Por ende, la concentración del gel determina el rango de fragmentos de DNA que se pueden separar.

Un gel de agarosa se prepara mezclando la cantidad apropiada de polvo de agarosa con una solución de sustancia amortiguadora (Buffer), calentándola hasta disolver la agarosa. Se agrega el colorante bromuro de etidio que se intercala al ADN y permite la visualización de las bandas bajo luz UV. Después se deja enfriar hasta que gelifique. La corrida se lleva a cabo con el gel sumergido en el buffer, en una cuba a la cual se le aplica una diferencia de potencial (Fig. 4), el voltaje utilizado es un factor a tener en cuenta. A bajos

voltajes se separan mejor moléculas de gran tamaño, en cambio las de menor tamaño se separan mejor a voltajes mayores.

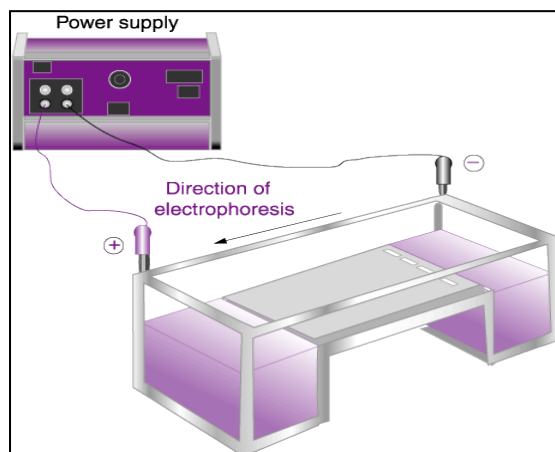


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa.

Puesta a punto de la reacción para detectar HPV en muestras de pacientes

Se realizaron reacciones de PCR utilizando diluciones 1/10 de ADN de las líneas celulares de cáncer de cuello de útero CaSki, HeLa y SiHa (de las cuales se conoce la sepa de HPV con la que están infectadas) y con ADN de una de las muestras. El objetivo fue probar distintas condiciones de cloruro de magnesio. Los controles negativos consistieron en reacciones con agua bidestilada en lugar de ADN molde. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes (ver Tabla I):

TABLA I: Condiciones reacción puesta a punto

Reactivo	Condición A(μL)	Condición B(μL)
Buffer 10x	2,5	2,5
dNTPs 10 mM de c/u	0,5	0,5
TAQ 5 U/μL	0,25	0,25
Primer forward 10 μM	1	1
Primer reverse 10 μM	1	1
MgCl ₂ 50mM	3	2
H ₂ O bidestilada	14,75	15,75
ADN molde	2	2
Total	25	25

El ciclo de amplificación fue de 5 minutos a 94°C, 40 ciclos (1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C) y 10 minutos a 72°C.

Los *primers* utilizados son MY09 y MY11, que han sido utilizados ampliamente en el diagnóstico de HPV[5]. Estos primers tienen como blanco una región conservada del marco de lectura del gen viral L1. Las secuencias de los mismos son las siguientes (donde M = A o C, W = A o T, Y = C o T y R = A o G):

- **MY09:** 5'-CGTCCMARRGGAWAC TGATC- 3'
- **MY11:** 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG- 3'

El resultado de la PCR se corrió en un gel de agarosa 1 % a 100 V (volts) y se visualizó en un transiluminador con luz UV.

Amplificación de ADN del virus de HPV en las muestras de pacientes

Se realizaron reacciones de PCR pero esta vez utilizando como molde ADN de las muestras de pacientes con cáncer de útero y a la concentración de magnesio (Condición B) determinada en la puesta a punto (ver Tabla II). El resultado de esta reacción se corrió también en un gel de agarosa 1% a 100 V y se visualizó en un transiluminador. Como control positivo se utilizó ADN de las líneas celular CaSki, HeLa y SiHa. También se probó la reacción utilizando ADN de la línea de ovario SK-OV-3.

TABLA II: Condiciones de reacción de PCR

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer 10x	10
dNTPs 10 mM de c/u	2
TAQ 5 U/µL	1
Primer forward 10 µM	4
Primer reverse 10 µM	4
MgCl ₂ 50mM	8
H ₂ O bidestilada	63
ADN molde	8
Total	100

La banda correspondiente al amplicón deseado se cortó con un bisturí y se purificó el ADN de la misma con el Kit comercial de extracción de gel Quick A-Quick (Qiagen). Este sistema combina la tecnología de columna de centrifugación con las

propiedades de unión selectiva del ADN a una membrana de sílice diseñada por la empresa. Incluye un buffer (llamado QG) que solubiliza la agarosa y proporciona las condiciones adecuadas para la unión del ADN a la columna (altas concentraciones de sal), mientras que los contaminantes pasan a través de la columna. EL ADN puro se eluye a bajas concentraciones de sal con Buffer TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) o agua.

Los purificados fueron re-amplificados por otra reacción de PCR bajo las mismas condiciones (pero utilizando 20 μ L de ADN molde en 100 μ L de reacción) y fueron corridos en un gel de agarosa 1% a 100 V. Nuevamente, las bandas obtenidas fueron purificadas mediante el Kit mencionado anteriormente para luego ser clonadas en el vector pCR[®]4-TOPO[®].

Clonado

Explicación de la técnica utilizada

La tecnología del clonaje de ADN es el núcleo central de la Ingeniería Genética. Comienza con una etapa in vitro en la cual se aísla material genético de su fuente biológica, se caracteriza y manipula mediante reacciones enzimáticas. El punto central de esta tecnología es la producción de moléculas ADN recombinante, resultantes de la unión del ADN pasajero con el ADN del vector, para luego transferirlas al interior de un sistema celular mediante el uso de vectores.

Existen dos tipos de metodologías de transformación en bacterias. La técnica clásica es conocida como química o de choque-térmico, en la cual se utilizan bacterias tratadas previamente con metales (Ca^{2+} , Rb^+ , Co^{2+} , etc.) para alterar su membrana de modo que al incrementar momentáneamente la temperatura sean permeables al paso de moléculas de ADN. La segunda metodología llamada Electroporación y consiste en aplicar descargas eléctricas para generar poros en la membrana del huésped y permitir el paso del ADN foráneo. Produce mejores rendimientos que la metodología clásica pero requiere de equipamiento específico (electroporador).

El objetivo de la técnica es que el ADN extraño se mantenga íntegro en los recombinantes y para lograr la amplificación del material genético.

Esta tecnología abrió la puerta para una serie de aplicaciones muy importantes, entre ellas, el estudio de regiones genómicas medias, grandes e incluso de genomas completos y la producción de proteínas de alto valor científico o económico. Así pues se ha convertido en un pilar importante en el desarrollo alcanzado en los últimos años por las ciencias médicas, biológicas y ambientales.

En este trabajo en particular utilizaremos como vector el plásmido comercial pCR[®]4-TOPO[®], el inserto será cada uno de los amplicones anteriormente generados por PCR y el hospedador será una cepa de *E. coli* competente a la transformación química.

El vector es suministrado linearizado, con un residuo de timidina sobresaliente en los extremos 3'. Estos residuos son complementarios a los residuos de adenina presentes en los extremos 3' del inserto, lo cual facilita la ligación. La enzima Taq polimerasa tiene actividad de transferasa terminal independiente de templado, por lo cual los productos de PCR generados con esta enzima poseen residuos de adenina en los extremos 3'.

Además el vector tiene unida covalentemente a la enzima Topoisomerasa I. La enzima se une al dúplex de ADN en sitios específicos y escinde la unión fosfodiéster después de la secuencia 5'-CCCTT en una hebra. La energía generada por la ruptura de esta unión se conserva mediante la formación de un enlace covalente entre el fosfato 3' de la cadena escindida y un residuo de tirosina (Tyr-274) de la Topoisomerasa I. El enlace entre el ADN y la enzima posteriormente puede ser atacado por los hidroxilos en los extremos 5' del inserto invirtiendo la reacción y liberando la Topoisomerasa. La clonación TOPO[®] explota esta reacción para clonar productos de PCR de manera eficiente (Fig. 5).

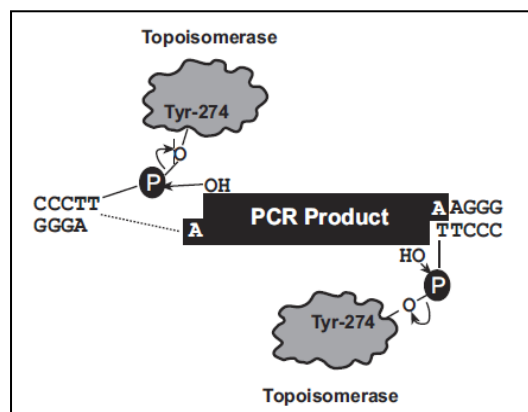


Figura 5: Sistema de Clonación TOPO[®].

El vector pCR[®]4-TOPO[®] (Fig. 6) permite la selección directa de recombinantes a través de la interrupción del gen letal, de *E. coli*, *ccdB*. El cual esta fusionado al extremo C-terminal del fragmento de *LacZα*. La ligación de un producto de PCR interrumpe la expresión de la fusión génica *lacZα-ccdB* permitiendo solamente que las bacterias que incorporaron el vector recombinante puedan crecer. Las células que contienen vector no recombinante mueren al expresar *ccdB*. En este caso no es necesaria la detección por color de las colonias (azul: colonias con vector no recombinante y blanco: colonias recombinantes) que se produce por la complementación de la región *LacZα* con el gen *LacZ* (β -galactosidasa) mutado en las bacterias utilizadas.

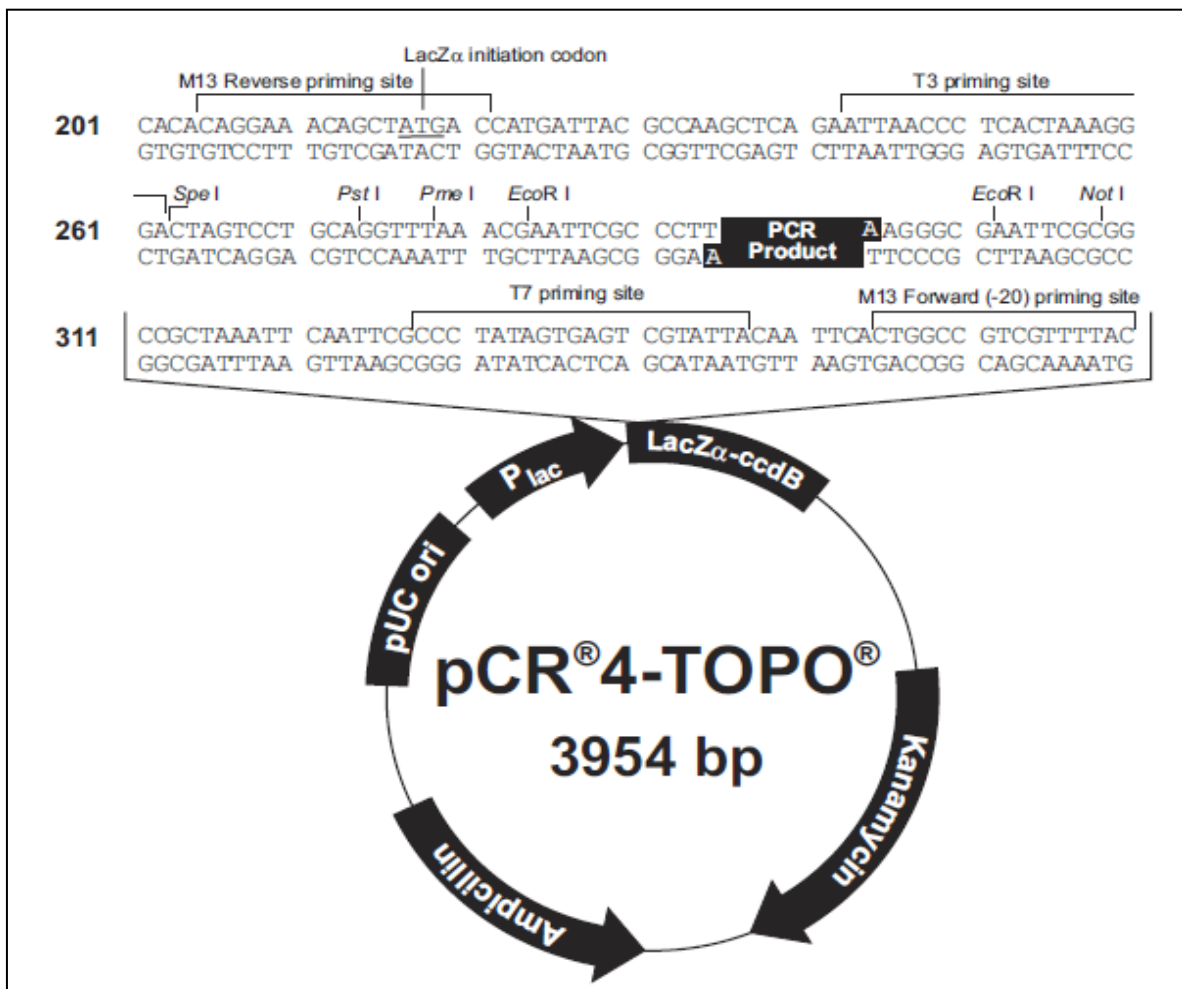


Figura 6: Mapa del vector pCR[®]4-TOPO[®].

Clonado del producto de la PCR para genotipificar

Los fragmentos producidos por PCR (muestras y control positivo) fueron insertados en vectores plasmídicos para amplificarlos en bacterias. Utilizamos el TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen).

Cada reacción se realizó con el agregado de los reactivos detallados a continuación (ver Tabla III). Se mezcló suavemente, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se dejó la reacción en hielo para proseguir con la transformación.

TABLA III: Detalle reacción de

Reactivo	Volumen (µL)
Producto de PCR	4
Solución salina (200 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂)	1
Vector pCR® 4-TOPO®	1

Se añadieron 2 µL de cada una de las reacción en un vial de bacterias *E. coli* DH5αTM-T1^R, competentes para transformación química, y se mezcló suavemente. Los viales fueron incubados en hielo durante 5 minutos, luego calentados a 42°C por 30 segundos sin agitación y situados nuevamente en hielo. A continuación se agregaron a cada vial 250 µL de medio S.O.C. a temperatura ambiente y se mantuvieron en agitación a 200 rpm durante 1 hora a 37 °C.

Se esparcieron 10-50 µL de cada transformación en una placa de Petri con medio LB suplementado con 50 µg/mL de ampicilina (precalentada 30 minutos a 37 °C) y se incubó durante la noche a 37 °C. Se sembraron diferentes volúmenes para asegurar que alguna placa tenga colonias bien espaciadas. Las colonias capaces de crecer en presencia de ampicilina han incorporado el vector y por lo tanto fueron seleccionadas.

Cuatro colonias de cada condición (muestras y control) fueron inoculadas en medio LB con ampicilina e incubadas a 37 °C durante toda la noche. Luego se procedió con el siguiente protocolo de purificación de ADN plasmídico (Miniprep):

- Agregar 1-1,5 ml del cultivo de bacterias a un tubo eppendorf.
- Centrifugar a máxima velocidad (21000 g) por 1 minuto.
- Agregar 100 µL de la solución P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH = 8,0) y mezclar por vortex.

- Agregar 100 μL de la solución P2 (0.2 M NaOH, 1% SDS).
- Añadir 100 μL de solución P3 (3 M KAc, pH= 4,8).
- Centrifugar 15 minutos a máxima velocidad (21000 g)
- Separar el sobrenadante, pasarlo a un tubo con 900 μL de etanol 100% y mantener a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.
- Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad (21000 g).
- Lavar el pellet con etanol 70%.
- Re-suspender en 30 μL de agua bidestilada.

Para confirmar la presencia de producto de PCR en los clones seleccionados, se realizó una digestión enzimática (ver Tabla IV) con la enzima *EcoRI*, la cual tiene sitios de reconocimientos a los extremos del sitio de clonado del vector (Fig. 6). Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa 1% a 100 V y se visualizaron en un transiluminador.

TABLA IV: Condiciones de la digestión enzimática

Reactivo	Volumen (μL)
NEBuffer <i>EcoRI</i> 10X	2
RNAsa	0,5
<i>EcoRI</i>	0,5
BSA	0,5
H ₂ O bidestilada	11,5
DNA purificado por Miniprep	5
Total	20

Secuenciación de ADN

Los fragmentos amplificados por PCR y clonados se secuenciaron en el servicio de secuenciación provisto por la Fundación Instituto Leloir, utilizando el cebadores universales T3 y T7, presentes en el plásmido TOPO-pCR4 (Invitrogen) que flanquean los productos clonados (ver Tabla V).

TABLA V: Secuencia primers para secuenciar.

Primer	Secuencia
T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Analisis de las secuencias

Construimos un vector pCR[®]4-TOPO[®] virtual conteniendo la secuencia del gen L1 de HPV-16, con el programa vector NTI. A continuación alineamos las secuencias obtenidas de CaSki y de la muestra de paciente con el vector virtual, para identificar que parte de la secuencia pertenece al vector y que parte a L1.

Luego realizamos una BLAST para ver si los resultados eran de algún genotipo en particular y finalmente descargamos secuencias de los genotipos de HPV de alto riesgo (Pubmed) y realizamos un alineamiento mutiple (con la herramienta ClustalW) contra las secuencias obtenidas en el laboratorio.

Real-Time PCR

Explicación de la técnica utilizada

La técnica PCR en tiempo real (*real time-PCR*) deriva de la PCR tradicional y se basa en lo que la amplificación por PCR de un determinado número (N_0) de moléculas de DNA rinde una cantidad final (N) que depende del número de ciclos de PCR realizados. La ecuación (1) indica la relación entre N_0 y N , donde Y es la eficiencia de la reacción y n es el número de ciclos. Debemos mencionar que para que esta ecuación se cumpla ninguno de los componentes de la reacción (nucleótidos, *primers* o enzima) debe encontrarse en cantidad limitante[55]. De este modo N_0 puede determinarse cuantificando la cantidad final del producto.

$$N = N_0 \times (1 + Y)^n \quad (1)$$

Los equipos de real time-PCR consisten básicamente en un aparato de PCR convencional y un espectrofluorímetro, que determina la fluorescencia que se produce en el

tubo de amplificación en todo momento a lo largo del proceso. Los equipos utilizan un láser para emitir la luz que excita al fluoróforo, y la tecnología de las cámaras de diodos computarizadas (CCD) para determinar la fluorescencia. La misma puede detectar distintas longitudes de onda en función del fluoróforo que se utiliza y son multicanal, lo que les permite realizar varios análisis simultáneos en el mismo tubo de PCR.

Podemos clasificar las técnicas de PCR cuantitativa de la siguiente manera:

- Basadas en fluorocromos inespecíficos, en las cuales se detecta la amplificación exponencial de ADN empleando un fluoróforo que se une inespecíficamente al ADN (Fig. 7). El colorante más utilizado es el SYBR Green (Invitrogen). En este caso solamente es posible amplificar un producto en cada reacción.
- Basadas en sondas específicas, a las cuales se unen dos fluorocromos e hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (*forward*) y el inverso (*reverse*); es decir en la región del amplicón. De este modo, cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando los dos fluorocromos están distantes debido a la degradación de la sonda mediante la actividad 5'-3' exonucleasa de laADN polimerasa, o bien debido a la separación física de los fluorocromos por un cambio en la conformación de la sonda(Fig. 8). Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen.

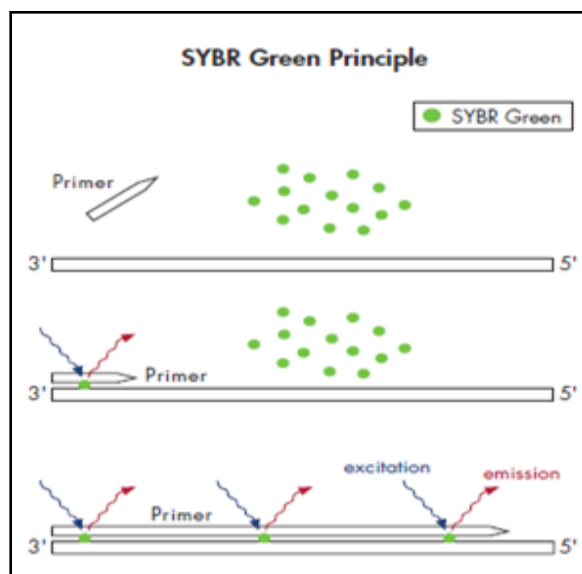


Figura 7: Detección de los productos de amplificación en una *real-time* PCR basada en la utilización de SYBR Green.

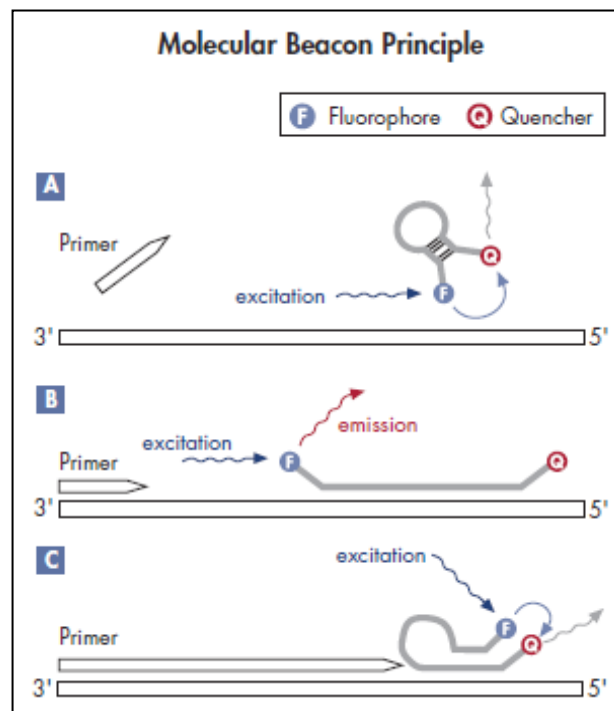


Figura 8: Detección de los productos de amplificación en una *real-time* PCR mediante la utilización de sondas basadas en el sistema FRET. (A) Antes de la hibridización, (B) durante la etapa de *annealing* y (C) durante la elongación.

La señal obtenida al final de cada ciclo de amplificación se representa en una gráfica frente al número de ciclos y se obtiene una curva que muestra el transcurso del proceso. La señal de fluorescencia debe ser normalizada, para lo cual se utiliza un colorante de referencia interna (por ejemplo: ROX) cuya presencia no interfiere con los ensayos y tiene un espectro de emisión completamente diferente de los fluoróforos comúnmente utilizados.

Para lograr la cuantificación, los datos brutos deben ser analizados mediante el establecimiento de 3 factores:

- **Línea de base:** es nivel de ruido en los primeros ciclos donde no hay aumento detectable de la fluorescencia debido a los productos de amplificación. La misma se debe establecer de modo que el crecimiento de la gráfica de amplificación comience en un número de ciclo mayor que el más alto número de ciclo de línea de base. El valor de fluorescencia promedio que se detecta dentro de los primeros ciclos se resta del valor de fluorescencia obtenido a partir de productos de amplificación.

- **Fondo o Background:** se refiere a la fluorescencia no específica en la reacción, por ejemplo, debido a la ineficiente extinción del fluoróforo o la presencia de grandes cantidades de ADN cuando se usa SYBR Green. El componente de fondo de la señal se elimina matemáticamente por el algoritmo de software del equipo.
- **Valor umbral o Threshold:** es un valor que se ajusta por encima del fondo y significativamente por debajo de la meseta de un gráfico de amplificación. Debe ser colocado dentro de la región lineal de la curva de amplificación, lo que representa el intervalo de log-lineal detectable de la PCR. Si se utilizan varios objetivos en el experimento en tiempo real, el umbral debe establecerse para cada objetivo.

A continuación el software del equipo calcula el Ciclo umbral (CT), que es el ciclo en el que el gráfico de amplificación atraviesa el umbral, es decir, en la que hay un aumento significativo de la fluorescencia detectada. Este CT también puede ser calculado en forma manual.

La cuantificación puede ser absoluta donde se determina la cantidad de ADN diana expresado como número de copias o la concentración. Para esto tenemos dos opciones, la primera se utiliza generalmente para estimar el nivel de expresión de un gen, en casos donde se requiere un análisis de la expresión génica y corresponde con la implementación de patrones externos. Los más precisos son moléculas de ARN de número de copias conocido o concentración. Dependiendo de la secuencia, la estructura de la diana y la eficiencia de la transcripción reversa, sólo una proporción de los ARN diana en la muestra se transcribirá de forma inversa. El ADNc (copia) generado durante la transcripción inversa a continuación, sirve como molde en la posterior PCR en tiempo real. El uso de estándares de ARN tiene en cuenta la variable de la eficiencia de la transcripción inversa, así como la posible presencia de inhibidores de transcripción inversa, que pueden estar en la muestra de ARN.

La otra opción es la preparación de una curva estándar que se genera usando una serie de diluciones con concentraciones diferentes de un patrón. Se determinan los valores CT de las muestras estándar y se construye una curva de calibración CT vs concentración de patrón. Entonces, los valores CT de las muestras desconocidas se comparan con la curva estándar para determinar la cantidad de diana en la muestra desconocida (Fig. 9).

En cambio la cuantificación relativa determina la relación entre la cantidad de ADN diana y una molécula de referencia endógena (housekeeping), por lo general un gen que no cuya cantidad no varía en las condiciones analizadas. El ADN objetivo y el gen de

referencia se amplifican a partir de la misma muestra, ya sea por separado o en la misma reacción (dúplex PCR en tiempo real). El valor normalizado se determina para cada muestra y se puede utilizar para comparar, por ejemplo, la expresión diferencial de un gen en diferentes tejidos. Cuando se comparan los niveles de expresión génica entre las muestras, el nivel de expresión de la diana se conoce como ser, por ejemplo, 100 veces mayor en las células con tratamiento A que con el tratamiento B. El gen β -actina es el más utilizado como referencia, ya que su expresión se mantiene constante bajo una amplia variedad de condiciones fisiológicas.

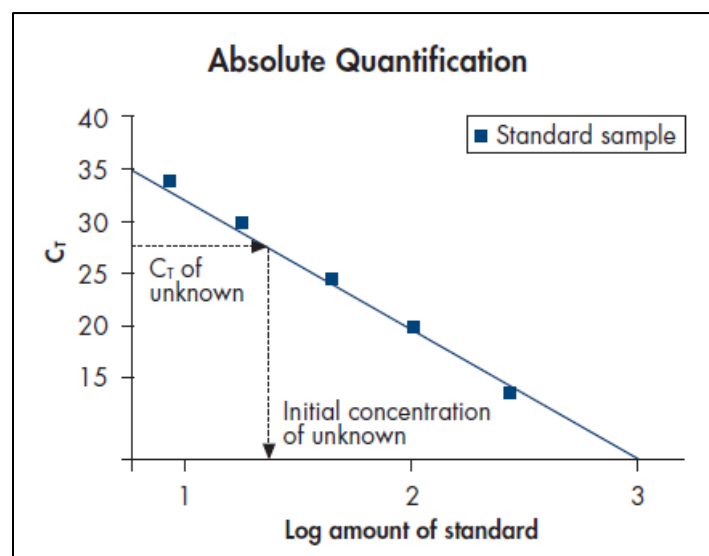


Figura 9: Típica curva estándar para determinar la concentración de la muestra de interés (unknown)

Determinación de la replicación viral en muestras de pacientes

Mediante una reacción de real-time PCR, que amplifica el gen E4 del vector, se analizó la replicación de los virus v1, v4 y de un control positivo (WT con la fibra 5/3), en las muestras de ADN purificado, luego de 5 y 96 o 72 horas post infección[1]. Como mencionamos anteriormente se realizaron 3 o 4 réplicas para cada condición. En este caso particular se utilizó como molde ADN porque nos permitía cuantificar el número de copias genómicas por nanogramo de tejido, ya que cada genoma tiene una única copia del gen E4.

Para realizar la curva de calibración se partió de una muestra de ADN viral de concentración conocida, en 3 μ L hay 10^9 copias de E4. A 5 μ L de esta solución se le agregaron 45 μ L de agua destilada para lograr una concentración de 10^8 copias de E4/3 μ L, a partir de la

cual se realizaron diluciones 1/10 seriadas hasta llegar a una solución de 100 copias de E4/3 μL .

El ADN purificado de las muestras fue diluido, en caso de ser necesario, para llevarlo a concentraciones menores, no más de 100 ng/ μL .

El ADN de muestras y las diluciones patrón se usaron luego como templados en reacciones de real time PCR. Se hicieron 2 réplicas técnicas para cada una de las réplicas de cada tratamiento en las muestras y tres réplicas técnicas para las reacciones de la curva de calibración. Además se incluyó un blanco con agua bidestilada en lugar de ADN molde (3 réplicas).

Los primers utilizados fueron

- Forward: E4Fuab, con la secuencia: 5'- GGAGTGCGCCGAGACAAC -3'
- Reverse: E4Ruab, con la secuencia: 5'- ACTACGTCCGGCGTTCCAT -3'

Debajo se detallan las condiciones de reacción para cada tubo de reacción (ver Tabla VI):

TABLA VI: Detalle de la reacción de <i>real time</i>-PCR.	
Reactivo	Volumen por tubo (μL)
Buffer de reacción 10X	2,5
MgCl ₂ 50 mM	0,75
dNTPs 10 mM de c/u	0,3
BSA (50 mg/ml)	0,25
ROX reference Dye	0,3
Colorante SYBRGreen	0,4
Primer Mix (10 μM de c/u)	1
Taq Polimerasa Platinum (5 U/ μL)	0,2
H ₂ O bidestilada	16,3
DNA molde	3
Total	25

El ciclo de amplificación fue: 5 minutos a 95 °C, 35 ciclos (45 segundos a 94 °C, 30 segundos a 62 °C y 30 segundos a 72 °C), 10 minutos a 72 °C.

Luego el contenido de cada uno de los tubos se pasó a los pocillos de una placa de 96 pocillos. La placa se selló con un film transparente, se centrifugó. Se utilizó el equipo OneStep (Applied Biosystems), conectado a una computadora que nos permite monitorear la

reacción. Al finalizar el programa construye la curva, cuantifica las muestras y nos indica los resultados para cada pocillo y un promedio de las réplicas técnicas. Finalmente normalizamos los resultados que brindó el software expresándolos como copias de E4 por nanogramo de ADN. El análisis estadístico para comparar la tasa de replicación entre cada grupo de tratamiento se realizó mediante un t-test de Student.

Costos de la investigación

Se calcularon los costos de materiales y reactivos por muestra y para el total de la investigación (9 muestras analizadas), contemplamos todas las etapas de la misma: infección de las muestras, purificación del ADN, análisis de la replicación por real-time PCR y la genotipificación (PCR, clonado y secuenciación).

Resultados

Como fue mencionado en los objetivos, este proyecto final tiene dos metas, por un lado analizar la eficacia en muestras de tumores de dos adenovirus de replicación condicional llamados AdF512v1 y AdF512v4, este último correspondiente a una nueva variante que se describirá a continuación. El otro objetivo es determinar la cepa del virus de HPV que se encuentra asociado a cada tumor, para evaluar en un futuro si existe una correlación entre la respuesta al CRAAd de un determinado tumor y la cepa de HPV que se encuentra asociada al tumor.

AdF512v1 es un CRAAd que fue diseñado para hacer blanco tanto en la célula maligna como en el estroma que le permite crecer y metastatizar [1]. Este virus tiene un fragmento del promotor de la proteína SPARC dirigiendo la expresión de una versión mutante de la proteína viral E1A. En trabajos previos se demostró que AdF512v1 resultaba efectivo en una gran parte de las muestras de tumores de carcinoma de ovario analizadas [1]. Con el objetivo de incrementar el número de muestras tumorales en donde el adenovirus pudiese replicarse se cambió el promotor F512, por un nuevo promotor quimera (2KBF512HRE) también construido en el laboratorio, en el cual el promotor original F512 lleva dos motivos de respuesta a condiciones fisiopatológicas del ambiente tumoral como son inflamación e hipoxia (Fig. 10) [56]. Este nuevo vector nunca había sido probado en muestras de pacientes y este es el primer abordaje en el cual se hace.

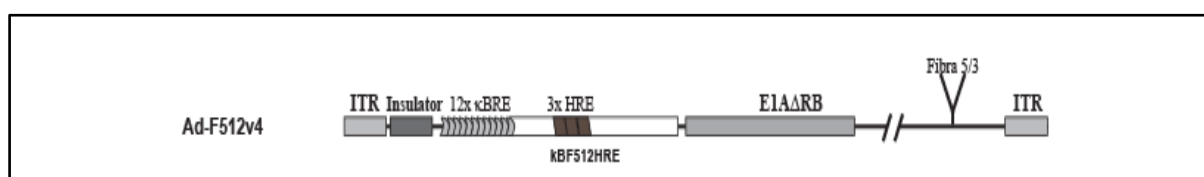


Figura 10: Estructura del virus oncolítico AdF512v4. En el cual se ha añadido un promotor quimera con los elementos de respuesta 12xBRE (inflamación) y 6xHRE (hipoxia). Además de una delección del gen E1A que le impide a la proteína unir a Rb.

Para simplificar las leyendas los virus se llamarán v1 y v4.

Muestras analizadas

Como se describió en materiales y métodos, las muestras de los tumores fueron recibidas en el laboratorio, infectadas, y conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Los virus utilizados fueron, v1, v4 y como control positivo el virus Adwt (WT de ahora en más). Es importante mencionar que los tamaños de las muestras fueron muy variables y no siempre pudieron ser infectadas con la totalidad de los virus. En este trabajo incluimos el análisis de 9 muestras de tumores, uno correspondiente a tumor de endometrio, dos a tumores de ovario y 6 a cuello de útero o cérvix. Las muestras analizadas y su origen fueron listadas en la Tabla VII.

TABLA VII: Detalle de muestras

Muestra	Tumor
A	Cuello de útero
B	Endometrio
C	Cuello de útero
D	Cuello de útero
E	Cuello de útero
F	Tumor de ovario + anexo
G	Cuello de útero
H	Cuello de útero
I	Tumor de ovario

Análisis de la replicación viral en muestras de pacientes

En primer lugar se realizaron las preparaciones de ADN de las muestras. Para ello se utilizó un kit como se describió en la sección materiales y métodos. Posteriormente, se procedió a cuantificar las muestras usando el equipo NanoDrop Spectrophotometer. La cantidad obtenida de ADN fue muy dependiente de cada muestra. En promedio obtuvimos $250\text{ ng}/\mu\text{L}$.

Luego iniciamos el análisis de la capacidad de replicar *ex vivo* de los CRAAd en las muestras obtenidas de pacientes. Para ello se cuantificó el número de copias de genomas virales. En primer lugar se construyó la curva estándar. Para ello se procedió a diluir una preparación de ADN de un stock viral de tal forma que en $3\text{ }\mu\text{L}$ hubieran 10^9 copias genómicas. Ello se pudo hacer, gracias a que sabíamos la longitud del genoma viral y la

concentración de ADN. Se estimó así mismo el peso de un nucleótido promedio y usamos el algoritmo de la página web <<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>>.

Se realizó entonces una primera amplificación en donde solo se corrió la curva. Posteriormente iniciamos el análisis de las muestras. Los resultados para cada muestra de cada ensayo se normalizaron expresándolos como número de copias de E4 por nanogramo de ADN (Anexo A) y graficamos la media y SEM (Error Estándar). Mostramos a modo de ejemplo la curva estándar de una de estas Real Time y en donde amplificaron las muestras de pacientes (Fig. 11).

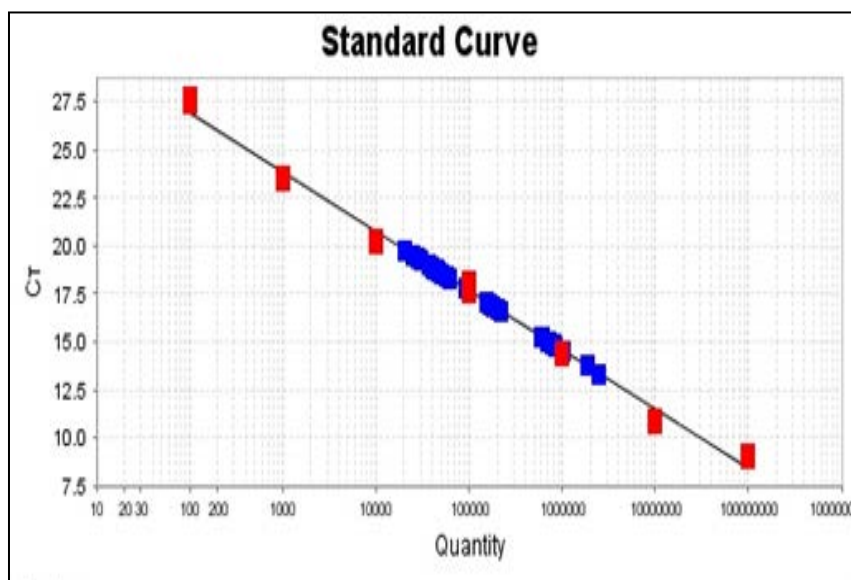


Figura 11: Curva estándar, donde los puntos rojos son las diluciones de concentración conocida y los puntos azules son las muestras interpoladas.

Primero analizaremos las muestras de cáncer de útero (Fig. 12 y 13). Encontramos que en tres muestras D, E, y G (Fig. 12), tanto nuestro control positivo viral como los virus v1 y v4 no lograron amplificarse. En principio el virus WT debería poder replicar en todas las muestras, excepto que la entrada del virus estuviera inhibida. Hay que recordar que este virus, al igual que v1 y v4 tienen una fibra quimera 5/3, que en principio por los ensayos sobre las líneas celulares (datos del laboratorio) infecta más eficientemente que la fibra 5 original. Otra posible explicación es que estas muestras llegaron en un estado de descomposición. De cualquier modo, esas muestras no fueron tomadas en consideración para

el análisis final. Con respecto a las muestras A, C y H (Fig. 13) si observamos que el virus WT logra amplificar y en dos de ellas con diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a las versiones v1 y v4, vemos en primer lugar que hay una tendencia a amplificar pero no es estadísticamente significativa y los valores son claramente menores a los obtenidos para el virus WT. En estos ensayos si bien el promedio de las réplicas es mayor a las 96 que a las 5 horas, tenemos barras de error estándar muy grandes, esto se deba probablemente a que en algunas secciones del tumor (ver Materiales y Métodos – Obtención y Procesamiento de las muestras) el virus replicó mucho y en otras no replicó. Una posibilidad es que las muestras iniciales contenían sectores con tejido normal y que al seccionarlas algunos trozos quedaron con tejidos no malignos. Como los virus v1 y v4 no son capaces de replicar en células sanas se produce tal variación entre muestras bajo el mismo tratamiento. Otra posibilidad es la distribución no homogénea del estroma. Con respecto a esto, se están estudiando los cortes histológicos de estas muestras para estudiar una posible correlación entre el porcentaje de estroma y la eficacia viral.

Hay que analizar la muestra B en forma separada ya que anatómicamente corresponde a otra región del útero en la cual los tumores son totalmente diferentes desde su inicio. Lamentablemente la muestra B fue muy escasa y dado que solo alcanzaba para un único virus decidimos infectarla con v4. Como se muestra en la figura 13 podemos afirmar que el virus v4 ha replicado eficazmente. Dado que es un único tumor pero con un resultado alentador el laboratorio comenzará a analizar más muestras de tumores de endometrio.

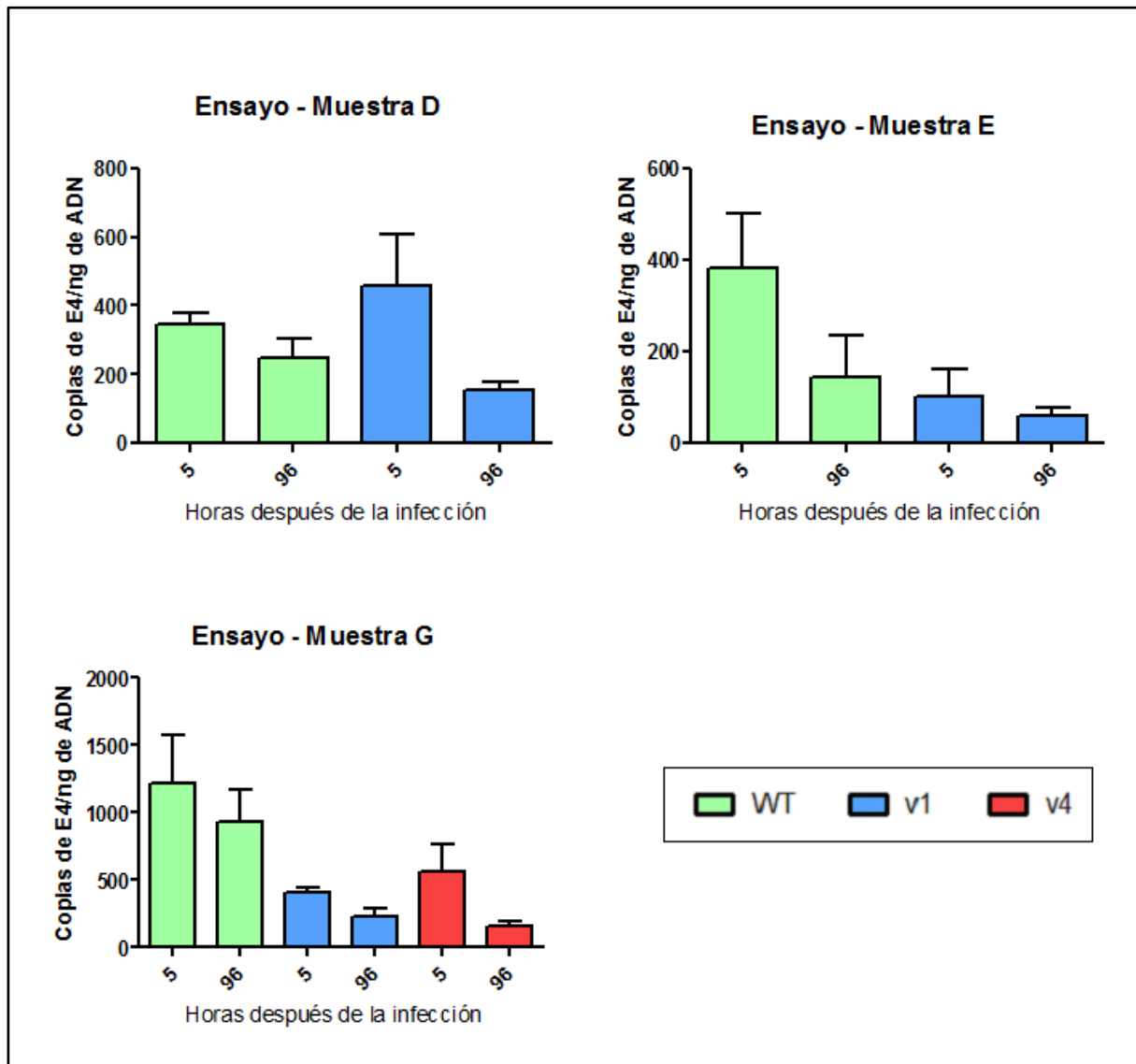


Figura 12: Replicación viral en muestras de pacientes con cáncer de cuello de útero. Los niveles de E4 fueron medidos *por real-time* PCR, se compararon los valores a las 5 y 96 horas post infección. Las barras de error representan la media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

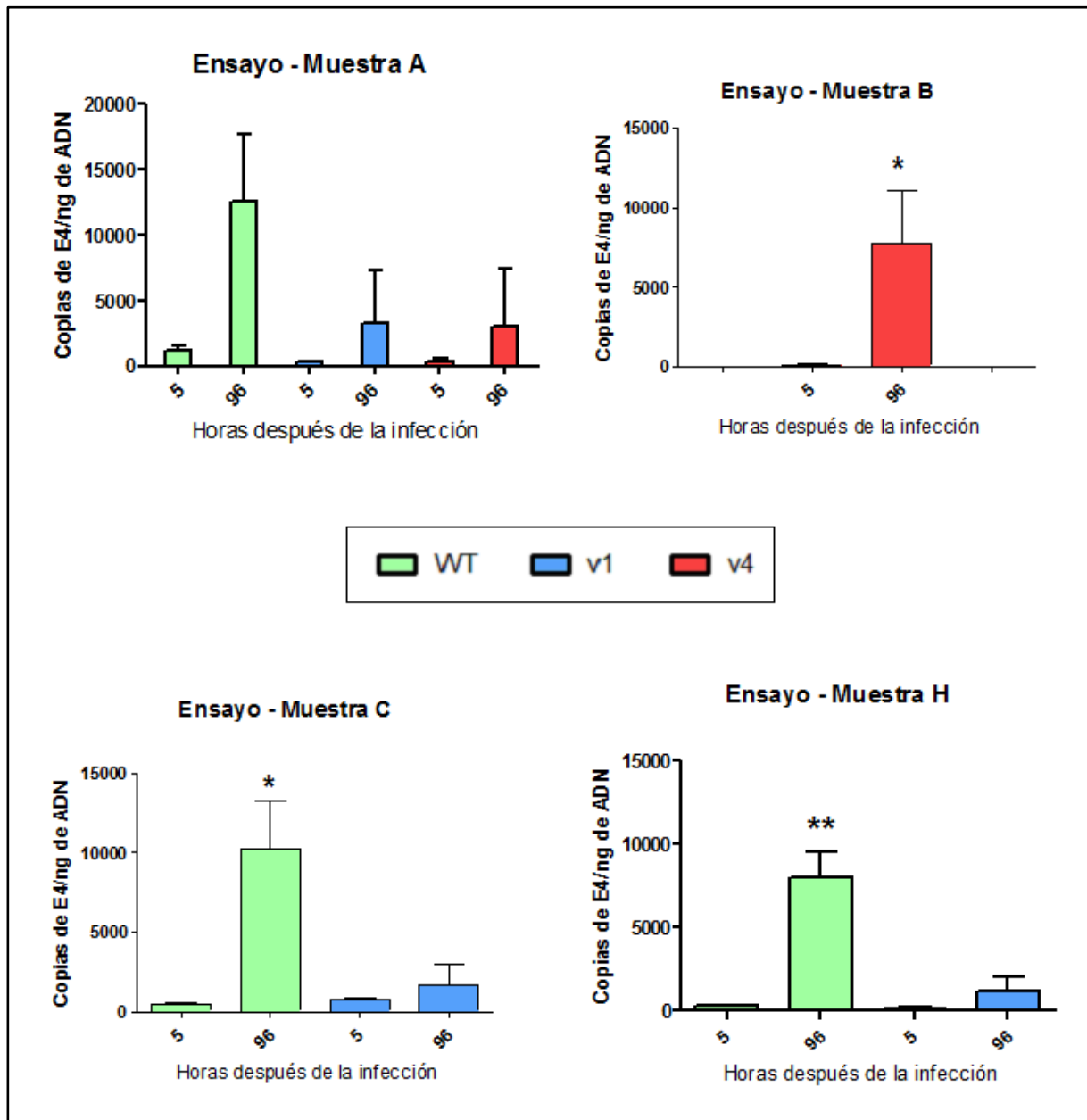


Figura 13: Replicación viral en muestras de pacientes con tumores de útero.

Los niveles de E4 fueron medidos *por real-time* PCR, se compararon los valores a las 5 y 96 horas post infección. Las barras de error representan la media \pm SEM.* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Analizaremos a continuación las muestras de tumores de ovario (F e I). A su vez se recibió tejido tumoral de la muestra F y tejido del vaciamiento de ganglios que llamamos anexo, también recibimos una muestra del otro ovario que no había sido afectado por un tumor, pero que no se alcanzó a analizar. En las muestras de cáncer de ovario (Fig. 14)

también observamos gran variabilidad entre las réplicas biológicas, pero con una tendencia a la replicación. Sin, embargo, podemos asegurar que hubo replicación del virus v4 y del control en la muestra tumoral de ovario de F (ovario). Queremos aclarar, que la muestra I fue infectada durante 72 horas y no durante 96 horas dado que se siguió un protocolo anterior que era para ovario exclusivamente y posteriormente para unificar todo este trabajo se continuó con la toma final de muestra a las 96 horas. La muestra I, si bien no es estadísticamente significativa muestra la tendencia de v4 a la amplificación.

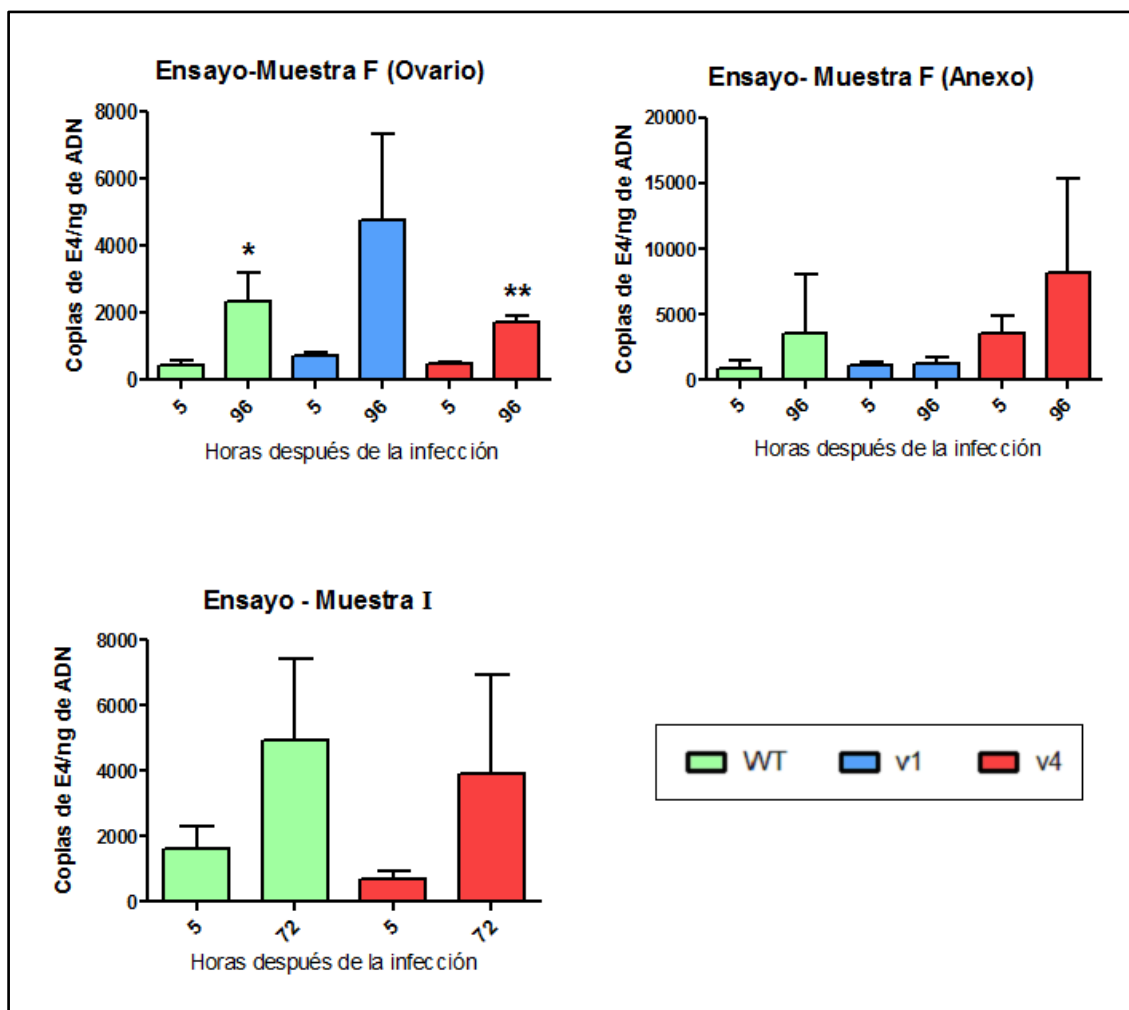


Figura 14: Replicación viral en muestras de pacientes con cáncer de ovario.

Los niveles de E4 fueron medidos *por real-time* PCR, se compararon los valores a las 5 y 96 horas post infección. Las barras de error representan la media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Análisis de la presencia de HPV en muestras de pacientes

Puesta a punto de la reacción de PCR

Se ha reportado el genotipo de HPV que está presente en las líneas celulares utilizadas: CaSki (HPV-16, aproximadamente 600 copias por célula y también contiene secuencias relacionadas al HPV-18), HeLa (HPV-18) y SiHa (HPV-16, 1 a 2 copias por célula)². También sabemos que los productos de PCR generados con los primers MY09/11 tienen un tamaño de 450 pb [4].

En primer lugar realizamos una puesta a punto de una PCR con los *primers* MY09/11 y determinamos la condición de reacción adecuada (Fig. 15). El marcador de longitud y peso molecular utilizado fue el Movil-19/MspI, la banda superior del mismo corresponde a dos fragmentos de 501 y 489 pares de bases.

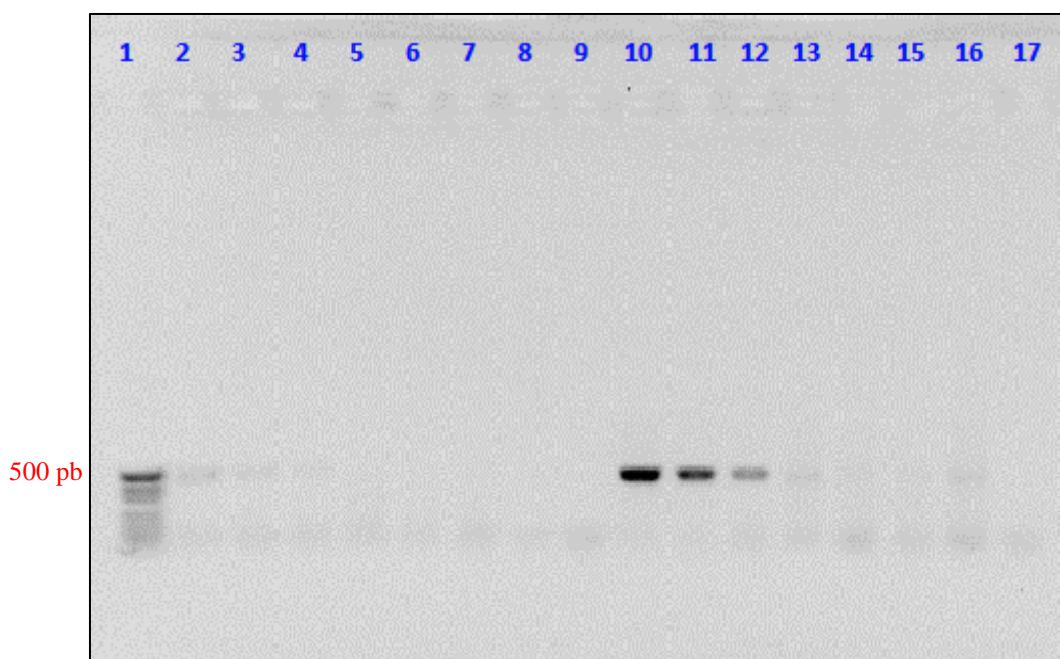


Figura 15: Corrida electroforética puesta a punto de la PCR
Orden de siembra: 1- Movil-19/MspI. **Condición A:** 2- CaSki, 3- HeLa, 4- SiHa, 5 al 8- Muestra de paciente, 9- Blanco. **Condición B:** 10- CaSki, 11- HeLa, 12- SiHa, 13 al 16- Muestra de paciente, 17- Blanco

² ATCC [en línea] [consulta 29 nov. 2013] <<http://www.atcc.org/>>

La condición B logró una mayor amplificación que la condición A en las calles correspondientes a las líneas celulares, esto puede notarse por una mayor intensidad de las bandas correspondientes a la condición B. Además solamente en esta condición se logró amplificar el ADN de la muestra de paciente. Para la muestra del paciente usamos 4 preparaciones diferentes de ADN. Finalmente elegimos B como la condición de reacción adecuada para los próximos pasos de la investigación.

La razón por la cual obtuvimos bandas de mayor intensidad en las amplificaciones de líneas celulares que en las amplificaciones de la muestra de paciente (condición B) fue porque la concentración de ADN molde era mayor en el purificado de líneas celulares y además las células CaSki tienen muchas copias del virus por célula.

PCR para genotipificar HPV

Posteriormente amplificamos con la condición B todas las muestras (Fig. 16).

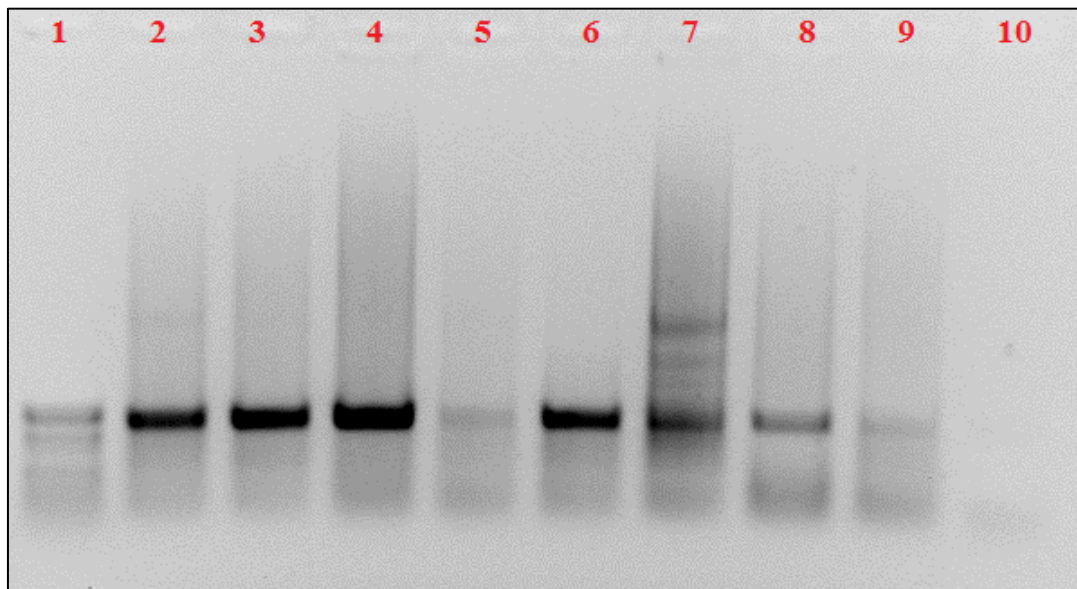


Figura 16: Corrida electroforética producto de PCR de las muestras (Gel 1).
Orden de siembra: 1- Movil-19/MspI. 2 al 9 - Muestras de pacientes (2- H, 3- C, 4- D, 5- E, 6- A, 7- B, 8- G, 9- F) y 10- CaSki (otra preparación de ADN).

Las reacciones de PCR con los controles positivos (ADN de líneas celulares, incluimos la línea celular de ovario SK-OV-3) y el blanco fueron corridas en otro gel de agarosa (Fig. 17). Llamativamente la muestra de la línea celular de ovario SK-OV-3 amplificó poco, visualizándose una banda muy tenue, al igual que la muestra F también proveniente de ovario.

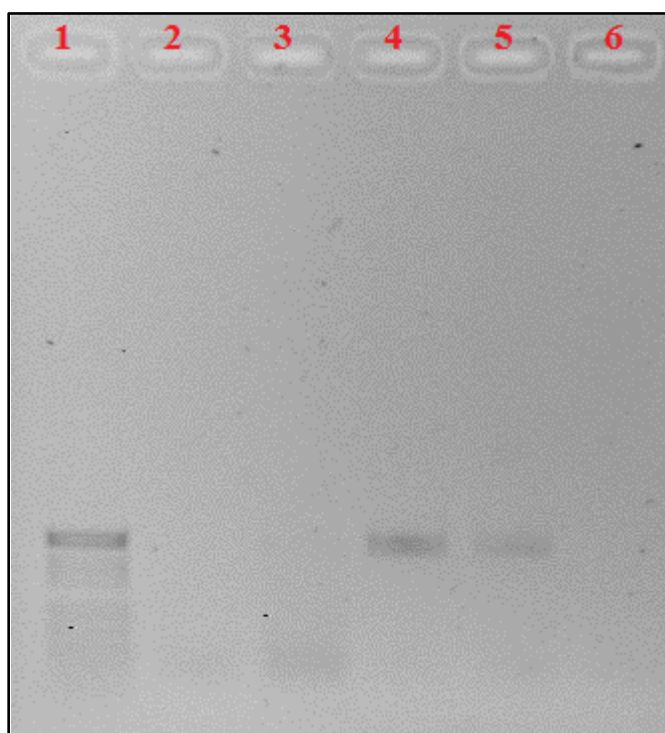


Figura 17: Corrida electroforética producto de PCR de las muestras (Gel 2)
Orden de siembra: 1 - Movil-19/MspI, 2-Blanco, 3- SK-OV-3, 4- CaSki, 5- HeLa y 6- SiHa.

En un principio se había planeado hacer RFLP (del inglés, *Restriction fragment length polymorphism*) de estos productos de amplificación, sin embargo dado los tiempos que se requieren para la compra de nuevas enzimas, se decidió clonar este fragmento en un vector T (pCR[®]4-TOPO[®]) y luego secuenciarlo, a sabiendas que este protocolo disminuiría el número de muestras a analizar. Se tomaron inicialmente dos muestras, una de ellas correspondiente a una línea celular CaSki, y la otra la muestra F, proveniente de un tumor de ovario, en la cual contrariamente a lo pensado, hubo amplificación en esta muestra indicando una infección con HPV en la paciente, por lo cual decidimos genotipificarla.

Probamos la amplificación, en la condición B pero en un volumen final de 100 μ L, utilizando ADN molde de la muestra F y de CaSki (diluido 1/10) como control positivo. Obtuvimos amplificación muy débil de la muestra, por lo cual decidimos cortar esa banda con un bisturí, purificarla y re-amplificarla. No tenemos fotografía de esta corrida electroforética por que quisimos evitar la formación de “nicks” (rotura del enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos adyacentes en una hebra del ADN).

Realizamos una segunda reacción usando 8 μ L de las purificaciones de la muestra y del control positivo como molde en 100 μ L totales. Logramos amplificación del control pero no hubo amplificación de la muestra (Fig. 18), por lo cual supusimos que la reacción no estaba funcionando en la muestra por una baja concentración de ADN en la muestra F.

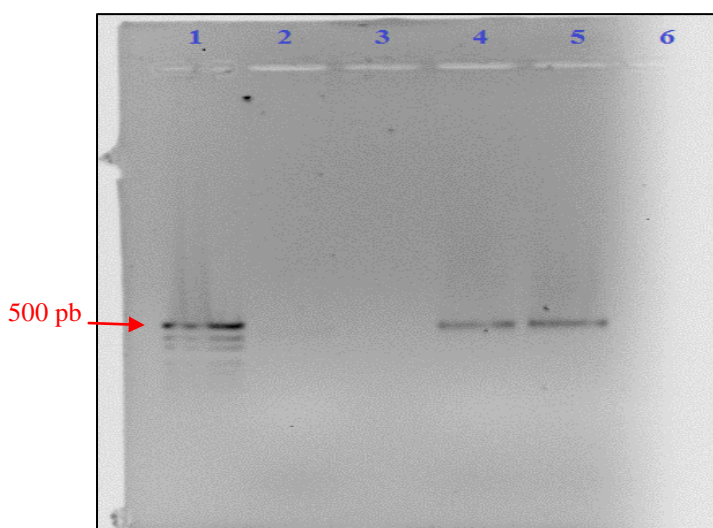


Figura 18: Corrida electroforética de la re-amplificación 1

Orden de siembra: 1 - Movil-19/MspI. 2 y 3- Muestra F (50 μ L en cada pocillo), 4 y 5- CaSki (50 μ L en cada pocillo), 6- Blanco (50 μ L).

Decidimos realizar una segunda reacción de re-amplificación pero esta vez utilizando 20 μ L de las bandas purificadas en 100 μ L totales y logramos amplificación del ADN en la muestra F y en el control. Estas bandas fueron cortadas y purificadas. No sacamos una fotografía del gel para evitar la formación de “nicks” en el ADN. Sin embargo el sobrante de estas re-amplificaciones luego del clonado fue corrido en un gel de agarosa para mostrar que se logró amplificar la muestra F (Fig. 19).

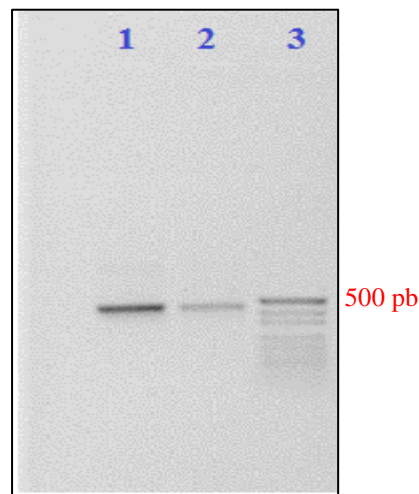


Figura 19: Corrida electroforética de los purificados de la re-amplificación 2
Orden de siembra: 1- Purificado de re-amplificación Ca Ski, 2- Purificado de re-amplificación muestra F, 3- Movil-19/MspI.

Clonado de los productos de PCR

Los productos de PCR purificados de gel fueron utilizados para clonarlos en un vector pCR[®]4-TOPO[®]. Al siguiente día seleccionamos colonias capaces de crecer en las placas de Petri con medio LB en presencia de ampicilina, luego de la transformación (Fig. 20). Es decir aquellas que incorporaron el vector con el producto de PCR en su interior. Esta colonias son aquellas capaces de crecer, en el cultivo realizado, gracias a la resistencia ampicilina presente en el vector y por la interrupción del inserto en la región LacZ α -ccdB impidiendo la expresión de ccdB que es un gen letal para la bacteria.

Efectivamente comprobamos que las colonias seleccionadas contenían el producto de PCR mediante una digestión con la enzima *EcoRI* (Fig. 21). Al correr en el gel obtuvimos lo siguiente: para las digestiones del “vector – producto PCR muestra F” dos bandas, una de aproximadamente 4000 pb consistente con el tamaño del vector (3954 pb) y otra banda de 450 pb que es el inserto. En el caso de las digestiones del “vector – producto PCR CaSki” obtuvimos la banda correspondiente al vector, pero una banda menor a 450 pb. Esto se debe a que el HPV 16, presente en la línea celular CaSki, contiene en la región amplificada un sitio de corte de la enzima *EcoRI*. El resultado de la digestión es una banda

correspondiente de aproximadamente 240 pb. Como marcadores de peso molecular usamos el Movil-19/MspI y el marcador 1Kb producido por el Instituto.

Seleccionamos dos clones teniendo en cuenta la cantidad de vector recombinante que incorporaron. Los seleccionados fueron el clon 3 de CaSki y el clon 1 que tiene la secuencia de la muestra F.

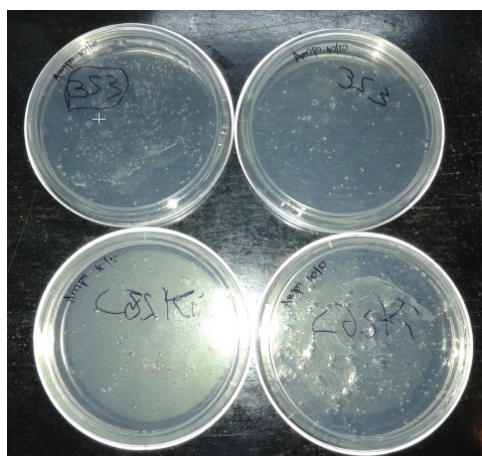


Figura 20: Placas con bacterias recombinantes

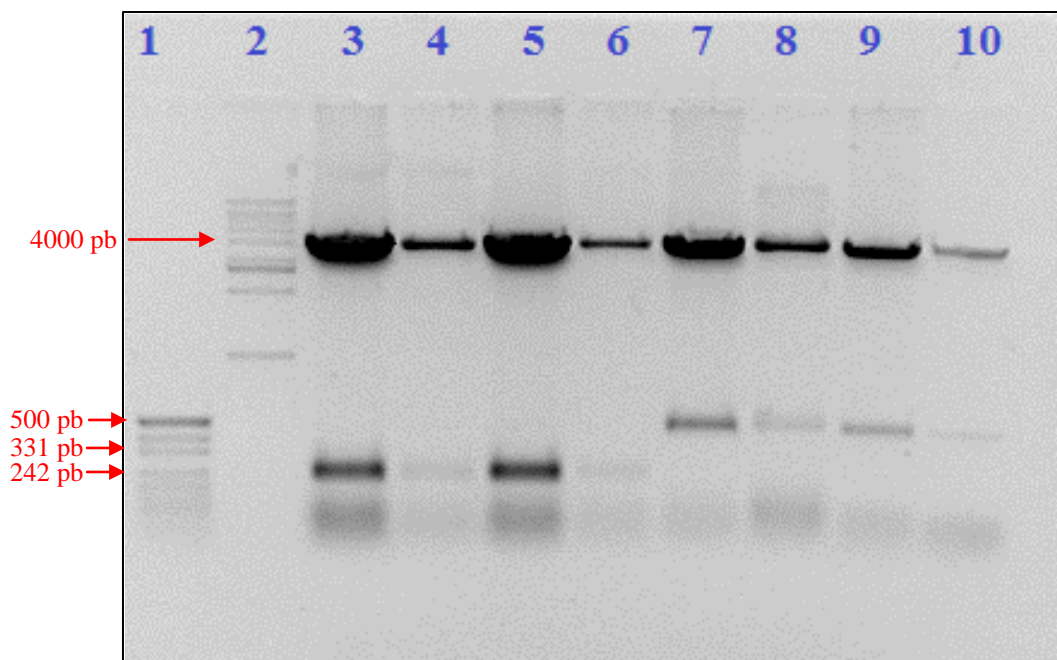


Figura 21: Corrida electroforética de las digestiones con EcoRI

Orden de siembra: 1- Movil-19/MspI, 2- Marcador 1Kb, 3- Clon 1 CaSki, 4- Clon 2 CaSki, 5- Clon 3 CaSki Clon, 6- Clon 4 CaSki, 7- Clon 1 muestra F, 8- Clon 2 muestra F, 9- Clon 3 muestra F, 10- Clon 4 muestra F.

Secuenciación

Análisis de las secuencias de amplificación MY09/11

A continuación se muestran las secuencias obtenidas luego de clonar los productos de PCR, así como también el análisis que realizamos.

> CaSki

```
TTTGGCGTFCGCGTATTTCGCCCTTGCACAGGGACATAATAATGGCATTGTTGGGGTAACC  
AACTATTTGTTACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCA  
TATCTACTTCAGAACTACATATAAAAACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGG  
AGGAATATGATTACAGTTTATTTTCAACTGTGCAAAATAACTTTAACTGCAGACGTTA  
TGACATACATACATTCTATGAATCCACTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAAC  
CCCCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTT  
GTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTGGG  
AAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTCTGCAGACCTAGATCAGTATCCCTTGGACGAAGGG  
CGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATCTGAGCTTGGCG  
TAATCATGGTCAATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAATCCACACAAC  
ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA  
TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCAT  
TAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTCCGCTTTC  
CTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTCGGCTGCGCGAGCGCTATCAGCTCACTCA  
AAGGCGGTATTACGGTTATCACAGAATCAGGATACGCAGGAAGAACATGTGGAGCCAAAA  
GTCCAGCCAAAAAATC
```

> Muestra F

```
GCGACGAAAATCGCCCTTGTTCATGGTAATAATAATGGAGGTTGATGGAAGAAAGAAAAAC  
GGGGAGGGGGCCCTTGATGGGGATATTAGAAAAGGTAGGCTTAGAGAAAAAAGAATCA  
GTTGTTTATACTTTATTTGGTATGCCCGGGTTGCAGGAATCATAGTTACCTGTGCATAGG  
CATTCAAAAGACTCAAGAGGTGCAATTTTACCCTCCCTCCCCATATCTGATTTTCGATA  
TAGGGCATTGTTCCCATCTCTCCCCAGAGACAGAGAAGTCTCACCCATTGAGTGATCT  
GGGTAAAGGTTGGCAAATCTCTTATCTTCAGACTTAGTGGAGGGTCAAGGTGATAGCA  
CTTGATCAGTCACAGAGGCTGTCATTGTCGGGACCCTAATGGAGGTACCCTTAAGGCC  
CCTGCCATGGTCCAATATCAAGCGATCAGTTTCCCTTGGACGAAGGGCGAATTCGTTTA  
AACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGAGGTTAATCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCA  
TAGCTGTTTCCGTGTGAAATGTTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGA  
AGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTG  
CGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGC  
CAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTCCCGCTTTCCTCGCTCACTG  
ACTCGCTGCGCTCGGGTCTGTCGGCTGCGGCGAGCGGGTATTTCAGCTCACTCAAGGCGGT  
AATACCGGTTATTCACAGAATCAGGGGAATACGCCAGGAAAGGAACATGGTGAGCAAAA  
AGGGGCCAGGCCAAAAAGGGGCCACAGATG
```


con más errores. Nosotros vemos acá que deberíamos utilizar desde la base 24 de nuestra secuencia hasta la base 462 (hemos resaltado en color verde esta parte de la secuencia en la secuencia que colocamos más arriba). De todas formas estamos enviando a secuenciar con el otro primer individual T3 (se muestra la posición de los *primers* en la figura 22).

Alineamiento secuencia de CaSki vs Vector pCR4-TOPO-L1 HPV

pCR4-TOPO-L1 HPV (4851)	TATGTTACCTCTGATGCCCAAATA	TTCAATAAAC	CTTATTGGTTACAA	C	4851	4900
SECUENCIA DE CASKI L1 (1)	-----	TTTGCGGTCG	CGTATTCC	CC	4901	4950
pCR4-TOPO-L1 HPV (4901)	GA	GCACAGGGCCA	CAATAATGGCATT	TGTTGGGGTAACCAACTATTTGTT	4901	4950
SECUENCIA DE CASKI L1 (22)	TT	GCACAGGGCA	TAATAATGGCATT	TGTTGGGGTAACCAACTATTTGTT	4951	5000
pCR4-TOPO-L1 HPV (4951)	ACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCAT				4951	5000
SECUENCIA DE CASKI L1 (72)	ACTGTTGTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCAT				5001	5050
pCR4-TOPO-L1 HPV (5001)	ATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTAC				5001	5050
SECUENCIA DE CASKI L1 (122)	ATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTAC				5051	5100
pCR4-TOPO-L1 HPV (5051)	GACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTGCAAAAATA				5051	5100
SECUENCIA DE CASKI L1 (172)	GACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAACTGTGCAAAAATA				5101	5150
pCR4-TOPO-L1 HPV (5101)	ACCTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCCTACTAT				5101	5150
SECUENCIA DE CASKI L1 (222)	ACTTAACTGCAGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCCTACTAT				5151	5200
pCR4-TOPO-L1 HPV (5151)	TTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACC	TCCCCCAGGAGGCACACTAG			5151	5200
SECUENCIA DE CASKI L1 (272)	TTTGGAGGACTGGAATTTTGGTCTACAACC	CCCCCAGGAGGCACACTAG			5201	5250
pCR4-TOPO-L1 HPV (5201)	AAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACAT				5201	5250
SECUENCIA DE CASKI L1 (322)	AAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGCAATTGCTTGTCAAAAACAT				5251	5300
pCR4-TOPO-L1 HPV (5251)	ACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTGGGA				5251	5300
SECUENCIA DE CASKI L1 (372)	ACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACACTTTTGGGA				5301	5350
pCR4-TOPO-L1 HPV (5301)	AGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCCTTAG				5301	5350
SECUENCIA DE CASKI L1 (422)	AGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCCTTAG				5351	5400
pCR4-TOPO-L1 HPV (5351)	GACGCA-----AATT-TTACTAC	AAGCAGGAT	TGAAGGC	CAAA	CCAAA	5351
SECUENCIA DE CASKI L1 (472)	GACGCAAGGCGCAATT	CGTTTAAAC	CTGCAGGAC	TAGTCC	CTTTAGTGA	5401
pCR4-TOPO-L1 HPV (5395)	TTTACAT-----TAGGAAA	CGAA	AACTAC	ACC	CACCA	CCTCATCT
SECUENCIA DE CASKI L1 (522)	GTTAAT	CTGAGC	TGGCGT	AATCA	TGCTC	ATAGCTGTTT
pCR4-TOPO-L1 HPV (5439)	CTTAC	ACTGCT	---AA	ACGCA	AAAAC	GTA---AGCT
SECUENCIA DE CASKI L1 (572)	ATGTTAT	CGCT	CACAA	TTC	CACA	CAACATA

En segundo lugar se alineó la secuencia del clonado de la muestra F en el vector TOPO con el mismo vector TOPO virtual construido en el laboratorio con el programa vector NTI con la secuencia de L1 de HPV 16, de tal manera de identificar que parte de la secuencia pertenece al vector y que parte a L1. En el vector virtual la secuencia de L1 de HPV 16 se encuentra entre los pares de bases 3958-5475, con lo cual nuestra secuencia que se secuenció con T7 se ha clonado en sentido 5'-3', y la primera parte se alinea con el vector, pero cuando comienza la secuencia de L1, no. Es por ello que decidimos ingresar esa parte de

la secuencia en una búsqueda BLAST³ y vimos que era homologa a otras secuencias HPV aisladas de pacientes, pero no estaban genotipificadas, descartando la posibilidad de una amplificación inespecífica en la PCR (Fig. 23).

Alineamiento secuencia de la muestra F(353) vs Vector pCR4-TOPO-L1 HPV

		1		50
		3451		3500
pCR4-TOPO-L1 HPV (3451)		GATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC-GCGGC		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (1)		-----	CATCTGTGGC	3550
		3501		
pCR4-TOPO-L1 HPV (3500)		CTTTTACGGTTCTGGGTTTTGCTGGCTTTTGCTCAC-ATGTTT-CT		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (11)		CCTTTTGG--CCTGGCC-----CTTTTGCTCACATGTTTCTT		3600
		3551		
pCR4-TOPO-L1 HPV (3548)		TCCTG-CGTATCCCTGATTCTGTGGA-TAACCG-TATTACCGCTTTG		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (51)		TCCTGGCGTATTCCTGATTCTGTGGAATAACCGGTATTACCGCCTT-G		3650
		3601		
pCR4-TOPO-L1 HPV (3595)		AGTGAGCTGA-TACC-GCTCGCCGAGCCGAACGACC-GAGCGCAGCGAG		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (100)		AGTGAGCTGAATACCCTCGCCGAGCCGAACGACCAGAGCGCAGCGAG		3700
		3651		
pCR4-TOPO-L1 HPV (3642)		TCAGTGAGCGAGGAA-GCGG-AAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTC		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (150)		TCAGTGAGCGAGGAAAGCGGAAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTC		3750
		3701		
pCR4-TOPO-L1 HPV (3690)		CCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGA		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (200)		CCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGA		3800
		3751		
pCR4-TOPO-L1 HPV (3740)		CTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (250)		CTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC		3850
		3801		
pCR4-TOPO-L1 HPV (3790)		ATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (300)		ATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT		3900
		3851		
pCR4-TOPO-L1 HPV (3840)		GGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGA		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (350)		GGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGA		3950
		3901		
pCR4-TOPO-L1 HPV (3890)		TTACGCCAAGCTCAGAATTAACCCCTCACTAAAGGGACTAGTCCCTGCAGGT		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (400)		TTACGCCAAGCTCAGAATTAACCCCTCACTAAAGGGACTAGTCCCTGCAGGT		4000
		3951		
pCR4-TOPO-L1 HPV (3940)		TTAAACGAATTCGCCCTTATGCTCTTTTGGCTGCTTAGTAGCCACTGT		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (450)		TTAAACGAATTCGCCCTT-----CG---TCCAAGGG--GAAACTGA		4050
		4001		
pCR4-TOPO-L1 HPV (3990)		CTACTTGCTCCCTGTCCTCAATATTAATCATGAGGGACATCCAGACTTGTCA		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (486)		TCGCTTGA-TATFGACCAATGGCAGGGGCGCTTAAGGGTACCCTCCATTAG		4100
		4051		
pCR4-TOPO-L1 HPV (4040)		TTGACGCACAAACATATATTAATCATGAGGGACATCCAGACTTGTCA		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (535)		GGTCCCG-ACAAAGACAGCCCTGTGACTGATACA-----AGTGTATCA		4150
		4101		
pCR4-TOPO-L1 HPV (4090)		GTGGACATCCCTATTTTCTATATAAAACCTAACATAACAATAATTT		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (579)		CCCTGACCCCTCACT-----AAGTCTGAGATAAAGAGATTGT		4200
		4151		
pCR4-TOPO-L1 HPV (4140)		AGTTCCCTAAAGTATCAGGATTAACATACAGGGTATTTAGAATACATTTAC		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (618)		CCAACTT---TACCAGATCACTCAATAGGGTG-----AGACTTCT		4250
		4201		
pCR4-TOPO-L1 HPV (4190)		CTGACCCCAATAAGTTTGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCAGAT		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (657)		CTGTCTTGGGGAGAG-GATGGGACAAATGCCCTATAATCGAATCAGGAT		4300
		4251		
pCR4-TOPO-L1 HPV (4240)		ACACAGCGGCTGTTTGGCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGCGTGGTCA		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (706)		AAT--GGGAGGAGGTTAAATTCACCTCTTGA----GCTTTTGAAT		4350
		4301		
pCR4-TOPO-L1 HPV (4290)		GCCATTAGGTGTGGCAATAGTGGCCATCCCTTATTAATAAATAATGGATG		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (750)		GCCAT-----GCAAGGTAACTATGATTCTTGCAGCCCGGCTA		4400
		4351		
pCR4-TOPO-L1 HPV (4340)		ACAC---AGAAATGCTAGTGTATATGCAGCAAAATGAGGTGGATTAAT		
SECUENCIA DE MUESTRA 353 rc (792)		CAATAAAGTATAACCACTGATTTCTTTTCTTCTAGCCCTACCTTTT		

³ BLAST [en línea] [consulta 29 nov. 2013 <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>

Finalmente, tomamos de Pubmed⁴ las secuencias de L1 de varios tipos de HPV (Anexo B) para ver si podíamos identificar nuestras secuencias y realizamos un alineamiento múltiple con el programa ClustalW⁵. Lo primero que vimos es que en este alineamiento la secuencia de CaSki es homóloga a HPV 16 y en segundo lugar vemos que la secuencia de la muestra F no se alinea bien con estos tipos de HPV con lo cual necesitamos la secuencia completa, así como también la inclusión de otros genotipos de HPV.

```

59          -----ATGGCTCTGTGGCGTCTAGTGACAACAAGGTGTATCTACCTCCACCTTCGGT  53
68          -----ATGGCATTGTGGCGCTCTAGCGACAACATGGTGTATTTGCCTCCCCCTCAGT  53
18          TTGTCAGATGGCTTTGTGGCGGCTAGTGACAATACCGTATATCTTCCACCTCCTTTTGT  236
45          TTGTCAGATGGCTTTGTGGCGGCTAGTGACAGTACGGTATATCTTCCACCACCTTCTGT  1560
56          TTTGCAGATGGCGACGTGGCGGCTAGTGAATAAGGTGTATCTACCTCCAACACCTGT  245
F          -----ATGGCA-----GGGGCCT-----TAAGGG-----TACCTCCA-----  63
51          -----ATGGCATTGTGGCGCTAATGACAGCAAGGTGTATTTGCCACCTGCACCTGT  53
69          -----ATGGCCTTGGCGGCTACTAGTGACAGCAAGGTATATCTGCCTCCTACCCCTGT  53
16          -----ATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACTGTCTACTTGCCTCCTGTCCCAGT  53
CaSki -----
35          -----ATGTCTCTGTGGCGTCTAACGAAGCCACTGTCTACCTGCCTCCAGTGTTCAGT  53
31          -----ATGTCTCTGTGGCGGCTAGCGAGGCTACTGTCTACTTACCACCTGTCCCAGT  53
33          -----ATGTCCGTGTGGCGGCTAGTGAGGCCACAGTGTACCTGCCTCCTGTACCTGT  53
58          TTTGCAGATGTCCGTGTGGCGGCTAGTGAGGCCACTGTGTACTGCCTCCTGTGCCTGT  131
52          TTTACAGATGTCCGTGTGGCGGCTAGTGAGGCCACTGTGTACTGCCTCCTGTACCTGT  131

59          AGCTAAGGTTGTCAGCACTGATGATTATGTCACCCGTACCAGTATTTTCTACCACGCAGG  113
68          GGCGAAGGTTGTCAATACAGATGATTACGTAACACGCACTGGCATTATTACTATGCTGG  113
18          GGCAAGAGTTGTAAATACCGATGATTATGTGACTCGCACAAAGCATATTTTATCATGCTGG  296
45          GGCCAGAGTTGTCAGCACTGATGATTATGTGTCTCGCACAAAGCATATTTTATCATGCAGG  1620
56          TTCAAAGGTTGTGGCAACGGATTCCATGTGTAACACGCACTAGTATATTTTATCATGCAGG  305
F          TT--AGGGTCCCGACAATGA-----  81
51          GTCTCGAATTGTGAATACAGAAGAATATATCACACGCACCGGCATATATTACTATGCAGG  113
69          GTCCCGGTTGTGAG-ACGGATGAATATGT-ACACGCACCGG-ATATATTACTATGCAGG  110
16          ATCTAAGGTTGTAAGCACGGATGAATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCAGG  113
CaSki -----
35          GTCTAAGGTTGTTAGCACTGATGAATATGTAACACGCACAAACATCTACTATCATGCAGG  113
31          GTCTAAAGTTGTAAGCACGGATGAATATGTAACACGAACCAACATATATTATCACGCAGG  113
33          ATCTAAAGTTGTGAGCACTGATGAATATGTGTCTCGCACAAAGCATTTTATTATGCTGG  113
58          GTCTAAGGTTGTAAGCACTGATGAATATGTGTACGCACAAAGCATTTTATTATGCTGG  191
52          CTCTAAGGTTGTAAGCACTGATGAGTATGTGTCTCGCACAAAGCATTATTATTATGCTGG  191

59          CAGTTCAGACTTCTTACAGTTGGACATCCATATTTTAAAGTA---CCTAAAGGTGGTAA  170
68          TACATCTAGGTTATTAAGTGTAGGCCATCCATATTTTAAAGGTC---CTATGCTGGGGG  170
18          CAGCTTTAGATTATTAAGTGTGGTAAATCCATATTTTAAAGGTT---CCTGCAGGTGGTGG  353
45          CAGTTCAGACTTCTTACAGTTGGACATCCATATTTTAAAGGTTGTACCTAATGGTGCAGG  1680
56          CAGTTCAGACTTCTTACAGTTGGACATCCATATTTTAAAGGTTGTACCTAATGGTGCAGG  356
F          CAGC-----CT-----CTGTGACTGAT--  98
51          CAGTTCAGACTAATTACATTAGGACATCCCTATTTTCCACTA---CCTAAAACC---T  166
69          CAGCTCTCGATTATTAAGTGTGGGTCATCCCTATTTTCCAAAT---CCTAAAATCTGGT-T  166
16          GACATCCAGACTACTTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCCCTAT-----TAAAAAACCTAA  167
CaSki -----
35          CAGTTCAGACTAATTACATTAGGACATCCCTATTTTCCACTA---CCTAAAACC---T  166
31          CAGCTCTCGATTATTAAGTGTGGGTCATCCCTATTTTCCAAAT---CCTAAAATCTGGT-T  166
33          TAGTTCAGACTTCTTACAGTTGGACATCCATATTTTAAAGGTTGTACCTAATGGTGCAGG  167
58          CAGTTCAGACTTCTTACAGTTGGACATCCATATTTTAAAGGTTGTACCTAATGGTGCAGG  245
52          CAGTTCAGACTTCTTACAGTTGGACATCCCTATTTTCCCTAT-----TAAAAAACCTAA  245

59          TG-----GTA-----GACAGGATGTTCTAAGGTGTCTGCATATCAATACAGAGTAT  217
68          CC-----GCA-----AGCAGGACATTCCTAAGGTGTCTGCATATCAATACAGGTTGT  217

```

⁴Pubmed [en línea] [consulta 29 nov. 2013] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>.

⁵ ClustalW [en línea] [consulta 29 nov. 2013] <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>>.

18	CA-----ATA----AGCAGGATATTCCTAAGGTTCTGCATACCAATATAGAGTAT	400
45	TA-----ATA----AACAGGCTGTTCCCTAAGGTATCCGCATATCAGTATAGGGTGT	1727
56	CA-----ATACCAAAACAAA-CATTCCCAAAGTTAGTGCATATCAATATAGGGTAT	406
F	-----ACAA-----GTGC-TATCACC-----	113
51	CA-----ACGC--GTGCTGC-TATTCCCTAAAGTATCTGCATTTCAATACAGGGTAT	214
69	CA-----ACA----GCAGA-AATTCCCTAAAGTGTCTGCCTACCAATATAGGGTTT	211
16	CA-----ATAACAAAATATT-AGTTCCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTAT	217
CaSki	-----	
35	TT-----CTAATAAAATAGC-AGTACCCCAAGGTATCTGGTTTGCAATACAGAGTAT	217
31	TC-----CTAAAAAATAGT-TGTACCAAAAGGTGTGAGGATTACAATATAGGGTAT	220
33	TA-----ACGCTAAAAAGTTATT-GGTACCCAAAGTATCAGGCTTGCAATATAGGGTTT	220
58	TA-----ACAATAAAAAAGTATT-AGTTCCCAAGGTATCAGGCTTACAGTATAGGGTCT	298
52	TAGTGGTAATGGTAAAAAGTTTT-AGTTCCCAAGGTGTCTGGCTGCAATACAGGGTAT	304
59	TTAGGGTTAATTTACCTGATCCCAATAAATTCGGCCTTCAGATAACACAGTATATGATC	277
68	TTAGGGTTCCCTACCTGATCCCTAATAAATTTAGTCTTCCTGAGTCTACATTATATAACC	277
18	TTAGGGTGCAGTTACCTGACCCAAATAAATTTGGTTTACCTGATACTAGTATTTATAATC	460
45	TTAGAGTAGCTTTACCCGATCCCTAATAAATTTGGATTACCTGATCTACTATATATAATC	1787
56	TTAGGGTACGGTTGCCCGACCCCTAATAAGTTTGGGCTTCAGATACTAATATTTATAATC	466
F	-----TTGACCC-CTCCACTAAGTCTGA-----AGATA-----	140
51	TTAGGGTACAGTTACCAGATCCCTAACAAGTTTGGACTCCCGGATCCAAATTTATATAATC	274
69	TTCTGTTCACCTTCCAGACCCCTAACAATTTGGGTTGCCTGACCCCGAGTTATATAATC	271
16	TTAGAATACATTTACCTGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCCTGACACCTCATTTTATAATC	277
CaSki	-----	
35	TTAGAGTAAAAATTACCAGATCCCTAATAAGTTTGGATTTCAGACACATCATTTTATGATC	277
31	TTAGGGTTCGTTTACCAGATCCAAACAATTTGGATTTCCTGATACATCTTTTATAATC	280
33	TTAGGGTCCGTTTACCAGATCCCTAATAAATTTGGATTTCCTGACACCTCCTTTTATAACC	280
58	TTAGGGTGCCTTACCTGATCCCAATAAATTTGGTTTTCCTGATACATCTTTTATAACC	358
52	TTAGAATTAATTTGCCGACCCCTAATAAATTTGGTTTTCAGATACATCTTTTATAACC	364
59	CTAACTCTCAACGCTTGGTCTGGGCCCTGTGTAGGTGTTGAAATCGGTGCGGGCCCAACCTT	337
68	CTGATACGCAGCGATTGGTATGGGCCCTGTGTTGGTGTGAAATAGGTAGGGGGCAGCCAT	337
18	CTGAAACACAACGTTTGTGTGGGCCCTGTGCTGGAGTGGAAATGGCCGTGGTCAGCCCTT	520
45	CTGAAACACAACGTTTGGTTTGGGCATGTGTAGGTATGGAAATGGTCTGGGGCAGCCCTT	1847
56	CGGACCAGGAACGGTTAGTGTGGGCATGTGTAGGTGGAGGTAGGCCCGCGGACAGCCCTT	526
F	-----AAGA-----GATTTGC-----CAACCTT	158
51	CAGACACAGATAGGTGGTGTGGGGTGTGTGGGCGTTGAGGTGGGCAGAGGACAGCCCTT	334
69	CCGAAACAGAACGGTTGGTATGGGCCCTGTGTTGGTGTAGAGGTGGCAGGGGACAACCGT	331
16	CAGATACACAGCGGCTGGTTTGGGCCCTGTGTAGGTGTTGAGGTAGGCCGTGGTCAGCCAT	337
CaSki	-----	
35	CTGCCTCCAGCGTTTGTGTTGGGCCCTGTACAGGAGTTGAAGTAGGTCTGGTCAGCCAT	337
31	CTGAAACTCAACGCTTAGTTTGGGCCCTGTGTTGGTTTAGAGGTAGGTGCGGGGCAGCCAT	340
33	CTGATACACAACGATTGGTATGGGCATGTGTAGGCCCTGAAATAGGTAGAGGGCAGCCAT	340
58	CTGATACACAACGTTTGGTCTGGGCATGTGTAGGCCCTTGAATAGGTAGGGGACAGCCAT	418
52	CAGAAACCCAAAGTTGGTGTGGGCCCTGTACAGGCTTGGAAATCGGTAGGGGACAGCCCTT	424
59	TAGGGGTAGGACTCAGTGGTCAATCCATTATATAATAAATTTGGATGACACTGAAAACCTCTC	397
68	TAGGTGTGGCCTTAGTGGGCATCCATTATATAATAGGCTAGATGATACTGAAAATTCCTC	397
18	TAGGTGTGGCCTTAGTGGGCATCCATTATATAATAAATTTAGATGACACTGAAAGTTCCC	580
45	TAGGTATTGGCCTAAGTGGCCATCCATTATATAATAAATTTGGATGATACAGAAAGTGCTC	1907
56	TAGGTGCTGGGCTAAGTGGCCATCCATTGTTTAAATAGGCTGGATGATACTGAAAGTTCCA	586
F	TA-----CCCA-----GAT--CACT-----	171
51	TTGGTGTGGCCTTAGTGGTCAATCCCTTATTTAATAAATATGATGACACAGAAAATTCAC	394
69	TGGGTGTGGGCTAAGTGGGCATCCCTTATTTAATAAATTTGGATGACACTGAAAATTCAC	391
16	TAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCCTTATTTAATAAATTTGGATGACACAGAAAATGCTA	397
CaSki	-----	
35	TAGGTGTAGGTATTAGTGGTCAATCCCTTATTTAATAAATTTGGATGATACTGAAAATTCCTA	397
31	TAGGTGTAGGTATTAGTGGTCAATCCCTTATTTAATAAATTTGGATGATACTGAAAATTCCTA	400
33	TAGGCGTTGGCATAAGTGGTCAATCCCTTATTTAATAAATTTGGATGATACTGAAAATTCCTA	400
58	TGGGTGTGGGCTAAGTGGTCAATCCCTTATTTAATAAATTTGGATGATACTGAAAATTCCTA	478
52	TAGGTGTGGGTATTAGTGGGCATCCCTTATTTAATAAATTTGGATGATACTGAAAATTCCTA	484
59	ATGTAGCATCTGCTGTTG-ATACCAAAGATACACGTGATAATGTATCTGTGGATTATAAA	456
68	CGTTTTCTCTAACAGAA-ATCCTAAGGACAGTAGGGACAATGTTTCAGTGGACTGTAAA	456
18	CAGCCGCCACGCTCAATG-TTCTGAGGACGTTAGGGACAATGTGCTGTAGATTATAAG	639
45	ATGCAGCTACAGCTGTTA-TTACGCAGGATGTTAGGGATAATGTGTCAGTTGATATAAG	1966
56	ATTTAGCAAATAAATAATG-TTATAGAAGATAGTAGGGACAATATATCAGTTGATGGCAAG	645
F	-----CAATA-----	176

51	GCATAGCAAATGGCAATGCACAACAA-GATGTTAGAGATAACACATCTGTTGACAACAAA	453
69	ATCTTGGCCACTGCTAATGCA-GACACTGATAATAGGGACAACGTGTGTGTAGATAATAAA	450
16	GTGCTTATGCAGCAAATG-CAGGTGTGGATAATAGAGAATGTATATCTATGGATTACAAA	456
CaSki	-----	
35	ATAAATATGTTGGTAACT-CTGGTACAGATAACAGGGAATGCATTTCTATGGATTATAAA	456
31	ATAGATATGCCGGTGGTC-CTGGCACTGATAATAGGGAATGTATATCAATGGATTATAAA	459
33	ACAAGTATCCTGGACAGC-CGGGTGCTGATAATAGGGAATGTTTATCCATGGATTATAAA	459
58	ACAGATATCCCACAGC-CAGGGTCTGATAACAGGGAATGCTTATCTATGGATTATAAA	537
52	ACAAATATGCTGGTAAAC-CTGGTATAGATAAATAGGGAATGTTTATCTATGGATTATAAG	543
59	CAAACCTCAGCTGTGTATTATTGGCTGTGTACCTGCCATTGGAGAACACTGGACAAGGGC	516
68	CAAACGCAACTATGTATTATAGGCTGTGTTCCCTGCCATTGGGGAGCACTGGGCCAAAGGT	516
18	CAGACACAGTTATGTATTTTGGGCTGTGCCCTGCTATTGGGGAACTGGGCTAAAGGC	699
45	CAAACACAGCTGTGTATTTTAGGTTGTGTACCTGCTATTGGTGGAGCACTGGGCCAAGGC	2026
56	CAAACACAGTTGTGTATTGTTGGATGTACTCCCGCTATGGGTGAACATTGGACTAAAGGT	705
F	-----GGGTGA-----GACT-----	186
51	CAGACTCAGTTATGTATAATAGGCTGTGCTCCACCTATTGGGGAACTGGGGTATTGGC	513
69	CAAACCTCAGTTATGTATTATTGGATGTACCCCTCCTTTAGGTGAACACTGGGGCGTTGGC	510
16	CAAACACAATTGTGTTTAAATTGGTTGCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGA	516
CaSki	-----	
35	CAAACACAATTGTGTTTAAATAGGTTGTAGGCCTCCTATAGGTGAACATTGGGGAAAAGGC	516
31	CAAACACAGCTGTGTTTACTTGGTTGCAAACCACCTATTGGAGAGCATTTGGGGTAAAGGT	519
33	CAAACACAGTTATGTGTTTACTTGGATGTAAAGCTCCAACAGGGGAACATTGGGGTAAAGGT	519
58	CAAACACAATTATGTTTAAATTGGCTGTAACCTCCCACTGGTGAGCATTTGGGGTAAAGGT	597
52	CAAACCTCAGTTATGCATTTTAGGATGCAAACCCTCCTATAGGTGAACATTGGGGTAAAGGA	603
59	ACTGCTTGTAAGCCTAATAC-----TGTG--GTTGAGGGCGATTGTCCTCCACTAGAATT	569
68	AAATCTTGTAAGCCTAACAA-----TGTGCAGCCCGGG--ACTGTCCACCATTAGAATT	569
18	ACTGCTTGTAATC--GCGT-----CCTTTATCACAGGGCGATTGCCCCCTTTAGAATT	752
45	ACACTTTGTAACCT-GCA-----CAATTGCAACCTGGTACTGTCCTCCTTTGGAATT	2079
56	GCTGTGTGAAGTCC-ACAC-----AAGTTACCACAGGG-GACTGCCCGCCTTTGCAATT	758
F	-----TCTCTGTCTCTGGGG--	201
51	ACTACATGCAAAAAC-ACAC---CT---GTACCTCCAGGAGACTGCCCCCTTGGAACT	566
69	ACTGTATGTAAAAAT-GCAGCTCTCAGGTACAGCGTGGCGATTGTCCACCTTTGGAATT	569
16	TCCCCATGTACCAATGTTGC-----AGTAAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTT	569
CaSki	-----	
35	ACACCTTGTAATGCTAACCA-----GGTAAAAGCAGGAGAATGTCCTCCTTTGGAGTT	569
31	AGTCCTTGTAAGTAAATAATGC-----TATTACCCCTGGTGATTGTCTCCATTAGAATT	572
33	GTTGCTTGTAATGCTAACCA-----ACC---TGCCAATGATTGTCCACCTTTAGAATT	569
58	GTTGCCTGTAACAATAATGC-----AGC---TGCTACTGATTGTCTCCTCATTGGAATT	647
52	ACCCCTTGTAATAATAATTC-----AGGAAATCCTGGGGATTGTCTCCCTACAATT	656
59	AATAAATACACCAATTGAAGATGGTGATATGGTAGACACAGGATATGGGGCTATGGACTT	629
68	AGTAAATACACCTATACAGGATGGCGATATGATTGATACAGGATATGGTGCTATGGACTT	629
18	TAAAAACACAGTTTGGAAAGATGGTGATATGGTAGATACTGGATATGGTGCCATGGACTT	812
45	TAAAAACACCAATTATTGAGGATGGTGATATGGTGATACAGGTTATGGGGCAATGGATT	2139
56	AATTAATACACCTATAGAGATGGGGACATGATAGACACGGGATTTGGCGCTATGGACTT	818
F	-----AGAGGATGGGA-----	212
51	TGTATCCTCTGTCAATCAGGATGGCGATATGATTGATACAGGGTTTGGAGCTATGGATT	626
69	TATTTCCAGTGTATTGAGGATGGTGATATGATTGATACTGGCTTTGGTGCCATGGATT	629
16	AATAAACACAGTTATTCCAGGATGGTGATATGGTTGATACTGGCTTTGGTGCTATGGACTT	629
CaSki	-----	
35	ACTAAACACTGTACTACAAGACGGGGACATGGTAGACACAGGATTTGGTGCAATGGATT	629
31	AAAAAATTCAGTTATACAAGATGGGGATATGGTTGATACAGGCTTTGGAGCTATGGATT	632
33	TATAAATACTATTATTGAGGATGGTGATATGGTGACACAGGATTTGGTTGCATGGATT	629
58	TTTTAATTTCTATTATTGAGGATGGTGACATGGTAGATAACAGGGTTTGGATGCATGGACTT	707
52	CATTAACAGTGAATACAGGATGGGGACATGGTAGATAACAGGATTTGGTTGCATGGATT	716
59	TAAATTGTTGCAGGATAACAAAAGTGAAGTACCATTGGATATTTGTCAGTCTATTTGTAA	689
68	TAGTACATTACAAGAAACAAAAGCGAGGTGCCTTTAGATATATGTCAATCGGTCTGCAA	689
18	TAGTACATTGCAAGATACTAAATGTGAGGTACCATTGGATATTTGTCAGTCTATTTGTAA	872
45	TAGTACATTGCAGGATACAAAAGTGCAGGTTCCATTAGACATTGTCAATCCAATCTGTAA	2199
56	TAAGGTGTTGCAGGAATCTAAGGCTGAGGTACCTTTAGACATTGTACAATCCACCTGTAA	878
F	-----CAA	215
51	TGCTGCCCTACAGGCCACCAAATCAGACGTCCTTTGGATATTTACAGTCTGTTTGTAA	686
69	TACAGCTTTGCAAGCTACAAAATGTGATGTGCCACTTGATATTAATCAATCTATTTGCAA	689
16	TACTACATTACAGGCTAACAAAAGTGAAGTCCACTGGATATTTGTACATCTATTTGCAA	689
CaSki	-----	

35	TACTACATTACAAGCTAATAAAAAGTGATGTTCCCTAGATATATGCAGTTCCATTTGCAA	689
31	TACTGCTTTACAAGACTAAAAGTAATGTTCCCTTTGGACATTTGTAATTTCTATTTGTAA	692
33	TAAAACATTGCAGGCTAATAAAAAGTGATGTTCCCTATTGATATTTGTGGCAGTACATGCAA	689
58	TGGTACATTGCAGGCTAATAAAAAGTGATGTTCCCTATTGATATTTGTAACAGTACATGCAA	767
52	TAATACCTTGCAAGCTAGTAAAAGTGATGTGCCATTGATATATGTAGCAGTGTATGTAA	776
59	ATATCCTGATTATTTACAAATGTCAGCAGATGCTTATGGAGACAGTATGTTTTTTTGT	749
68	ATATCCTGACTATTTACAAATGTCAGCAGATGCTTATGGAGACAGTATGTTCTTTTGT	749
18	ATATCCTGATTATTTACAAATGTCAGCAGATCCTTATGGGATTCATGTTTTTTTGT	932
45	ATATCCAGATTATTTGCAAATGTCAGCAGATCCTTATGGGATTCATGTTTTTTTGT	2259
56	ATATCCTGACTATTTAAAAATGTCAGCAGATGCTTATGGTATTCATGTTGTTTACT	938
F	ATGCCCT----ATATCGAAAT-----	232
51	ATATCCTGATTATTTAAAAATGTCAGCAGACATATGGTAATTCATGTTTTTTTCT	746
69	ATATCCAGATTACCTTAAAAATGTCAGCAGATGCTTATGGAAACAGCATGTTTTTTTCT	749
16	ATATCCAGATTATTTAAAAATGGTGTGACGACCATATGGCGACAGCTTATTTTTTAT	749
CaSki -----		
35	ATATCCTGATTATTTAAAAATGGTGTGAGCCATATGGCGATATGTTATTTTTTTAT	749
31	ATATCCAGATTATTTAAAAATGGTGTGAGCCATATGGCGATACATTTTTTTTTAT	752
33	ATATCCAGATTATTTAAAAATGACTAGTAGGCCTTATGGTGATGTTTTTTTTTTCT	749
58	ATATCCAGATTATTTAAAAATGGCAGTGAACCTTATGGGATAGTTTGTCTTTTTCT	827
52	GTATCCAGATTATTTGCAAATGGCTAGCGAGCCATATGGTGACAGTTTGTCTTTTTCT	836
59	AAGGCGAGAACAGGTTTTTGGCAGACATTTTTGGAATAGATCTGGTACTATGGGTGAT-C	808
68	ACGTAGGGAACAGTTATTTGCTAGGCATTTTTGGAATAGAGGGGCATGGTAGGGACAC	809
18	ACGGCGTAGCAGCTTTTTGCTAGGCATTTTTGGAATAGAGCAGGTACTATGGGTGACAC	992
45	ACGCCGTGAACAACCTGTTTGAAGACATTTTTGGAATAGGGCAGGTGTTATGGGTGACAC	2319
56	ACGCAGGGAACAATTTTGGCAGACATTTTAAATAGGGCTGGTAAAGTTGGGAAAC	998
F	-----CAGGA-----TAATGGGG-----AGGA-----	250
51	ACGCAGGGAACAATCTTTGCTAGGCATTTATAATAAACTGGTAGTGTGGGGAAGA	806
69	TCGTCCGGAACAATGTTTGGCAGACATTTTTTAAATAAAGCTGGCACTATAGGTGA---	806
16	ACGGAGGGAACAATGTTTGTAGACATTTTAAATAGGGCTGGTGTGTTGGTGAAGA	809
CaSki -----		
35	ACGTAGAGGCAAAATGTTTGTAGACATTTTAAATAGGGCTGGAACCTGTAGGTGAAAC	809
31	ACGTAGGGAACAATGTTTGTAAAGACATTTTTTAAATAGATCAGGCGCGGTTGGTGAAC	812
33	TCGACGTGAACAATGTTTGAAGACACTTTTTTAAATAGGGCTGGTAAATAGGAGAGGC	809
58	TAGACGTGAGCAGATGTTTGTAGACACTTTTTTAAATAGGGCTGGAAAACCTGGCAGGC	887
52	TAGACGTGAGCAAAATGTTTGTAGACACTTTTTTAAATAGGGCCGGTACCTTAGGTGACCC	896
59	AAC TTC--CTGAATCACTAT--ATATTAAGG TACTGA-----CATACGTGCCACCCCA	858
68	TATTCCTACTGAAT---TGT--ATATTAAGGCACTGA-----CATACGTGACAGTCCT	858
18	TGTGCCCAATCCT---TAT--ATATTAAGGCACAGG-----TATGCGTGTTCACCT	1041
45	AGTACCTACGGACC---TAT--ATATTAAGGCACTAGCGCTAATATGCGTGAACCCCT	2374
56	AATACCTGCAGAGT---TAT--ATTTAAAGGGTAGCAA-----TGGTAGAGAACCCCT	1047
F	-----GGGTAA-AA-----TTGCA-----CCTC	267
51	CATTCC-TACCGAT---TAT-TATATTAAGGGTAGTGG---TAATGGCCGTGACCCCTATA	858
69	---TTCTGTACCAGTATCTATGTATATTAAGGCGCTGG---TCAAGGTGTAACCTCCA	861
16	TGTACCAGACGATT---TAT--ACATTAAGGCTCT-----GGGTCTAGCAAATTTA	858
CaSki -----		
35	AGTACCTGCAGACC---TAT--ATATTAAGGGTACC-----ACTGGCACATFG	852
31	GGTTCCTAATGACT---TAT--ATATTAAGGCTCC-----GGTTCACAGCTACTTTA	861
33	TGTTCCCGATGACC---TGT--ACATTAAGGTTCA-----GGAAC TACTGCCTCTATT	858
58	TGTCCCGATGACC---TTT--ATATTAAGGGTCC-----GGTAATACTGCAGTTATC	936
52	TGTGCCAGGTGATT---TAT--ATATACAGGGTCTAACTCTGGCAACTGCCACTGTA	951
59	GGCAGTTATTTATATTCCTCTCCCAAGTGGGTCTGTGGTTACTTCTGATTACAATTA	918
68	AGTAGTTATGTATATGCCCTCGCCTAGTGGGTCTATGGTATCCTCAGACTCCCAGTTA	918
18	GGCAGCTGTGTGATTTCTCCCTCTCCAAGTGGCTCTATTGTTACCTCTGACTCCCAGTTG	1101
45	GGCAGTTGTGTGATTTCCCTCTCCAGTGGCTCTATTATTACTTCTGATTCTCAATTA	2434
56	CCGAGTTCTGTATATGTTGCTACGCCCTAGTGGGTCTATGATTACGTCTGAGGCACAGTTA	1107
F	TTGAGTCTTTGAATGC--CTATGCACAG-GTAACTATGATTCC-----	308
51	GAAAGTTATATATACTCTGCTACTCCAGTGGGTCTATGATAACATCTGATTCTCAAAT	918
69	ACTACTCTATACTACGTACGCCCTAGTGGCTCCATGGTGACCTCTGATGCTCAATG	921
16	GCCAGTTCAAATTTATTTTCTACACCTAGTGGTCTATGGTTACCTCTGATGCCAAATA	918
CaSki -----		
35	CCTAGTACTAGTTATTTTCTACTCTAGTGGCTCTATGGTAACCTCAGATGCACAAATA	912
31	GCTAACAGTACATACTTTCTACACCTAGCGGCTCCATGGTTACTTCCAGATGCACAAAT	921
33	CAAAGCAGTGTCTTTTTTCCCACTCTAGTGGATCTATGGTTACTTCCGAATCTCAGTTA	918
58	CAAAGTAGTGCAATTTTTTCCAACCTCTAGTGGCTCTATAGTTACCTCAGAATACAATTA	996

52	CAAAGCAGTGCTTTTTTTCCTACTCCTAGTGGTTCTATGGTAACCTCAGAATCCCAATTA	1011
59	TTTAATAAACCCATATTGGCTGCACAAGGCTCAGGGTTTAAACAATGGTATATGTTGGCAC	978
68	TTTAACAAGCCCTATTGGCTGCACAAGGCACAGGGACACAACAATGGTATTTGTTGGCAT	978
18	TTTAATAAACCCATATTGGTTACATAAGGCACAGGGTCATAACAATGGTGTGTTGCTGGCAT	1161
45	TTTAATAAGCCATATTGGTTACATAAGGCCAGGGCCATAACAATGGTATTTGTTGGCAT	2494
56	TTTAATAAACCTTATTGGTTGCAACCTGCCAAGGCCATAATAATGGCATTGCTGGGGT	1167
F	-----TGCAAC-----CCCG-----GGCAT-----	323
51	TTTAATAAGCCTTATTGGCTCCACCGTGCAGGGTCACAATAATGGCATTGCTGGAAC	978
69	TTTAATAAACCTTACTGGTTACAGCGTCCCAGGGTCATAATAATGGCATTGTTGGGGC	981
16	TTCAATAAACCTTATTGGTTACAACGAGCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTTGGGGT	978
CaSki	-----GCACAGGCACATAATAATGGCATTGTTGGGGT	33
35	TTTAATAAACCCATATTGGTTGCAACCTGCACAAGGCCATAATAATGGTATTTGTTGGAGT	972
31	TTTAATAAACCCATATTGGATGCAACCTGCTCAGGGACACAATAATGGTATTTGTTGGGGC	981
33	TTTAATAAGCCATATTGGCTACAACCTGCACAAGGTGATAATAATGGTATTTGTTGGGGC	978
58	TTTAATAAGCCTTATTGGCTACAGCGTGCACAAGGTGATAACAATGGCATTGCTGGGGC	1056
52	TTTAATAAACCGTACTGGTTACAACCTGCAGGGCCACAATAATGGCATATGTTGGGGC	1071
	* * * * *	
59	AATCAATGTTTTTAAACAGTTGTAGATCCTACTCGCAGCACCAATCTTCTGTGTGTGCT	1038
68	AATCAATTTACTTCTACTGTGTGTGATACCCTCGCAGTACTAATTTACTTTGTCTACT	1038
18	AATCAATTTACTTGTACTGTGTAGATACCCTCCAGTACCAATTTAAACAATATGTGCT	1221
45	AATCAGTTGTTGTTACTGTAGTGGACACTACCCGAGTACTAATTTAAACATATATGTGCC	2554
56	AATCAATTTACTTGTACTGTAGTACTACTAGAGTACTAATGACTACTATTAGTACT	1227
F	-ACCAAT-----AAAGTATAAACA-----ACT	344
51	AATCAGCTTTTTATTACTGTGTGTGATACTACCAGAAGTACAATTTAACTATTAGCACT	1038
69	AACCAATTTGTTTACTTGTGTAGATACTACCCGAGTACCAACCTCACTATTAGTACT	1041
16	AACCAACTATTGTTACTGTGTGATACTACAGCAGTACAATAATGTCATTATGTGCT	1038
CaSki	AACCAACTATTGTTACTGTGTGATACTACAGCAGTACAATAATGTCATTATGTGCT	93
35	AACCAATTTGTTTACTGTAGTTGATAACAACCGTAGTACAATAATGTCGTGTGTGTTCT	1032
31	AATCAGTTATTTGTTACTGTGTGATACCACAGTACTACCAATATGTCGTGTGTGCT	1041
33	AATCAGTATTTGTTACTGTGTGATACCCTCGCAGTACTAATATGACTTTATGCACA	1038
58	AATCAGTTATTTGTTTACCGTGTGATACCCTCGTAGCACTAATATGACATTTATGCACT	1116
52	AATCAGTTGTTTGTACAGTTGTGATACCCTCGTAGCACTAATATGACTTTATGTGCT	1131
	* ** * * * *	
59	TCTACTAC-TTCTTCTATTCCTAATGTACACACCTACCAGTTTTAAAGAATATGCCAG	1097
68	ACTACTGA-ATCAGCTGTACCAGATGTTTATGATCCTAATAAGTTTAAAGGAATATATTAG	1097
18	TCTACACA-GTCTCCTGTACTCTGGGCAATATGATGCTACCAAAATTTAAGCAGTATAGCAG	1280
45	TCTACACA-AAATCCTGTGCCAAGTACATATGACCCTACTAAGTTTAAAGCAGTATAGTAG	2613
56	GCTACAGA-ACA-----GTTAAGTAAATATGATGCACGAAAAAATTAATCAGTACTTTAG	1280
F	G-----	345
51	GCCACTGCTGCAGTTT---CCCAACATTTACTCCAAGTAACTTTAAGCAATATATTAG	1094
69	GTATCTGC-ACAATCTGCATCTGCCACTTTAAACCATCAGATTATAAGCAGTTTATAAG	1100
16	GCCATATCTACTTCAGA---AATACATATAAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACG	1094
CaSki	GCCATATCTACTTCAGA---AATACATATAAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACG	149
35	GCTGTGCTACTAGTGA---CAGTACATATAAAAAATGACAAATTTAAGGAATATTTAAG	1088
31	GCAATTGCAAACAGTGA---TACTACATTTAAAAGTAGTAATTTAAGGAGTATTTAAG	1097
33	CAAGTA---ACTAGTGA---CAGTACATATAAAAAATGAAAAATTTAAGGAATATATAAG	1091
58	GAAGTA---ACTAAGGA---AGGTACATATAAAAAATGATAATTTAAGGAATATGTACG	1169
52	GAGGTG---AAAAAGGA---AAGCACATATAAAAAATGAAAAATTTAAGGAATACCTTCG	1184
59	ACATGTGGAGGAATTTGATTTGCAGTTTATATTTCAACTGTGTAAAATAACATTAACACTAC	1157
68	GCATGTTGAGGAATATGATTTGCAATTCATATTTCACTGTGTACTATAACATTTGTCAAC	1157
18	ACATGTTGAGGAATATGATTTGCAGTTTATTTTTCAGTTGTGTACTATTACTTTAACTGC	1340
45	ACATGTGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAGTTGTGTACTATTACTTTAACTGC	2673
56	ACATGTGGAGGAATATGAATTACAATTTGTTTTCAATTTGCAAAAATTAATTTGCTGCTGC	1340
F	-----ATTCTTTTTT---TTCTCTAAGCCTACCTTTTCT--	376
51	GCATGGGGAAGAGTATGAATTGCAATTTATTTTTCAGTTATGTAAAATTAATTTAACTAC	1154
69	GCATGGTGAAGGAATATGAATTACAGTTTATATTTCAATTTGTGTAATAATTAATTTTACCAC	1160
16	ACATGGGGAAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAGTTGTGTAATAATTAATTTTAACTGC	1154
CaSki	ACATGGGGAAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAGTTGTGTAATAATTAATTTTAACTGC	209
35	GCATGGTGAAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAGTTATGTAAAATAACACTAACAGC	1148
31	ACATGGTGAAGGAATTTGATTTACAATTTATATTTCACTGTGTAATAATTAATTTTAACTGC	1157
33	ACATGTTGAAGGAATATGATTTACAGTTTGTGTTTTCAACTATGCAAAAGTTACCTTAACTGC	1151
58	TCATGTTGAAGGAATATGACTTACAGTTTGTGTTTTTCAGTTTGTGCAAAAATTAATTTAACTGC	1229
52	TCATGGCGAGGAATTCGATTTACAATTTATTTTTCAGTTGTGCAAAAGTTACATTAACAGC	1244
	* * * * * * * * * * *	
59	AGAGGTAATGTCATACATTCATAATATGAATACCCTATTTTGGAGGATTGGAATTTGG	1217

```

68      TGATGTAATGTCTATATACATACTATGAATCCTGCTATTTTGGATGATTGGAATTTTGG 1217
18      AGATGTTATGTCTATATTCATAGTATGAATAGCAGTATTTTAGAGGATTGGAACCTTTGG 1400
45      AGAGGTTATGTATATATCCATAGTATGAATAGTAGTATATTAGAAAATTGGAATTTTGG 2733
56      AGAGGTTATGGCATATTTACATAAATATGAATGCTAACCTACTGGAGGACTGGAATTTGG 1400
F      -----AA----- 378
51      AGAGGTAATGGCTTATTTACACACAATGGATCCTACCATTCTTGAACAGTGGAAATTTGG 1214
69      TGATGTAATGGCTATATCCATACAATGAATTCTACTATTTTGGAAAATTGGAATTTTGG 1220
16      AGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCACCTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGG 1214
CaSk1 AGACGTTATGACATACATACATTCTATGAATTCACCTATTTTGGAGGACTGGAATTTTGG 269
35      AGATGTTATGACATATATTCATAGTATGAACCCGTCCTATTTTAGAGGATTGGAATTTTGG 1208
31      AGACATAATGACATATATTCACAGTATGAATCCTGCTATTTTGGAAAGATTGGAATTTTGG 1217
33      AGAAGTTATGACATATATTCATGCTATGAATCCAGATATTTTAGAAGATTGGCAATTTGG 1211
58      AGAGATAATGACATATATACATACTATGGATTCCAATATTTTGGAGGACTGGCAATTTGG 1289
52      TGATGTTATGACATATATTCATAAGATGGATGCCACTATTTTAGAGGACTGGCAATTTGG 1304

59      TGTTACACCACCTCCTACTGCTAGTTTGTGACACATACCGTTTGTTCFAATCTGCTGC 1277
68      TGTTGCCCTCCACCATCTGCTAGTCTGTAGATACATACCGCTATCTGCAATCAGCAGC 1277
18      TGTTCCCCCCCCCACTACTAGTTTGGTGGATACATATCGTTTGTACAATCTGTTGC 1460
45      TGTTCCCTCCACCACCTACTACAAGTTTGGTGGATACATATCGTTTGTGCAATCAGTTGC 2793
56      GTTATCCCGCCAGTGGCCACCGCTAGAAGATAAAATAGATATGTTAGAAGCACAGC 1460
F      --TATCCCCATCAA-GGCCCCCTCC----- 401
51      ATTAACATTACCTCCATCTGCTAGTTTGGAGGATGCATATAGGTTTGTTCGAAATGCAGC 1274
69      CCTTACCTTGCCTCCTACTGCTAGTTTGGAAAGATGCATATAGGTTTATTAATAAATTCAGC 1280
16      TCTACAACCTCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGC 1274
CaSk1 TCTACAACCCCCCAGGAGGCACACTAGAAGATACTTATAGGTTTGTAAACATCCCAGGC 329
35      CCTTACACCACCGCCTTCTGGTACCTTAGAGGACACATATCGCTATGTAACATCACAGGC 1268
31      ATTTGACCACACCTCCCTCAGGTTCTTTAGAGGATACCTATAGGTTTGTAACTCACAGGC 1277
33      TTTAACACCTCCTCATCTGCTAGTTTACAGGATACCTATAGGTTTGTACCTCCAGGC 1271
58      TTTAACACCTCCTCCGCTGCTGACAGTTTACAGGACACATATAGATTTGTACCTCCCAGGC 1349
52      CCTTACCCACCACCGTCTGCATCTTTGGAGGACACATACAGATTTGTAACCTTCTACTGC 1364
          *          *

59      TGTAACCTGTCAAAAAGGACACCCGACCCGCGAGTTAAACAGGACCCTTATGACAAAATAAA 1337
68      AATTACATGTGCAAAAAGACGCCCTGCACCTACTAAAAGGATCCATATGATGGCCTAAA 1337
18      TATTACCTGTCAAAAAGGATGCTGCACCCGGCTGAAAATAAGGATCCCTATGATAAGTTAAA 1520
45      TGTTACCTGTCAAAAAGGATACACCTCCAGAAAAGCAGGATCCATATGATAAATAAA 2853
56      TATAACATGTCAACGGGAACAGCCACCAACAGAAAACAGGACCCATTAGCTAAATATAA 1520
F      -----CCGTT----- 406
51      TACTAGCTGTCAAAAAGGACACCCCTCCACAGGCTAAGCCAGATCCTTTGGCCAAATATAA 1334
69      TACTACATGTCAACCGCATGCCCTGCACAGCCCAAGGAGGATCCATTTAGTAAATATAA 1340
16      AATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACAC 1334
CaSk1 AATTGCTTGTCAAAAACATACACCTCCAGCACCTAAAGAAGATCCCCTTAAAAAATACAC 389
35      TGTAACCTGTCAAAAACCCAGTGCACCAAAAACCTAAAGATGATCCATTTAAAAAATTATAC 1328
31      CATTACATGTCAAAAACCTGCCCCCAAAAAGCCCAAGGAAGATCCATTTAAAGATTATGT 1337
33      TATTACGTGTCAAAAACAGTACCTCCAAAAGGAAAAGGAAGACCCCTTAGGTAATATAA 1331
58      TATTACTTGCCAAAACAGCACCCCTAAAGAAAAGGAAGATCCATTTAAATAAATATAA 1409
52      TATAACTTGTCAAAAACACACCACCTAAAGGAAAAGGAAGATCCTTTAAAGGACTATAT 1424
          * *

59      GTTTTGGACTGTAGATCTTAAAGAAAGGTTTTCTGCAGATCTTGATCAGTTTCCTTTGGG 1397
68      CTTTTGGAATGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTAGTTCTGAACTGGACCAGTTTCCTTTAGG 1397
18      GTTTTGGAATGTGGATTTAAAGGAAAAGTTTTCTTTAGACTTAGATCAATATCCCCTTGG 1580
45      GTTTTGGACTGTGACCTAAAGGAAAAGTTTTCTCCGATTTGGATCAATATCCCCTTGG 2913
56      ATTTTGGGATGTTAACTTACAGGACAGTTTTTCTACAGACCTGGATCAATTTCCACTGGG 1580
F      --TTT-----CT-----TTCTTCCA-----TCAACCTCCATT--- 431
51      ATTTTGGGATGTTGATTTAAAGGAAACGGTTTTCTTTAGATTTAGACCAATTTGCATTGGG 1394
69      ATTTTGGGACGTTGATCTTAAAGAAAAGTTTTCTATTGATTTAGATCAATTTCCACTGGG 1400
16      TTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGG 1394
CaSk1 TTTTTGGGAAGTAAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGG 439
35      TTTTTGGGAGGTTGATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGACTTAGATCAATTTCCGTTGGG 1388
31      ATTTTGGGAGGTTAATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGATTTAGATCAGTTTCCTACTGGG 1397
33      ATTTTGGGAAGTGGATTTAAAGGAAAAGTTTTCTCAGCAGATTTAGATCAGTTTCCTTTGGG 1391
58      TTTTTGGGAGGTTAACTTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGATCTAGATCAGTTTCCTTTGGG 1469
52      GTTTTGGGAGGTTGATTTAAAGGAAAAGTTTTCTGCAGATTTAGATCAGTTTCCTTTAGG 1484
          ***          * *          **

59      ACGTAAATTTTATTGCAATTAGG--AGCTAGACCTAAGCCCACTATAGG---CCCACGC 1452
68      ACGCAAATTTCTTTTACAGGCAGG--TGTCCGCCGACGACCCCACTATAGG---CCCCCGC 1452
18      ACGTAAATTTTGGTTTCCAGGCTGG--ATTGCGTCGCAAGCCCACTATAGG--GC 1635
45      TCGAAAGTTTTTGTTCAGGCTGG--GTTACGTCGTAGGCCTACCATAGG-ACCTC--GT 2968
56      TAGAAAATTTTAAATGCAA-CTGGGCACTAGGTCA-AAGCCTGCTGTAGCTACCTCTAAA 1638

```

```

F -----ATTATTACCATGA-C-----AA 447
51 TCGAAAGTTTTTGTTCAGGTTGG--CGTACAACGCAAGCCCAGACCAGG---CCT---T 1446
69 CAGAAAATTTTATGCTGCAGGCTGG--TATACAGCGACGTCTTAAGTTAGG---CAC---C 1452
16 ACGCAAATTTTACTACAAGCAGG--ATTGAAGGCCAAACCAAAATTTAC---ATTAGGA 1449
CaSki -----
35 CCGTAAATTTTTGTTCACAAGCAGG--ACTAAAGGCCAGGCCAATTTTAG---ATTAGGC 1443
31 TCGCAAATTTTTATTACAGGCAGG--ATATAGGGCACGTCTTAATTTAA---AGCAGGT 1452
33 ACGCAAGTTTTTATTACAGGCAGG--TCTTAAAGCAAAACCTAAACT-----T 1437
58 ACGAAAGTTTTTATTACAATCAGG--CCTTAAAGCAAAGCCCAGACT-----A 1515
52 TAGAAAGTTTTTGTTCAGGCAGG--GCTACAGGCTAGGCCCAAAC-----A 1530

59 AAACG---TGCAGC-----GCCCGC-----CCCTACCTCTA-----CCCCA--- 1485
68 AAACGCCCTGCCAC-----AGCAAC-----TACTGCATCTA-----CCTC--- 1487
18 AAACGTTCTGCTCC-----ATCTGC-----CACTACGTCT-----TCTAAA--- 1671
45 AAGCGTCCTGCTGC-----TTCCACGTC-----TACTGCATCTACTGCATCTAGG--- 3013
56 AAGCGATCTGCTCC-----TACCTC-----CACCT-----CTACA--- 1668
F GGGCGATTT-----TCGT-----CGC----- 463
51 AAACGCCCGGCCTC-----ATCAGCATC-----CTCTCCTCTT-----CCTCT--- 1485
69 AAACGTCAGCTTCTTCTTATCTGCATC-----TTCTCCTCTA-----CCACA--- 1497
16 AAACGA---AAAGC-----TACACCCACCACCTCATCTACCTCTA-----CAA--- 1489
CaSki -----
35 AAGCGT---GCAGC-----TCCAGC-----ATCTACATCTA-----AAAAATCT 1479
31 AAACGTAGTGCACC-----CTCAGC-----ATCTACCACTA-----CAC----- 1486
33 AAACGT---GCAGC-----CCCAC-----ATCCACCCGCA-----CATCG--- 1470
58 AAACGT---TCGGC-----CCCTAC-----TACCCGTG-----CACCA--- 1545
52 AAACGC---CCTGC-----ATCATC-----G---GCCCCACG-----TACC--- 1560

```

Costos de la Investigación

A continuación mostramos el detalle de los costos de analizar la replicación de ambos CRAds (y el control WT) en las muestras de pacientes y el costo de genotipificación de las mismas. Relación Pesos/Dólar = 6,3

Puesta a Punto de Reacción de PCR

Material	Precio en dólares	Precio en pesos	Unidades de venta		Precio unitario	Cantidad por tubo		Cantidad x 20 tubos		Costo
dNTPS 100mM c/u	-	\$ 2.367,60	100	microlitros	\$ 23,676	0,05	microlitros	1	microlitros	\$ 23,68
Primer Forward 100 µM	\$ 16,00	\$ 100,80	100	microlitros	\$ 1,008	0,1	microlitros	2	microlitros	\$ 2,02
Primer Reverse 100 µM	\$ 16,00	\$ 100,80	100	microlitros	\$ 1,008	0,1	microlitros	2	microlitros	\$ 2,02
TAQ	-	\$ 505,60	500	Und. Enz.	\$ 1,011	1,25	Und. Enz.	25	Und. Enz.	\$ 25,28
H2O	-	\$ 10,00	500000	microlitros	\$ 0,000	15	microlitros	300	microlitros	\$ 0,00600
Tips c/filtro de 10 µL	-	\$ 566,00	1000	unidades	\$ 0,566	-	unidades	20	unidades	\$ 11,32000
Tips c/filtro de 20 µL	-	\$ 509,00	1000	unidades	\$ 0,509	-	unidades	6	unidades	\$ 3,05400
Tips c/filtro de 200 µL	-	\$ 510,00	1000	unidades	\$ 0,510	-	unidades	26	unidades	\$ 13,26000
Tips s/ filtro de 200 µL	-	\$ 62,82	1000	unidades	\$ 0,063	1	unidades	20	unidades	\$ 1,26
Microtubos de 0,5 ml	-	\$ 346,27	1000	unidades	\$ 0,346	1	unidades	20	unidades	\$ 6,93
Tubos Eppendorf 1,5 ml	-	\$ 75,00	500	unidades	\$ 0,150	-	unidades	2	unidades	\$ 0,30
Loading Buffer 10x	\$ 91,40	\$ 575,82	1000	microlitros	\$ 0,576	2,2	microlitros	44	microlitros	\$ 25,336

Material	Precio en dólares	Precio en pesos	Unidades de venta		Precio unitario	Cantidad x 1 gel		Costo
Buffer TAE 10x	\$ 110,00	\$ 693,00	1000	mililitros	\$ 0,693	70	mililitros	\$ 48,510
Agarosa	\$ 473,00	\$ 2.979,90	500	gramos	\$ 5,960	1,2	gramos	\$ 7,152
Bromuro Etidio	\$ 120,00	\$ 756,00	10000	microlitros	\$ 0,076	6	microlitros	\$ 0,454
1 Kb Plus Dna ladder	\$ 308,00	\$ 1.940,40	250	microgramos	\$ 7,762	1	microgramos	\$ 7,762

Total
\$ 114,45
\$ 63,877
\$ 178,323

- **Puesta a Punto: 20 tubos de reacción. En cada calle del gel se siembran 20 µL del producto de PCR.**

Etapa: Infección de las muestras

Material	Precio en dólares	Precio en pesos	Unidades de venta		Precio unitario	Cantidad por muestra		Costo por muestra
Stock adenoviral	-	\$ 6.507,13	1500	microlitros	\$ 4,34	45,00	microlitros	\$ 195,21
Medio RPMI	\$66,06	\$ 416,18	1000	mililitros	\$ 0,42	100,00	mililitros	\$ 41,62
SFB (natocor)	-	\$ 600,00	500	mililitros	\$ 1,20	30,00	mililitros	\$ 36,00
Placas Multiwell de 24	-	\$ 1.800,00	120	unidades	\$ 15,00	1,50	unidades	\$ 22,50
Pipetas 10 ml c/filtro	-	\$ 125,00	50	unidades	\$ 2,50	5,00	unidades	\$ 12,50
Pipetas 5 ml c/filtro	-	\$ 115,00	50	unidades	\$ 2,30	5,00	unidades	\$ 11,50
Tips c/filtro de 1000 µL	-	\$ 456,35	1000	unidades	\$ 0,46	15,00	unidades	\$ 6,85
Tips c/filtro de 200 µL	-	\$ 510,00	1000	unidades	\$ 0,51	20,00	unidades	\$ 10,20
Tips c/filtro de 20 µL	-	\$ 509,00	1000	unidades	\$ 0,51	2,00	unidades	\$ 1,02
Tubos Falcon de 50 ml	-	\$ 25,00	10	unidades	\$ 2,50	3,00	unidades	\$ 7,50
PBS	\$ 12,90	\$ 81,27	10000	mililitros	\$ 0,01	50,00	mililitros	\$ 0,41
Subtotal 1								\$ 345,30

Etapa: Purificación de ADN

Material	Precio en dólares	Precio en pesos	Unidades de venta		Precio unitario	Cantidad por muestra		Costo por muestra
Kit Extraccion de DNA RBC	\$ 286,00	\$ 1.801,80	100	purificaciones	\$ 18,02	18	purificaciones	\$ 324,32
Tubos Eppendorf 1,5 ml	-	\$ 75,00	500	unidades	\$ 0,15	90	unidades	\$ 13,50
Tips s/filtro de 1000 µL	-	\$ 61,24	1000	unidades	\$ 0,06	180	unidades	\$ 11,02
Tips s/filtro de 200 µL	-	\$ 62,82	1000	unidades	\$ 0,06	90	unidades	\$ 5,65
Tips s/filtro de 10 µL	-	\$ 107,38	1000	unidades	\$ 0,11	18	unidades	\$ 1,93
Subtotal 2								\$ 356,43

Etapa: Real-Time PCR

Material	Precio en dólares	Precio en pesos	Unidades de venta		Precio unitario	Cantidad por muestra		Costo por muestra
Placa Multiwell de 96	-	\$ 1.680,00	120	unidades	\$ 14,00	1	unidades	\$ 14,00
Film para la placa	-	\$ 800,00	20	unidades	\$ 40,00	1	unidades	\$ 40,00
Tubos Eppendorf 1,5 ml	-	\$ 75,00	500	unidades	\$ 0,15	3	unidades	\$ 0,45
Tips c/filtro de 10 µL	-	\$ 566,00	1000	unidades	\$ 0,57	50	unidades	\$ 28,30
Tips c/filtro de 20 µL	-	\$ 509,00	1000	unidades	\$ 0,51	15	unidades	\$ 7,64
Tips c/filtro de 200 µL	-	\$ 510,00	1000	unidades	\$ 0,51	100	unidades	\$ 51,00
Tips c/filtro de 1000 µL	-	\$ 456,35	1000	unidades	\$ 0,46	1	unidades	\$ 0,46
stock virus p/curva	-	\$ 6.507,13	1500	microlitros	\$ 4,34	1	microlitros	\$ 4,34
ROX reference Dye	-	\$ 603,40	500	microlitros	\$ 1,21	4	microlitros	\$ 4,83
Syber Green	\$ 600,00	\$ 3.780,00	1000	microlitros	\$ 3,78	0,5	microlitros	\$ 1,89
BSA	\$ 80,00	\$ 504,00	100000	microlitros	\$ 0,0050	16,25	microlitros	\$ 0,0819
dNTPS 100mM c/u	-	\$ 2.367,60	100	microlitros	\$ 23,68	1,95	microlitros	\$ 46,17
Primer Forward 100 µM	\$ 16,00	\$ 100,80	100	microlitros	\$ 1,01	6,5	microlitros	\$ 6,55
Primer Reverse 100 µM	\$ 16,00	\$ 100,80	100	microlitros	\$ 1,01	6,5	microlitros	\$ 6,55
TAQ Platinum	-	\$ 2.286,30	500	Und. Enz.	\$ 4,57	65	Und. Enz.	\$ 297,22
H2O	-	\$ 10,00	500000	microlitros	\$ 0,00002	1060	microlitros	\$ 0,02120
Subtotal 3								\$ 509,49

- **Und. Enz significa Unidades Enzimáticas**

Etapa: Genotipificación

Material	Precio en dólares	Precio en pesos	Unidades de venta		Precio unitario	Cantidad por tubo		Cantidad x 12 tubos		Costo
dNTPS 100mM c/u	-	\$ 2.367,60	100	microlitros	\$ 23,676	0,2	microlitros	2,4	microlitros	\$ 56,82
Primer Forward 100 µM	\$ 16,00	\$ 100,80	100	microlitros	\$ 1,008	0,4	microlitros	4,8	microlitros	\$ 4,84
Primer Reverse 100 µM	\$ 16,00	\$ 100,80	100	microlitros	\$ 1,008	0,4	microlitros	4,8	microlitros	\$ 4,84
TAQ	-	\$ 505,60	500	Und. Enz.	\$ 1,011	5	Und. Enz.	60	Und. Enz.	\$ 60,67
H2O	-	\$ 10,00	500000	microlitros	\$ 0,000	60	microlitros	720	microlitros	\$ 0,01
Tips c/filtro de 1000 µL	-	\$ 566,00	1000	unidades	\$ 0,566	-	unidades	1	unidades	\$ 0,57
Tips c/filtro de 20 µL	-	\$ 509,00	1000	unidades	\$ 0,509	-	unidades	11	unidades	\$ 5,60
Tips c/filtro de 200 µL	-	\$ 510,00	1000	unidades	\$ 0,510	-	unidades	14	unidades	\$ 7,14
Tips s/ filtro de 200 µL	-	\$ 62,82	1000	unidades	\$ 0,063	1	unidades	12	unidades	\$ 0,75
Microtubos de 0,5 ml	-	\$ 346,27	1000	unidades	\$ 0,346	1	unidades	12	unidades	\$ 4,16
Tubos Eppendorf 1,5 ml	-	\$ 75,00	500	unidades	\$ 0,150	-	unidades	1	unidades	\$ 0,15
Loading Buffer 10x	\$ 91,40	\$ 575,82	1000	microlitros	\$ 0,576	5,5	microlitros	66	microlitros	\$ 38,00
\$ 183,55										

Material	Precio en dólares	Precio en pesos	Unidades de venta		Precio unitario	Cantidad por gel		Costo
Buffer TAE 10x	\$ 110,00	\$ 693,00	1000	mililitros	\$ 0,693	70	mililitros	\$ 48,510
Agarosa	\$ 473,00	\$ 2.979,90	500	gramos	\$ 5,960	1,2	gramos	\$ 7,152
Bromuro Etidio	\$ 120,00	\$ 756,00	10000	microlitros	\$ 0,076	6	microlitros	\$ 0,454
1 Kb Plus Dna ladder	\$ 308,00	\$ 1.940,40	250	microgramos	\$ 7,762	1	microgramos	\$ 7,762
\$ 63,877								

Subtotal PCR X 7 muestra	\$ 247,43
Subtotal PCR X 1 muestra	\$ 35,35

Se analizan todas las muestras al mismo tiempo y se siembran en el mismo gel.

Se analizan por 9 muestras + controles positivos y negativos (12 reacciones = 12 tubos c/u de 100 ul finales). En cada calle del gel se siembran 50 ul del producto de PCR.

- El kit de clonaje contiene todo lo necesario para realizar el procedimiento (menos la ampicilina)

ns= no significativo

Material	Precio en dólares	Precio en pesos	Unidades de venta	Precio unitario	Cantidad por muestra	Costo por muestra
Subtotal PCR X 1 muestra	-	-	-	-	-	\$ 35,35
Quick A-Quick Gel Extraction Kit	-	\$ 3.173,32	250	purificaciones	1	\$ 12,69
Cloning Kit (pCR4-Topo)	-	\$ 2.434,00	10	viales	1	\$ 243,40
Ampicilina	-	\$ 1.736,35	100	gramos	ns	-
RNAsa	\$ 63,00	\$ 396,90	250	Und. Enz.	ns	-
Enzima EcoRI	\$ 55,00	\$ 346,50	10000	Und. Enz.	ns	-
BSA	\$ 80,00	\$ 504,00	100000	microlitros	ns	-
Miniprep	-	\$ 10,00	1	purificacion	4	40
Servicio de Secuenciacion	\$ 10,00	\$ 63,00	1	secuencia	2	\$ 126,00
Total Genotipif.						\$ 457,44

Costo de Mano de Obra (MO)

Mano de Obra	Sueldo (\$/mes)	HH/mes	Costo por HH (\$/HH)	HH totales investigación	Costo MO
Cantidad = 1	7069	198	35,70	216	\$ 7.711,64

- HH = Horas hombre

Resumen Final

Etapa	Costo por muestra	Cantidad de muestras	Costo Reactivos
Infeccion	\$ 345,30	9	\$ 3.107,71
Purificación ADN	\$ 356,43	9	\$ 3.207,90
Real-time PCR	\$ 509,49	9	\$ 4.585,42
Costo puesta a punto PCR	-	-	\$ 178,32
Genotipificación	\$ 457,44	9	\$ 4.116,96
Total	\$ 1.668,67	-	\$ 15.196,32

Costo Reactivos	\$ 15.196,32
Costo Mano de Obra	\$ 7.711,64
Costo Total	\$ 22.907,96

Análisis de replicación y Genotipificación de una muestra (*)	\$ 1.668,67
--	--------------------

*Sin tener en cuenta la puesta a punto

Discusión

El sistema utilizado en este trabajo (*ex vivo*) para la valoración de la replicación viral en muestras de tumores propone un modelo más acertado para estudiar la efectividad de esta nueva viroterapia, de modo de acortar el camino entre la investigación básica y la investigación clínica. Por otra parte, el modelo más utilizado actualmente para evaluar la eficacia terapéutica y toxicidad de un CRAd consiste en la implantación de células de cáncer humano en ratones “nude”. Este modelo adolece del hecho de que los CRAds replican casi exclusivamente en células humanas por lo que su efecto sobre el tejido murino resulta difícil de evaluar [57]. Es por ello que se han diseñado nuevos sistemas que permiten la evaluación *ex vivo* de la capacidad oncolítica de los CRAds. Este nuevo sistema utiliza secciones de tumores humanos primarios así como también de diferentes órganos para descartar toxicidad en tejidos normales [57-59]. Sin embargo, hay algunas cuestiones que queremos destacar y trataremos a continuación.

En las muestras analizadas en este trabajo podemos observar una clara inclinación a la replicación de los adenovirus oncolíticos en las muestras. Sin embargo, estos resultados no son significativos desde el punto de vista estadístico. Hemos observado que en algunas de las secciones de la muestra tumoral los virus replican notoriamente, mientras que en otras secciones no hay prácticamente replicación. Dado que esta variación no es tan notoria en las muestras de las 5 horas, se podría adjudicar a la heterogeneidad de la replicación viral en las diferentes secciones del tumor. Esta es la principal problemática del sistema y hay que aprender a trabajar con ella, una posibilidad puede ser descartar para el análisis estadístico aquellas secciones de la muestra que no registraron replicación (siempre y cuando el resto de las secciones si lo hagan), asumiendo que se debe a la presencia de tejido sano en la sección.

Los resultados obtenidos sugieren que los CRAds funcionan mejor en muestras de cáncer de ovario, lo cual confirma lo publicado por el grupo previamente, pero contradice en parte la idea que teníamos al comenzar el trabajo en cuanto al comportamiento del CRAd en muestras de cérvix. Suponíamos que la replicación debía ser mayor en tumores de cérvix, debido a que el promotor de SPARC en el vector no está metilado y por lo tanto está activo; y en segundo lugar pensábamos que la interacción con las proteínas E6 y E7 del HPV tendría un efecto potenciador.

En el caso de la única muestra de tumor de endometrio analizada vimos que v4 replicó. Este resultado es alentador para el laboratorio que intentará corroborar esta tendencia con más muestras en los próximos meses.

Por otro lado hemos comprobado por PCR que todas las muestras de cáncer de útero están infectadas con HPV, sin embargo no hemos realizado la genotipificación de las mismas. También detectamos amplificación en una muestra de cáncer de ovario y decidimos secuenciar esta muestra para asegurar que no haya una amplificación inespecífica. Hallamos que esta muestra estaba infectada con el HPV que se encontró en muestras de otros pacientes pero no logramos genotipificar. Necesitaríamos expandir la secuenciación y es algo que estamos haciendo en este momento. Esto podría abrir una nueva ventana de investigación, ya que hasta el momento no se ha descrito una relación etiológica entre el HPV y el cáncer de ovario[60, 61]. Una de las hipótesis que defienden los partidarios de que hay una asociación entre la infección y el cáncer habla del recubrimiento del esperma por HPV que alcanzaría el epitelio ovárico. Posteriormente quedaría atrapado el esperma en un quiste dando lugar al cáncer[61].

Además calculamos que analizar la replicación de ambos virus en una muestra y determinar el genotipo de HPV en la misma cuesta unos \$ 1668,67. En el caso de realizar solo la genotipificación estaríamos hablando de unos \$457,44 más la purificación del ADN que sería de unos \$20 por muestra. Nótese que cuando analizamos los costos calculamos el costo de purificar todas las secciones obtenidas lo cual es necesario para la *real-time* PCR pero para genotipificar nos alcanza con solo una columna de purificación. En total genotipificar un paciente nos saldría aproximadamente \$ 478. En la actualidad en algunos laboratorios de Argentina se está usando un kit que permite detectar infecciones de 2 o más genotipos de HPV en una misma muestra, el precio de lista del mismo es de \$21.171,8 y sirve para 48 muestras⁶. Si bien el Kit es más barato en nuestra investigación no se justificaba su uso para un número tan limitado de muestras, además nuestra metodología tiene menos problemas con las importaciones.

⁶Linear array HPV Genotyping Test [en línea] [consulta 29 nov. 2013]<<http://www.stambouliau.com.ar/posters/El-Linear-Array-HPV-test-Roche-permite-la-deteccion-de-multiples-genotipos-en-la-misma-muestra.pdf>>

Conclusiones

- 1- Los resultados obtenidos en este trabajo no nos permiten asegurar que los CRAds diseñados, previo a este trabajo, en el laboratorio de Instituto Leloir sean eficaces en muestras de pacientes con cáncer de cérvix
- 2- Se debería buscar una forma de lidiar con la heterogeneidad de las muestras para lograr resultados más confiables.
- 3- En cuanto a la PCR para genotipificar HPV, se puso a punto las condiciones de reacción para amplificar la región L1 del genoma del virus y poder determinar el genotipo mediante secuenciación por un precio accesible
- 4- Se detectó infección con HPV en muestras de cáncer de ovario, por consiguiente la posibilidad de encarar nuevas líneas de investigación centrándose en la búsqueda de una relación entre este agente y la enfermedad está asegurada.

Bibliografía

1. Lopez, M.V., et al., *A Tumor-stroma Targeted Oncolytic Adenovirus Replicated in Human Ovary Cancer Samples and Inhibited Growth of Disseminated Solid Tumors in Mice*. Mol Ther, 2012.
2. Munoz, N., *Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence*. J Clin Virol, 2000. **19**(1-2): p. 1-5.
3. Bosch, F.X., et al., *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(11): p. 796-802.
4. E. Shikova, I.T., G. Ganchev, V. Kouseva-Dragneva, *DETECTION AND TYPING OF HUMAN PAPILLOMAVIRUSES BY PCR*. BIOTECHNOL. & BIOTECHNOL. EQ., 2009.
5. Gravitt, P.E., et al., *Improved amplification of genital human papillomaviruses*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(1): p. 357-61.
6. zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 342-50.
7. Steinwaerder, D.S., C.A. Carlson, and A. Lieber, *Human papilloma virus E6 and E7 proteins support DNA replication of adenoviruses deleted for the E1A and E1B genes*. Mol Ther, 2001. **4**(3): p. 211-6.
8. Wang, H., et al., *Potentiation of tumor radiotherapy by a radiation-inducible oncolytic and oncoapoptotic adenovirus in cervical cancer xenografts*. Int J Cancer, 2012. **130**(2): p. 443-53.
9. Li, W.Y., et al., *Growth suppression effects of recombinant adenovirus expressing human lactoferrin on cervical cancer in vitro and in vivo*. Cancer Biother Radiopharm, 2011. **26**(4): p. 477-83.
10. Jemal, A., et al., *Cancer Statistics, 2010*. CA Cancer J Clin.

11. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.
12. Matthews, K.S., R.D. Alvarez, and D.T. Curiel, *Advancements in adenoviral based virotherapy for ovarian cancer*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009. **61**(10): p. 836-841.
13. Riman, T., S. Nilsson, and I.R. Persson, *Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2004. **83**(9): p. 783-95.
14. Kim, K.H., et al., *A New Generation of Serotype Chimeric Infectivity-Enhanced Conditionally Replicative Adenovirals: The Safety Profile of Ad5/3-Delta24 in Advance of a Phase I Clinical Trial in Ovarian Cancer Patients*. Hum Gene Ther, 2011.
15. Darcy, K.M. and R.J. Schilder, *Relevant molecular markers and targets*. Gynecol Oncol, 2006. **103**(2 Suppl 1): p. S6-S13.
16. Vasey, P.A., et al., *Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2002. **20**(6): p. 1562-9.
17. Galanis, E., et al., *Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(3): p. 875-82.
18. Kimball, K.J., et al., *A Phase I Study of a Tropism-Modified Conditionally Replicative Adenovirus for Recurrent Malignant Gynecologic Diseases*. Clinical Cancer Research, 2010. **16**(21): p. 5277-5287.
19. Kim, K.H., et al., *A phase I clinical trial of Ad5/3-Delta24, a novel serotype-chimeric, infectivity-enhanced, conditionally-replicative adenovirus (CRAAd), in patients with recurrent ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2013. **130**(3): p. 518-24.

20. Albini, A. and M.B. Sporn, *The tumour microenvironment as a target for chemoprevention*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(2): p. 139-47.
21. Sugimoto, H., et al., *Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(12): p. 1640-6.
22. Ronnov-Jessen, L., O.W. Petersen, and M.J. Bissell, *Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction*. Physiol Rev, 1996. **76**(1): p. 69-125.
23. Chlenski, A., et al., *SPARC enhances tumor stroma formation and prevents fibroblast activation*. Oncogene, 2007. **26**(31): p. 4513-22.
24. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
25. Vaha-Koskela, M.J., J.E. Heikkila, and A.E. Hinkkanen, *Oncolytic viruses in cancer therapy*. Cancer Lett, 2007. **254**(2): p. 178-216.
26. Mathis, J.M., M.A. Stoff-Khalili, and D.T. Curiel, *Oncolytic adenoviruses - selective retargeting to tumor cells*. Oncogene, 2005. **24**(52): p. 7775-91.
27. Hardcastle, J., et al., *Oncolytic viruses driven by tumor-specific promoters*. Curr Cancer Drug Targets, 2007. **7**(2): p. 181-9.
28. Podhajcer, O.L., M.V. Lopez, and G. Mazzolini, *Cytokine gene transfer for cancer therapy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007.
29. Rivera, A.A., et al., *Combining high selectivity of replication with fiber chimerism for effective adenoviral oncolysis of CAR-negative melanoma cells*. Gene Ther, 2004. **11**(23): p. 1694-702.
30. Kanerva, A. and A. Hemminki, *Adenoviruses for treatment of cancer*. Ann Med, 2005. **37**(1): p. 33-43.
31. Hedley, S.J., et al., *Targeted and shielded adenovectors for cancer therapy*. Cancer Immunol Immunother, 2006.

32. Alemany, R., *Cancer selective adenoviruses*. Mol Aspects Med, 2007. **28**(1): p. 42-58.
33. Baird, S.K., et al., *Oncolytic adenoviral mutants induce a novel mode of programmed cell death in ovarian cancer*. Oncogene, 2008. **27**(22): p. 3081-90.
34. Nabel, G.J., *Development of optimized vectors for gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 324-6.
35. Hernandez-Alcoceba, R., et al., *Evaluation of a new dual-specificity promoter for selective induction of apoptosis in breast cancer cells*. Cancer Gene Ther, 2001. **8**(4): p. 298-307.
36. Greco, O., et al., *Novel chimeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation*. Gene Ther, 2002. **9**(20): p. 1403-11.
37. Modlich, U., C.W. Pugh, and R. Bicknell, *Increasing endothelial cell specific expression by the use of heterologous hypoxic and cytokine-inducible enhancers*. Gene Ther, 2000. **7**(10): p. 896-902.
38. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. Cell, 2002. **109** Suppl: p. S81-96.
39. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
40. Parrott, J.A., et al., *Stromal-epithelial interactions in the progression of ovarian cancer: influence and source of tumor stromal cells*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **175**(1-2): p. 29-39.
41. Hornby, A.E., J. Pan, and N. Auersperg, *Intermediate filaments in rat ovarian surface epithelial cells: changes with neoplastic progression in culture*. Biochem Cell Biol, 1992. **70**(1): p. 16-25.
42. Ledda, F., et al., *The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma*. J Invest Dermatol, 1997. **108**(2): p. 210-4.

43. Rumpler, G., et al., *Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes*. *Exp Dermatol*, 2003. **12**(6): p. 761-71.
44. Clark, C.J. and E.H. Sage, *A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment-Where there's SPARC, there's fire*. *J Cell Biochem*, 2008.
45. Podhajcer, O.L., et al., *The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host*. *Cancer Metastasis Rev*, 2008.
46. Infante, J.R., et al., *Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(3): p. 319-25.
47. Kato, Y., et al., *Induction of SPARC by VEGF in Human Vascular Endothelial Cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001. **287**(2): p. 422-426.
48. Paley, P.J., et al., *Alterations in SPARC and VEGF immunoreactivity in epithelial ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2000. **78**(3 Pt 1): p. 336-41.
49. Kobel, M., et al., *Biomarker Expression in Pelvic High-grade Serous Carcinoma: Comparison of Ovarian and Omental Sites*. *Int J Gynecol Pathol*, 2011.
50. Brown, T.J., et al., *Activation of SPARC expression in reactive stroma associated with human epithelial ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 1999. **75**(1): p. 25-33.
51. Socha, M.J., et al., *Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer*. *Neoplasia*, 2009. **11**(2): p. 126-35.
52. Lopez, M.V.n., et al., *Tumor Associated Stromal Cells Play a Critical Role on the Outcome of the Oncolytic Efficacy of Conditionally Replicative Adenoviruses*. *PLoS ONE*, 2009. **4**(4): p. e5119.
53. Yamamoto, M., et al., *Infectivity enhanced, cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicative adenovirus for pancreatic cancer*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(4): p. 1203-18.

54. Lorenz, T.C., *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies*. J Vis Exp, 2012(63): p. e3998.
55. Deepak, S., et al., *Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes*. Curr Genomics, 2007. **8**(4): p. 234-51.
56. Viale, D.L., et al., *Therapeutic improvement of a stroma-targeted CRAd by incorporating motives responsive to melanoma microenvironment*. J Invest Dermatol, 2013.
57. Kirby, T.O., et al., *A novel ex vivo model system for evaluation of conditionally replicative adenoviruses therapeutic efficacy and toxicity*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8697-703.
58. Rocconi, R.P., et al., *Treatment of ovarian cancer with a novel dual targeted conditionally replicative adenovirus (CRAd)*. Gynecol Oncol, 2007. **105**(1): p. 113-21.
59. Zhu, Z.B., et al., *Targeting lung cancer using an infectivity enhanced CXCR4-CRAd*. Lung Cancer, 2007. **55**(2): p. 145-56.
60. Malisic, E., R. Jankovic, and K. Jakovljevic, *Detection and genotyping of human papillomaviruses and their role in the development of ovarian carcinomas*. Arch Gynecol Obstet, 2012. **286**(3): p. 723-8.
61. Shanmughapriya, S., et al., *Viral and bacterial aetiologies of epithelial ovarian cancer*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012. **31**(9): p. 2311-7.

Anexo A

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada ensayo de *Real-Time* PCR y como lo normalizamos. El número de copias de E4 que utilizaremos en los cálculos posteriores es en realidad un promedio de los valores obtenidos para las dos réplicas técnicas realizadas. Este valor promedio fue dividido por 3 μL (cantidad de templado en cada pocillo de reacción) y luego dividido por la concentración de ADN molde utilizada. El ADN purificado de las muestras fue previamente cuantificado y cuando fue necesario se lo diluyó a concentraciones menores a 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Tabla - Muestra A

Muestra	Réplica N°	Concentración ADN (ng/ μL)	Factor De dilución	ADN diluido (ng/ μL)	Copias E4 promedio	(Copias E4) / 3 μL	E4/ng de ADN
WT 5 hs	1	396,63	0,1	39,66	171678,33	57226,11	1442,81
WT 5 hs	2	0	1	0	50693,48	16897,83	-
WT 5 hs	3	527,54	0,1	52,75	160825,84	53608,61	1016,2
WT 96 hs	1	0	1	0	602229,38	200743,13	-
WT 96 hs	2	372,49	0,1	37,25	834107,63	278035,88	7464,25
WT 96 hs	3	407,6	0,1	40,76	2168621	722873,67	17734,88
v1 5 hs	1	178,77	0,2	35,75	Sin determinar (Error)	-	-
v1 5 hs	2	217,52	0,2	43,5	42910,3	14303,43	328,78
v1 5 hs	3	0	1	0	35204,53	11734,84	-
v1 96 hs	1	443,31	0,1	44,33	49255,23	16418,41	370,36
v1 96 hs	2	233,57	0,2	46,71	212498,34	70832,78	1516,31
v1 96 hs	3	386,56	0,1	38,66	914727,25	304909,08	7887,76
v4 5 hs	1	220,65	0,2	44,13	22505,16	7501,72	169,99
v4 5 hs	2	371,51	0,1	37,15	60258,22	20086,07	540,66
v4 5 hs	3	62,47	1	62,47	27594,49	9198,16	147,24
v4 96 hs	1	146,05	0,2	29,21	707808,88	235936,29	8077,24
v4 96 hs	2	235,96	0,2	47,19	39543,12	13181,04	279,31
v4 96 hs	3	192,27	0,2	38,45	76886,11	25628,7	666,48

Tabla - Muestra B

Muestra	Réplica N°	Concentración ADN (ng/μL)	Factor De dilución	ADN diluido (ng/μL)	Copias E4 promedio	(Copias E4) / 3 μL	E4/ng de ADN
v4 5 hs	1	143,31	0,2	28,66	14479,25	4826,42	168,39
v4 5 hs	2	666,1	0,1	66,61	22984,16	7661,39	115,02
v4 5 hs	3	159,51	0,2	31,9	10955,13	3651,71	114,47
v4 96 hs	1	40,53	1	40,53	951856,81	317285,6	7828,41
v4 96 hs	2	281,68	0,2	56,34	339951,66	113317,22	2011,45
v4 96 hs	3	16,2	1	16,2	656122,63	218707,54	13500,47

Tabla - Muestra C

Muestra	Réplica N°	Concentración ADN (ng/μL)	Factor De dilución	ADN diluido (ng/μL)	Copias E4 promedio	(Copias E4) / 3 μL	E4/ng de ADN
WT 5 hs	1	475,9	0,1	47,59	55313,76	18437,92	387,43
WT 5 hs	2	253,08	0,2	50,62	103953,34	34651,11	684,59
WT 5 hs	3	336,53	0,2	67,31	92763,05	30921,02	459,41
v1 5 hs	1	75,36	1	75,36	226212,19	75404,06	1000,58
v1 5 hs	2	454,93	0,1	45,49	71791,5	23930,5	526,03
v1 5 hs	3	231,03	0,2	46,21	89492,02	29830,67	645,6
WT 96 hs	1	25,46	1	25,46	325876,94	108625,65	4266,52
WT 96 hs	2	37,07	1	37,07	1521251	507083,67	13679,08
WT 96 hs	3	29,37	1	29,37	1132116,9	377372,29	12848,9
v1 96 hs	1	653,17	0,1	65,32	39505,91	13168,64	201,61
v1 96 hs	2	29,28	1	29,28	382231,38	127410,46	4351,45
v1 96 hs	3	283,12	0,2	56,62	58700,46	19566,82	345,56

Tabla - Muestra D

Muestra	Réplica N°	Concentración ADN (ng/μL)	Factor De dilución	ADN diluido (ng/μL)	Copias E4 promedio	(Copias E4) / 3 μL	E4/ng de ADN
WT 5 hs	1	367,17	0,1	36,72	44843,88	14947,96	407,11
WT 5 hs	2	177,58	0,2	35,52	36542,28	12180,76	342,97
WT 5 hs	3	405,59	0,1	40,56	35993,61	11997,87	295,81
v1 5 hs	1	375,69	0,1	37,57	57338,16	19112,72	508,74
v1 5 hs	2	331,6	0,1	33,16	35531,5	11843,83	357,17
v1 5 hs	3	292,18	0,1	29,22	73889,72	24629,91	842,97
WT 96 hs	1	296,74	0,1	29,67	31255,48	10418,49	351,1

WT 96 hs	2	337,14	0,1	33,71	23723,81	7907,94	234,56
WT 96 hs	3	377,65	0,1	37,77	17605,14	5868,38	155,39
v1 96 hs	1	505,81	0,1	50,58	32655,34	10885,11	215,2
v1 96 hs	2	265,51	0,2	53,1	19845,23	6615,08	124,57
v1 96 hs	3	527,81	0,1	52,78	11500,27	3833,42	72,63
v1 96 hs	4	228,65	0,2	45,73	24789,59	8263,2	180,7
v1 96 hs	5	278,75	0,2	55,75	28606,05	9535,35	171,04
v1 5 hs	4	627,89	0,1	62,79	24553,05	8184,35	130,35

Tabla - Muestra E

Muestra	Réplica N°	Concentración ADN (ng/μL)	Factor De dilución	ADN diluido (ng/μL)	Copias E4 promedio	(Copias E4) / 3 μL	E4/ng de ADN
WT 5 hs	1	60,64	1	60,64	100273,22	33424,41	551,19
WT 5 hs	2	92,89	1	92,89	42425,73	14141,91	152,24
WT 5hs	3	109,55	0,2	21,91	29265,33	9755,11	445,24
v1 5 hs	1	84,81	1	84,81	14977,72	4992,57	58,87
v1 5 hs	2	94,78	1	94,78	7129,42	2376,47	25,07
v1 5 hs	3	111,09	0,2	22,22	14806,05	4935,35	222,13
WT 96 hs	1	47,81	1	47,81	9573,16	3191,05	66,74
WT 96 hs	2	51,26	1	51,26	50033,91	16677,97	325,36
WT 96 hs	3	82,02	1	82,02	10341,4	3447,13	42,03
v1 96 hs	1	103,97	0,2	20,79	3629,58	1209,86	58,18
v1 96 hs	2	46,45	1	46,45	13062,13	4354,04	93,74
v1 96 hs	3	116,17	0,2	23,23	2220,29	740,1	31,85

Tabla - Muestra F (Anexo)

Muestra	Réplica N°	Concentración ADN (ng/μL)	Factor De dilución	ADN diluido (ng/μL)	Copias E4 promedio	(Copias E4) / 3 μL	E4/ng de ADN
WT 5 hs	1	49,69	1,00	49,69	48599,50	16199,83	326,02
WT 5 hs	2	52,77	1,00	52,77	204375,69	68125,23	1290,98
WT 5 hs	3	47,10	1,00	47,10	158734,09	52911,36	1123,38
WT 96 hs	1	28,85	1,00	28,85	97112,22	32370,74	1122,04
WT 96 hs	2	31,14	1,00	31,14	62888,40	20962,80	673,18
WT 96 hs	3	39,85	1,00	39,85	1050692,13	350230,71	8788,73
v1 5 hs	1	44,70	1,00	44,70	176849,02	58949,67	1318,78
v1 5 hs	2	49,74	1,00	49,74	129766,70	43255,57	869,63
v1 5 hs	3	43,34	1,00	43,34	128206,07	42735,36	986,05
v1 96 hs	1	26,19	1,00	26,19	109243,48	36414,49	1390,40

v1 96 hs	2	11,40	1,00	11,40	52799,27	17599,76	1543,84
v1 96 hs	3	38,77	1,00	38,77	74162,36	24720,79	637,63
v4 5 hs	1	38,25	1,00	38,25	540362,63	180120,88	4709,04
v4 5 hs	2	38,39	1,00	38,39	438998,38	146332,79	3811,74
v4 5 hs	3	29,87	1,00	29,87	201318,28	67106,09	2246,61
v4 96 hs	1	23,78	1,00	23,78	75488,28	25162,76	1058,15
v4 96 hs	2	3,78	1,00	3,78	254359,34	84786,45	22430,28
v4 96 hs	3	37,57	1,00	37,57	99080,98	33026,99	879,08

Tabla - Muestra F (Ovario)

Muestra	Réplica N°	Concentración ADN (ng/μL)	Factor De dilución	ADN diluido (ng/μL)	Copias E4 promedio	(Copias E4) / 3 μL	E4/ng de ADN
WT 5 hs	1	304,71	0,20	60,94	33335,32	11111,77	182,33
WT 5 hs	2	79,42	1,00	79,42	146088,22	48696,07	613,15
WT 5 hs	3	60,43	1,00	60,43	103316,52	34438,84	569,90
WT 96 hs	1	116,00	0,20	23,20	209151,83	69717,28	3005,06
WT 96 hs	2	101,07	1,00	101,07	194558,38	64852,79	641,66
WT 96 hs	3	83,49	1,00	83,49	843489,25	281163,08	3367,63
v1 5 hs	1	67,96	1,00	67,96	131855,56	43951,85	646,73
v1 5 hs	2	50,69	1,00	50,69	140188,97	46729,66	921,87
v1 5 hs	3	57,26	1,00	57,26	110199,08	36733,03	641,51
v1 96 hs	1	317,16	0,20	63,43	94002,34	31334,11	493,98
v1 96 hs	2	47,45	1,00	47,45	1342661,50	447553,83	9432,11
v1 96 hs	3	157,46	0,20	31,49	413231,59	137743,86	4373,93
v4 5 hs	1	95,57	1,00	95,57	111131,83	37043,94	387,61
v4 5 hs	2	69,56	1,00	69,56	114084,13	38028,04	546,69
v4 5 hs	3	165,11	0,20	33,02	53638,93	17879,64	541,45
v4 96 hs	1	207,98	0,20	41,60	169712,50	56570,83	1360,01
v4 96 hs	2	134,16	0,20	26,83	164843,38	54947,79	2047,85
v4 96 hs	3	120,07	0,20	24,01	126424,86	42141,62	1754,88

Tabla - Muestra G

Muestra	Réplica N°	Concentración ADN (ng/μL)	Factor De dilución	ADN diluido (ng/μL)	Copias E4 promedio	(Copias E4) / 3 μL	E4/ng de ADN
WT 5 hs	1	291	0,2	58,2	78753,44	26251,15	451,05
WT 5 hs	2	748,68	0,1	74,87	173232,14	57744,05	771,28
WT 5 hs	3	445,07	0,1	44,51	257812,94	85937,65	1930,88
WT 5 hs	4	167,2	0,2	33,44	173490,17	57830,06	1729,37
WT 96 hs	1	293,79	0,2	58,76	78678,42	26226,14	446,34

WT 96 hs	2	575,33	0,1	57,53	268368,91	89456,3	1554,87
WT 96 hs	3	479,87	0,1	47,99	145639,52	48546,51	1011,66
WT 96 hs	4	503,67	0,1	50,37	111067,23	37022,41	735,05
v1 5 hs	1	469,91	0,1	46,99	74121,94	24707,31	525,79
v1 5 hs	2	95,4	1	95,4	106978,76	35659,59	373,79
v1 5 hs	3	146,67	0,2	29,33	33909,36	11303,12	385,32
v1 5 hs	4	264,84	0,2	52,97	55399,67	18466,56	348,64
v1 96 hs	1	364,96	0,1	36,5	32793,27	10931,09	299,51
v1 96 hs	2	405,44	0,1	40,54	44931,46	14977,15	369,4
v1 96 hs	3	532,95	0,1	53,3	16455,32	5485,11	102,92
v1 96 hs	4	727,18	0,1	72,72	25317,62	8439,21	116,05
v4 5 hs	1	196,34	0,2	39,27	81545,26	27181,75	692,21
v4 5 hs	2	329,43	0,1	32,94	104347,56	34782,52	1055,84
v4 5 hs	3	898,54	0,1	89,85	55290,38	18430,13	205,11
v4 5 hs	4	491,56	0,1	49,16	46967,23	15655,74	318,49
v4 96 hs	1	591,93	0,1	59,19	38374,77	12791,59	216,1
v4 96 hs	2	361,62	0,1	36,16	11875,21	3958,4	109,46
v4 96 hs	3	425,4	0,1	42,54	29939,7	9979,9	234,6
v4 96 hs	4	968,28	0,1	96,83	20280,88	6760,29	69,82

Tabla - Muestra H

Muestra	Réplica N°	Concentración ADN (ng/μL)	Factor De dilución	ADN diluido (ng/μL)	Copias E4 promedio	(Copias E4) / 3 μL	E4/ng de ADN
WT 5 hs	1	302,32	0,2	60,46	42986,73	14328,91	236,98
WT 5 hs	2	294,32	0,2	58,86	54789,96	18263,32	310,26
WT 5 hs	3	305,27	0,2	61,05	51992,45	17330,82	283,86
v1 5 hs	1	353,98	0,1	35,4	19431,74	6477,25	182,98
v1 5 hs	2	296,78	0,2	59,36	32052,66	10684,22	180
v1 5 hs	3	460,58	0,1	46,06	14016,72	4672,24	101,44
WT 96 hs	1	82,4	1	82,4	2366614	788871,33	9573,68
WT 96 hs	2	62,35	1	62,35	1795013,8	598337,92	9596,44
WT 96 hs	3	114,62	0,2	22,92	329237,66	109745,89	4787,38
v1 96 hs	1	54,59	1	54,59	454411,13	151470,38	2774,69
v1 96 hs	2	81,96	1	81,96	28047,36	9349,12	114,07
v1 96 hs	3	56,21	1	56,21	126835,27	42278,42	752,15

Tabla - Muestra I

Muestra	Réplica N°	Concentración ADN (ng/μL)	Factor De dilución	ADN diluido (ng/μL)	Copias E4 promedio	(Copias E4) / 3 μL	E4/ng de ADN
WT 5 hs	1	189,44	0,20	37,89	77907,86	25969,29	685,42
WT 5 hs	2	389,05	0,10	38,91	94308,39	31436,13	808,02
WT 5 hs	3	446,18	0,10	44,62	485424,75	161808,25	3626,52
WT 5 hs	4	47,73	1,00	47,73	180185,81	60061,94	1258,37
WT 72 hs	1	178,25	0,20	35,65	685652,69	228550,90	6410,96
WT 72 hs	2	280,23	0,10	28,02	447126,75	149042,25	5318,57
WT 72 hs	3	172,77	0,20	34,55	1677532,75	559177,58	16182,72
WT 72 hs	4	383,79	0,10	38,38	136429,63	45476,54	1184,93
WT 72 hs	5	254,98	0,20	51,00	60429,91	20143,30	395,00
WT 72 hs	6	439,58	0,10	43,96	4625,33	1541,78	35,07
v4 5 hs	1	57,19	1,00	57,19	102385,71	34128,57	596,76
v4 5 hs	2	202,50	0,20	40,50	168132,13	56044,04	1383,80
v4 5 hs	3	788,60	0,10	78,86	78643,64	26214,55	332,42
v4 5 hs	4	511,55	0,10	51,16	72411,70	24137,23	471,85
v4 72 hs	1	192,61	0,20	38,52	257144,38	85714,79	2225,09
v4 72 hs	2	446,48	0,10	44,65	38129,13	12709,71	284,66
v4 72 hs	3	224,54	0,20	44,91	2534803,25	844934,42	18814,79
v4 72 hs	4	1217,17	0,05	60,86	30576,24	10192,08	167,47
v4 72 hs	5	524,80	0,10	52,48	101477,52	33825,84	644,55
v4 72 hs	6	745,74	0,10	74,57	325124,53	108374,84	1453,25

Anexo B:

Secuencias de L1 de los tipos de HPV de Alto riesgo

HPV-16 L1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY177679.1>

```
atgtctcttt ggctgcctag tgaggccact gtctacttgc ctctctgtccc agtatctaag
gttgaagca cggatgaata tgttgacgc acaaacatat attatcatgc agggacatcc
agactacttg cagttggaca tccctatfff cctattaataa aacctaaca taacaaaata
ttagttccta agtatcagg attacaatac agggatatta gaatacattt acctgacccc
aataagtttg gttttcctga cacctcattt tataatccag atacacagcg gctggtttgg
gcctgtgtag gtgttgagg aggccgtgg cagccattag gtgtgggcat tagtggccat
cctttattaa ataaattgga tgacacagaa aatgctagt cttatgcagc aaatgcagg
gtggataata gagaatgtat atctatggat tacaacaaaa cacaattgtg ttaattggg
tgcaaacac ctatagggga aactggggc aaaggatccc catgtacca tgttgagta
aatccagggt attgtccacc attagagtta ataacacag ttattcagga tggatgatg
gttgatactg gctttgggtg tatggacttt actacattac aggctaaca aagtgaagt
ccactggata tttgtacatc tttttgaaa tatccagatt atattaaaaa ggtgtcagaa
ccatagggc acagcttatt tttttattta cggagggaa aaatgttgt tagacattta
ttaaataagg cttggtgctgt tggtgaaaat gtaccagacg atttatacat taaaggctct
gggtctactg caaatttagc cagttcaaat ttttttcta cacctagtgg ttctatgggt
acctctgatg ccaaatatt caataaacct tattggttac aacgagcaca gggccacaat
aatggcattt gttggggtaa ccaactattt gtactggtt tgatactac acgcagtaca
aataatgcat tatgtgctgc catatctact tcagaaaacta catataaaaa tactaacttt
aaggagtacc tacgacatgg ggaggaatac gatttacagt ttatttttca actgtgcaa
ataaccttaa ctgcagacgt tatgacatac atacattcta tgaattccac tttttggag
gactggaatt ttggtctaca acctccccca ggaggcacac tagaagatac ttataggtt
gtaacatccc aggcaattgc ttgtcaaaaa catacacctc cagcacctaa agaagatccc
cttaaaaaat aactttttg ggaagtaaat ttaaaggaaa agttttctgc agacctagat
cagtttctct taggacgcaa atttttacta caagcaggat tgaaggccaa accaaaattt
acattaggaa aacgaaaagc tacaccacc acctcatcta cctctacaac tgctaaacgc
aaaaaacgta agctgtaa
```

HPV-18: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KC456642.1>

```
atgtgcctgt atacacgggt cctgatatta cattaccatc tactacctct gtatggccca
ttgtatcacc cacagcccct gcctctacac agtatattgg tatacatggg acacattatt
atgtgtggcc attatattat tttattccta agaaacgtaa acgtgttccc ttttttttg
cagatggctt tgtggcggc tagtgacaat accgtatata tccacctcc ttttgggca
agattgtaa ataccgatg ttagtgact cgcacaagca tttttatca tgcggcagc
ttagattat taactggttg taatccatat ttaggggttc ctgcagggtg tggcaataag
caggatattc ctaaggtttc tgcatacca tatagagtat ttaggggtgca gttacctgac
ccaaataaat ttggtttacc tgatactagt atttataatc ctgaaacaca acgtttagt
tgccctgtg ctggagtggg aatggccctg ggtcagcctt taggtgttgg ccttagtggg
catccatttt ataataaatt agatgacact gaaagttccc cagccgccac gtctaattgt
tctgaggacg ttagggacaa tgggtctgta gattataagc agacacagtt atgtattttg
ggctgtgccc ctgctatttg ggaacactgg gctaaaggca ctgcttgtaa atcgcgtcct
ttatcacagg gcgattgccc ccttttagaa cttaaaaaca cagttttgga agatgggtgat
atggtagata ctggatatgg tgccatggac ttagtagcat tgcaagatac taaatgtgag
gtaccattgg atatttgcga gtctatttgt aaatatcctg attatttaca aatgtctgca
gatccttatg gggattccat gtttttttgc ttacggcgtg agcagctttt tgctaggcat
ttttggaata gagcaggatc tatgggtgac actgtgcctc aatccttata tattaaggc
acaggtatgc gtgcttcacc tggcagctgt gtgtattctc cctctccaag tggctctatt
gttaacctct actcccagtt gtttaataaa ccatattggg tacataaggc acagggctcat
aacaatgggt tttgctggca taatcaatta tttgttactg tggtagatac cactcccagt
accaatttaa caatatgtgc ttctacacag tctcctgtac ctgggcaata tgatgctacc
aaatttaagc agtatagcag acatggtgag gaatatgatt tgcagtttat ttttcagttg
tgtactatta ctttaactgc agatggtatg tccatatttc atagtatgaa tagcagttat
```

```

ttagaggatt ggaactttgg tgttcccccc cccccaacta ctagttttggg ggatacatat
cgttttgtac aatctggtgc tattacctgt caaaaggatg ctgcaccggc tgaaaataag
gatccctatg ataagttaaa gttttggaat gtggatttaa aggaaaagtt ttctttagac
ttagatcaat atccccttgg acgtaaattt ttggttcagg ctggattgcg tcgcaagccc
accataggcc ctgcgaaacg ttctgctcca tctgccacta cgtcttctaa acctgccaag
cgtgtgcgty tacgtgccag gaagtaa
    
```

HPV-35: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/GQ479039.1>

```

atgtctctgt ggcggctctaa cgaagccact gtctacctgc ctccagtgtc agtgtctaag
gttgtagca ctgatgaata tgtaacacgc acaaacatct actatcatgc aggcagttct
aggctattag ctgtgggtca cccatactat gctattaaaa aacaagattc taataaaata
gcagtaccca aggtatctgg tttgcaatac agagtattta gagtataaatt accagatcct
aataagtttg gatttccaga cacatcattt tatgatcctg cctcccagcg tttagtttgg
gcctgtacag gattgaagt aggtcgtggg cagccattag gtgtaggtat tagtggctat
cctttattaa ataaattgga tgatactgaa aattctaata aatatgttgg taactctggt
acagataaca gggaatgcat ttctatggat tataaacaaa cacaattgtg tttaataggt
tgtaggcctc ctataggtga acattgggga aaaggcacac cttgtaatgc taaccaggta
aaagcaggag aatgtcctcc tttggagtta ctaaacactg tactacaaga cggggacatg
gtagacacag gatttgggtgc aatggatttt actacattac aagctaataa aagtgatgtt
ccctagata tatgcagttc catttgcaaa tatcctgatt atctaaaaat ggtttctgag
ccatatggcg atatgttatt tttttattta cgtagagagc aaatgtttgt tagacattta
tttaaataggg ctggaactgt aggtgaaaca gtacctgcag acctatataat taagggtagc
actggcacat tgcctagtag tagttatttt cctactocta gtggctctat ggtaacctca
gatgcacaaa tatttaataa acctatattg ttgcaacgtg cacaaggcca taataatggt
atltgttggg gtaaccaatt gtttgttact gtagtgtgata caaccctgtag tacaatatg
tctgtgtgtt ctgctgtgtc tactagtgac agtacatata aaaaatgaca ttttaaggaa
tatttaagcc atgttgaaga atatgattta cagtttattt ttcagttatg taaaataaca
ctaacagcag atgttatgac atatatctat agtatgaacc cgtccatttt agaggattgg
aatlttggcc ttacaccacc gccttctggt accttagagg acacatatcg ctatgtaaca
tcacaggctg taacttgtca aaaaccaggt gcaccaaaac ctaaagatga tccattaaaa
aattatactt tttgggaggt tgatttaag gaaaagtttt ctgcagactt agatcaattt
cgttggggcc gtaaattttt gttacaagca ggactaaagg ccaggcctaa ttttagatta
ggcaagcgtg cagctccagc atctacatct aaaaaatctt ctactaaacg tagaaaagta
aaaagttaa
    
```

HPV-33: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/GQ479019.1>

```

atgtccgtgt ggcggcctag tgaggccaca gtgtacctgc ctctgtacc tgmtctaaa
gttgtcagca ctgatgaata tgtgtctcgc acaagcattt attattatgc tggtagttcc
agacttcttg ctgttggcca tccatatttt tctattaaaa atcctaataa cgctaaaaag
ttattggtag ccaaagatc aggttgcaa tatagggttt ttagggctcg tttaccagat
cctaataaat ttggatttcc tgacacctcc ttttataacc ctgatacaca acgattggta
tgggcatgty taggccttga aataggtaga gggcagccat taggcgttgg cataagtggg
catcctttat taacaaatt tgatgacact gaaaccagta acaagtatcc tggacagccg
ggtgctgata ataggggaatg tttatccatg gattataaac aaacacagtt atgtttactt
ggatgtaagc ctccaacagg ggaacattgg ggtaaaggty ttgcttgtac taatgcagca
cctgccaatg attgtccacc tttagaactt ataaatacta ttattgagga tggatgatg
gtggacacag gatttgggtg catggatttt aaaacattgc aggcataata aagtgatgtt
cctattgata ttttgggcat tacatgcaaa tatccagatt atttaaaaat gactagttag
ccttatggty atagtttatt ttttttctt cgacgtgaac aaatgtttgt aagacacttt
tttaaataggg ctggtaaatt aggagaggct gttcccgatg acctgtacat taaaggttca
ggaactactg cctctattca aagcagtgct ttttttccca ctctagtggt atctatggtt
acttccgaat ctcagttatt taataagcca tattggctac aacgtgcaca aggtcataat
aatggatttt gttggggcaa tcaggtattt gttactgtgg tggataccac tcgcagtagt
aatatgactt tatgcacaca agtaactagt gacagtacat ataaaaatga aaattttaaa
gaatatataa gacatgttga agaatatgat ttacagtttg tttttcaact atgcaaagtt
accttaactg cagaagttat gacatatatt catgctatga atccagatat tttagaagat
tggaattttg gtttaacacc tcctccatct gctagttttac aggataccta taggtttggt
    
```

acctctcagg ctattacgtg tcaaaaaaca gtacctccaa aggaaaagga agaccocctta
ggtaaatata cattttggga agtggattta aaggaaaaat tttcagcaga tttagatcag
tttcctttgg gacgcaagtt tttattacag gcaggtotta aagcaaaacc taaacttaaa
cgtgcagccc ccacatccac ccgcacatcg tctgcaaac gcaggaaggt taaaaataa

HPV-45 L2 y L1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/DQ080002.1>

catatgcatg ctttacacac catacaataa ttactataat gtacagtaca gtgtaacata
cctgtgatgt gcatggtggt gtatttttgt atttttgtat ttttgtatth ttgtatthta
tatgtthtaat aaaccatggt atccccacgt gcagcacgtc gcaagcgggc ctctgcaact
gacttatata gaacatgtaa gcaatccggt acgtgcccc ctgatgttat taacaaagt
gaaggcaciaa ccttagctga taaaatttta cagtggctca gccttgggat attttgggt
ggccttggca ttggtaccgg cagtggttct ggaggccgta cgggctatgt acccttaggg
ggcaggtcta atactgttgt ggatggtggc cccactaggc cacctgtggt tattgaacct
gtaggcccta cagatccatc tattgttacg ttggtagagg attccagtgt tgtgocctc
ggtgctocgg ttcccacatt taccggaacc tctgggtttg aaattacgtc ttctggtaact
accacaccag ctgtgttggc catcacacct accgtggact ctgtttctat ttctgcaact
agttttaciaa atcctgcatt ttctgatccc tctattattg aggtgcccc aacaggggag
gtatcaggta atatatthgt tggtagacca acatcgggca gccatggata tgaggaaata
cctttaciaa catttgcac ttctgggtca ggtacgggac ccattagtag taccocctc
cctactgtgc ggcgggtagc gggccccgc ctgtatagta gggctaatac acaggtccgt
gtgtccacct cactgtthtt aacacatccc tcatcgttgg ttacatttga taatccagct
tatgagcccc tggacaccac actatccttt gagcctacca gtaatgttcc tgattccgat
tttatggata ttattcgttt gcataggcca gcattatcct ctgacgtgg cactgttaga
tttagtagat tgggtcaaag ggcaaccatg tttacacgta gtggtaaaca aataggggg
aggtacatt ttaccatga tataagcccc attgctgcta cagaggaaat tgaattgcag
ccttaatta gtgtacaaa tgatagtac ctgtttgatg tatatgcaga cttcccacct
cctgoccca ctacacctg cactatacac aatcattta catatccaaa gtattcctt
accatccctt ctactgtctg atcctcttac agtaaatgta cagtaccatt aacatctgca
tgggatgtac ctatatatac tggcccggac attatattgc catcccatac tcctatgtg
cctagtacat ctctaccaa tgctccacc accacctata taggtattca tggcacacia
tattatttat ggccatggta ttattatttt cctaaaaaac gtaaacgtat tcctatttt
tttgcagatg gctttgtggc ggctagtga cagtacggta tatcttcac caccttctgt
ggccagagtt gtcagcactg atgattatgt gtctgcaca agcatatth atcatgcagg
cagttcccga ttattaactg taggcaatcc atattthagg gttgtacctg atgggagcag
taataaacag gctgttccca aggtatccgc atatcagtat aggggtttha gagtagctt
accgatcct aataaatttg gattacctga ttctactata tataatcctg aacacacag
tttggthtgg gcatgtgtag gtatggaaat tggctgtggg cagcctthtag gtattggcct
aagtggccat ccattttata ataaattgga tgatacagaa agtgctcatg cagctacagc
tgttattacg caggatgtta gggataatgt gtcagttgat tataagcaaa cacagctgtg
tattthagg ttgtacctg ctattggtga gcactgggca aaggcacac tttgtaacc
tgcacaattg caacctggg actgtcctcc tttggaaact aaaaacacca ttattggaga
tgggtgatag gtggatacag gttatggggc aatggatttt agtacattgc aggatacaaa
gtgcgaggtt ccattagaca tttgtcaatc catctgtaaa tatccagatt atttgcaaat
gtctgctgat ccctatgggg attctatgth tttttgcta cgcctggaac aactgthtgc
aagacattht tggaaatagg caggtgttat ggggtgacaca gtacctacgg acctatata
taaaggcact agcgtcaata tgcgtgaaac cctggcagt tgtgtgtatt ccccttctcc
cagtggtcct attattactt ctgattctca attattthaat aagccatatt ggttacataa
ggcccagggc cataacaatg gtatttgttg gcataatcag ttgtttgtta ctgtagtggg
cactaccgc agtactaatt taacattatg tgctctaca caaaatcctg tgccaagtac
atatgaccct actaagthta agcagtatag tagacatgtg gaggaaatg atttacagtt
tattthtcag ttgtgcacta ttactthaac tgcagaggth atgtcatata tccatagtat
gaatagtag atattagaaa attggaatth tgggtgocct ccaccaccta ctacaagtht
ggtggataca tatcgtthtt tgcaatcagt tgctgttacc tgcataaagg atactacacc
tccagaaaag caggatccat atgataaatt aaagthttgg actgthgacc taaaggaaaa
atthtctcc gatttggatc aatatccct tggctgaaag tthttagthc aggtgggtt
acgtcgtagg cctaccatag gacctgtaa gcgtcctgct gcttccacgt ctactgcatc
tactgcatct aggcctgcca aacgtgtacg tatacgtagt aagaaataat atgttag

HPV-52 L1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN874436.1>

```
atggtacaga ttttatttta catcctagtt attttttact acgtcgcagg cgtaaacgtt
ttccatattt ttttacagat gtccgtgtgg cggcctagtg aggccactgt gtacctgcct
cctgtacctg tctctaaggt tgtaagcact gatgagtatg tgtctcgcac aagcatctat
tattatgcag gcagttctcg attactaaca gtaggacatc cctatttttc tattaaaaac
accagtagtg gtaatggtaa aaaagtttta gtccccagg tgtctggcct gcaatacagg
gtatttagaa ttaaattgcc ggaccctaata aaatttggtt tccagatac atctttttat
aaccagaaa cccaaagggt ggtgtgggccc tgtacaggct tggaaatcgg taggggacag
cctttaggty tgggtattag tgggcatcct ttattaaaca agtttgatga tactgaaacc
agtaacaaat atgctggtaa acctggata gataataggg aatgtttatc tatggattat
aagcaaactc agttatgcat ttaggatgc aaacctccta taggtgaaca ttggggtaag
ggaaccctt gtaataataa ttcaggaaat cctggggatt gtctcccct acaactcatt
aacagtgtaa tacaggatgg ggacatggta gatacaggat ttggttgcac ggattttaat
accttgcaag ctagtaaaag tgatgtgccc attgatata gtacagtgat atgtaagtat
ccagattatt tgcaaatggc tagcgagcca tatggtgaca gtttgttctt tttcttaga
cgtgagcaaa tgtttgtag aactttttt aatagggccc gtaccttagg tgacctgtg
ccaggtgatt tatatataca ggggtctaac tctggcaata ctgccactgt acaagcagt
gctttttttc ctactcctag tggttctatg gtaacctcag aatcccatt atttaataaa
ccgtactggt tacaacgtgc gcagggcccac aataatggca tatggtgggg caatcagttg
ttgttcacag ttgtggatac cactcgtagc actaacatga cttatgtgc tgaggtgaaa
aaggaaagca catataaaaa tgaaaatttt aaggaatacc ttcgtcatgg cgaggaattc
gattacaat ttatttttca attgtgcaag attacattaa cagctgatgt tatgacatat
atcataaga tggatgccac ttttttagag gactggcaat ttggccttac cccaccaccg
tctgcatctt tggaggacac atacagattt gtaacttcta ctgctataac ttgtcaaaaa
aacacaccac ctaaaagaaa ggaagatcct ttaaaggact atatgttttg ggaggtggat
ttaaagaaa agttttctgc agatttagat cagtttctt taggtagaaa gtttttgta
caggcagggc tacaggctag gccaaacta aaacgcctg catcatcggc cccacgtacc
tccacaaaaga agaaaaagg taaaaggtaa
```

HPV-31 L1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U37410.1>

```
atgtctctg tggcggccta gcgaggctac tgtctactta ccacctgtcc cagtgtctaa
agttgtaagc acggatgaat atgtaacacg aaccaacata tattatcacg caggcagtgcc
taggctgctt acagtaggcc atccatatta ttccatacct aaactctgaca atcctaaaaa
aatagttgta ccaaagggtg caggattaca atatagggtt tttagggttc gtttaccaga
tccaaacaaa tttggatttc ctgatacatc tttttataat cctgaaactc aacgcttagt
ttgggcctgt ttgggtttag aggtaggctc cgggcagcca ttagggtgtag gtattagtgg
tcatccattg ctaataaaat ttgatgacac tgaaaactct aatagatatg ccggtgggtc
tggcactgat aatagggaat gtatatcaat ggattataaa caaacacagc tgtgtttact
tgggtgcaaa ccacctattg gagagcattg gggtaaagggt agtccttgta gtaataatgc
tattaccctt ggtgattgtc ctccattaga attaaaaaat tcagttatac aagatgggga
tatggttgat acaggctttg gagctatgga ttttactgct ttacaagaca ctaaaagtaa
tgttcctttg gacatttgta attctatttg taaatatcca gattatctta aaatggttgc
tgagccatat ggcgatacat ttttttttta tttacgtagg gaacaaatgt ttgtaagaca
tttttttaat agatcagggc cggttgggtga atcggttcct aatgacttat atattaaagg
ctccggttca acagctactt tagctaacag tacatacttt cctacacctc gcggtccat
ggttacttca gatgcacaaa tttttaataa accatattgg atgcaacgtg ctcagggaca
caataatggt atttggttgg gcaatcagtt atttgttact gtggtagata ccacacgtag
taccaaatag tctgtgtgtg ctgcaattgc aacagtgat actacattta aaagtagtaa
ttttaaagag tatttaagac atggtgagga atttgattta caatttatat ttcagttatg
caaaataaca ttatctgcag acataatgac atatatcac agtatgaatc ctgctatttt
ggaagattgg aattttggat tgaccacacc tccctcaggt tcttttagagg atacctatag
gtttgtaacc tcacaggcca ttacatgtca aaaaactgcc ccccaaaagc ccaaggaaga
tccatttaaa gattatgtat tttgggaggt taatttaaaa gaaaagtgtt ctgcagattt
agatcagttt cactgggtc gcaaattttt attacaggca ggatataggg cacgtcctaa
atntaaagca ggtaaacgta gtgcacctc agcatctacc actacaccag caaaacgtaa
aaaaactaaa aagtaa
```

HPV-51 L1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/259014552>

```
atggcattgt ggcgactaa tgacagcaag gtgtatttgc cacctgcacc tgtgtctcga
attgtgaata cagaagaata tatcacacgc accggcatat attactatgc aggcagttcc
agactaatta cattaggaca tcctatattt ccactaccta aaacctcaac gcgtgctgct
attcctaaag tatctgcatt tcaatacagg gtatttaggg tacagttacc agatcctaac
aagtttgac tcccgatcc aaatttatat aatccagaca cagatagggt ggtgtgggggt
tgtgtggggc ttgaggtagg cagaggacag cccttggtg ttggccttag tggatcatccc
ttatttaata aatatgatga cacagaaaat tcacgcatag caaatggcaa tgcacaacaa
gatgttagag ataacacatc tggtagaac aacagactc agttatgtat aataggctgt
gctccaccta ttggggaaca ctgggggtatt ggcactacat gcaaaaacac acctgtacct
ccaggagact gccccccct ggaacttgta tcctctgtca ttcaggatgg cgatatgatt
gatacagggt ttggagctat ggattttgct gccctacagg ccaccaatc agacgtccct
ttggatattt cacagtctgt ttgtaaatat cctgattatt taaaaatgtc tgcagacaca
tatggtaatt ccatgttttt tcatttacgc agggagcaaa tctttgctag gcactattat
aataaacttg gtagtgttgg ggaagacatt cctaccgatt attatattaa gggtagtgggt
aatggccgtg accctataga aagtatatata tactctgcta ctcccagtggt gctctatgata
acatctgatt ctcaaatatt taataagcct tattggctcc accgtgcgca gggtcacaat
aatggcattt gctggaacaa tcagcttttt attacctgtg ttgatactac cagaagtaca
aatttaacta ttagcactgc cactgctgca gtttcccaa cattactcc aagtaacttt
aagcaatata ttaggcattg ggaagagtat gaattgcaat ttatttttca gtatgtaaa
attactttaa ctacagaggt aatggcttat ttacacacaa tggatcctac cattcttgaa
cagtggaaat ttggattaac attacctcca tctgctagtt tggaggatgc atatagggtt
gttcgaaaatg catctactag ctgtcaaaaag gacaccctc cacaggctaa gccagatcct
ttggccaaat ataaattttg ggatgttgat ttaaaggaac ggttttcttt agatttagac
caatttgcatt tgggtcgaaa gttttgttg caggttggcg tacaacgcaa gccagacca
ggcctaaac gcccggcctc atcagcatcc tcttctctt cctcttcagc caaacgtaaa
cgtgttaaaa agtaa
```

HPV-56 L1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/EF177181.1>

```
atgtg tgggaaacac cattttattc aggtcctgac atgggtgtgc ctacaggccc
cagtacgtgg ccctttgttc ctcagctctc ttatgatgtt acccatgatg tatatataca
gggacctcc ttgcatat ggctgtgta tttttttaga cgtaggcgcc gtaaactgat
tcctatattt ttgcatagtg gcgacgtggc ggctagtgta aaataagggtg tatctacctc
caacacctgt tcaaaagggt gtggcaacgg attcctatgt aaaacgcact agtatatttt
atcatgcagc cagttcacga ttgcttgccg taggacatcc ctattactct tgactaagg
acaataccaa acaaacatt ccaaaagtta gtgcatatca atataagggtt tttagggta
ggttgccga ccctaataag tttgggcttc cagatactaa tatttataat cgggaccagg
aacggttagt gtggcatgt gtaggtttgg aggtaggccg cggacagcct ttaggtgctg
ggctaagtgg ccatccattg ttaataggc tggatgatac tgaagttcc aatttagcaa
ataataatgt tatagaagat agtagggaca atatatcagt tgatggcaag caaacacagt
tgtgtattgt tggatgtact cccgctatgg gtgaacattg gactaaagggt gctgtgtgta
agtcacaca agttaccaca ggggactgcc cgctcttgc attaattaat acacctatag
aggatgggga catgatagac acgggatttg gcgctatgga cttaagggtg ttgcaggaat
ctaaggctga ggtaccttta gacattgtac aatccacctg taaatctct gactatttaa
aaatgtctgc agatgcctat ggtgattcta tgtggtttta cttacgcagg gaacaattat
ttgacagaca ttattttaat agggctggta aagtgggga aacaatacct gcagagttat
atttaaagggt tagcaatggt agagaacccc ctccgagttc tgtatatgtt gctacgccta
gtgggtctat gattacgtct gaggcacagt tatttaataa acctatttg ttgcaacgtg
cccaggcca taataatggc atttgcctgg gtaatacaatt atttgttact gtagtagata
ctactagaag tactaacatg actattagta ctgctacaga acagttaagt aaatatgatg
cacgaaaaat taatcagtac cttagacatg tggaggaata tgaattacaa tttgtttttc
aattatgcaa aattactttg tctgcagagg ttatggcata ttacataat atgaatgcta
acctactgga ggactggaat attgggttat ccccgccagt ggcaccagc ctagaagata
aataatagata tggtagaagc acagctataa catgtcaacg ggaacagcca ccaacagaaa
aacaggacc attagctaaa tataaatttt gggatgttaa cttacaggac agtttttcta
cagacctgga tcaatttcca ctgggtagaa aatttttaat gcaactgggc actagggtcaa
agcctgctgt agctacctct aaaaagcagt ctgctcctac ctccacctct acaccagcaa
aacgtaaaag gcgtag
```

HPV-58: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/HM639717.1>

```

atggtgctga ttttatgctg caccctagct attttatttt gcgtcgcaga cgtaaaccgtt
ttccatattt ttttgcagat gtccgtgtgg cggcctagtg aggcactgt gtacctgcct
cctgtgcctg tgtctaaggt tgtaagcact gatgaatatg tgtcacgcac aagcatttat
tattatgctg gcagttccag acttttggct gttggcaatc catatttttc catcaaaagt
ccaaataaca ataaaaaagt attagttccc aaggtatcag gcttacagta tagggtcttt
aggytgctgt tacctgatcc caataaattt ggttttctctg atacatcttt ttataaccct
gatacacaac gtttggctct ggcatgtgta ggcttgaaa taggtagggg acagccattg
gggttggcg taagtggctc tccttattta aataaatttg atgacctga aaccagtaac
agatatcccg cacagccagg gtctgataac agggaatgct tatctatgga ttataaaca
acacaattat gtttaattgg ctgtaaacct cccactggtg agcattgggg taaagggtgtt
gcctgtaaca ataatgcagc tgctactgat tgcctccat tggactttt taattctatt
attgaggatg gtgacatggt agatacaggg tttggatgca tggacttttg tacattgcag
gctaataaaa gtgatgtgcc tattgatatt tgtaacagta catgcaaaata tccagattat
ttaaaaatgg ccagtgaacc ttatggggat agtttgttct tttttcttag acgtgagcag
atgtttgta gacacttttt taatagggct ggaaccttg gcgaggctgt cccggatgac
ctttatatta aagggtcccg taatactgca gttatccaaa gtatgacatt tttccaact
cctagtggct ctatagttac ctccagaatca caattattta ataagcctta ttggctacag
cgtgcacaag gtcataaca tggcatttgc tggggcaatc agttatttgt taccgtgggt
gataccactc gtactactaa tatgacatta tgactgaag taactaagga aggtacatat
aaaaatgata attttaagga atatgtacgt catgttgaag aatatgactt acagtttgtt
ttcagcttt gcaaaattac actaactgca gagataatga catatataca tactatggat
tccaatattt tggaggactg gcaatttggg ttaacacctc ctccgtctgc cagtttacag
gacacatata gatttgttac ctcccaggct attacttgcc aaaaaacagc accccctaaa
gaaaaggaag atccattaaa taaataact ttttgggagg ttaacttaa ggaaaagttt
tctgcagatc tagatcagtt tcctttggga cgaagtttt tattacaatc aggccttaa
gcaaagccca gactaaaacg ttcggcccct actaccctg caccatccac caaacgcaa
aaggttaaaa aataa

```

HPV-59: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JN104074.1>

```

atggctctgt ggcgttctag tgacaacaag gtgtatctac ctccaccttc ggtagctaag
gtgtcagca ctgatgatta tgcacccgt accagtattt tctaccacgc aggcagttcc
agacttctta cagttggaca tccatatttt aaagtacctt aaggtggtaa tggtagacag
gatgttctta aggtgtctgc atatcaatac agagtattta gggttaattt acctgatccc
aataaattcg gcctccaga taacacagta tatgatccta actctcaacg cttggctctgg
gcctgtgtag gtgtgaaat cggtcggggc caacctttag ggtaggact cagtggctat
ccattatata ataaattgga tgacactgaa aactctcatg tagcatctgc tgttgatacc
aaagatacac gtgataatgt atctgtggat tataaacaac ctccagctgtg tattattggc
tgtgtacctg ccattggaga aactggaga aagggcactg cttgtaagcc taatactgtg
gttcagggcg attgtcctcc actagaatta ataaatacac caattgaaga tgggtgatatg
gtagacacag gatatggggc tatggacttt aaattgttgc aggataaca aagtgaagta
ccattggata ttgtcagtc tatttgtaaa tatcctgatt attacaat gtcagcagat
gcttatggag acagtatggt tttttgttta aggcgagaac aggtttttgc cagacatttt
tggaaatagat ctggactat ggggtgatcaa ctctctgaat cactatata taaaggctact
gacatacgtg ccacccagg cagttattta tattctcctt cccaagtgg gtctgtgggtt
actctgatt cacaattatt taataaacca tattggctgc acaaggctca gggtttaaac
aatggatata gttggcaca tcaattgttt ttaacagttg tagatcctac tgcagcacc
aatctttctg tgtgtgctc tactacttct tctattccta atgtacacac acctaccagt
tttaaagaat tttgcagaca tgtggaggaa tttgatttgc agtttatatt tcaactgtgt
aaaataacat taactacaga ggtaatgtca tacattcata atatgaatac cactattttg
gaggattgga attttgggtg tacaccacct cctactgcta gtttagttga cacataccgt
ttgttcaat ctgctgctgt aacttgtcaa aaggacaccg caccgccagt taacaggac
ccttatgaca aactaaagtt ttggactgta gatcttaagg aaaggttttc tgcagatcct
gatcagtttc ctttgggacg taaattttta ttgcaattag gagctagacc taagcccact
ataggccac gcaaacgtgc agcggccgcc cctacctcta cccatcacc aaaacgtgtt
aagcgtgcga agtcttccag aaaatag

```


HPV-68 L1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KC470283.1>

```

atg gcattgtggc
gctctagcga caacatggtg tatttgctc cccctcagt ggcaagggtt gtcaatacag
atgattacgt aacacgcact ggcatttatt actatgctgg tacatctagg ttattaactg
taggccatcc atattttaag gtccctatgt ctgggggccc caagcaggac attcctaagg
tgtctgcata tcaatacagg gtgtttaggg tttccctacc tgatcctaataa aattttagtc
ttcctgagtc tacattatat aaccctgata cgcagcgatt ggtatgggccc tgtgttgggtg
ttgaaatagg tagggggcag ccattagggtg ttggccttag tgggcatcca ttatataata
ggctagatga tactgaaaaa tctccgtttt cctctaacag aaatcctaag gacagtgggg
acaatgtttc agtggactgt aaacaaacgc aactatgtat tataggctgt gttcctgcca
ttggggagca ctgggccaaa ggtaaatcct gtaagcctaa caatgtgcag cccggggact
gtccaccatt agaattagta aatacaccta tacaggatgg cgatatgatt gatacaggat
atggtgctat ggactttagt acattacaag aaacaaaaag cgagggtgccc ttagatataa
gtcaatcggg ctgcaaatat cctgactatt tacaatgtc tgcagatgtc tatggagaca
gtatgttctt ttgtttacgt agggaacagt tatttgctag gcatttttgg aatagagggg
gcctggtagg gacacactatt cctactgaat tgtatattaa gggcactgac atactgaca
gtcctagtag ttatgtatat gcccctcgc ctagtgggtc tatgggtatcc tcagactccc
agtattttaa caagccctat tggctgcaca aggcacaggg acacaacaat ggtatttggg
ggcataatca attatttctt actgtttgtg ataccactcg cagtactaat tttactttgt
ctactactac tgaatcagct gtaccagatg tttatgatcc taataagttt aaggaatata
ttaggcattg tgaggaatat gatttgcaat tcatatttca gttgtgtact ataacattgt
caactgatgt aatgtcctat atacatacta tgaatcctg tattttggat gatgggaatt
ttggtgttgc cctccacca tctgctagtc tctgtagatac ataccgctat ctgcaatcag
cagcaattac atgtcgaaaa gacgcccctg cacctactaa aaaggatcca tatgatggcc
taaacttttg gaatgtaaat ttaaaggaaa agtttagttc tgaactggac cagtttctt
taggacgcaa atttctttta caggcaggtg tccgcgcagc acccactata ggccccgca
aacgccctgc cacagcaact actgcatcta cctctaagca caaacgtaaa cgtgtgtcaa
agtaa

```

HPV-69 L1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/6970418>

```

atggccttgc ggcgtactag tgacagcaag gtatatctgc
ctcctacccc tgtgtcccgg gttgtcagac ggatgaatat gtacacgcac cggatatatt
actatgcagg cagctctcga ttattaactt tgggtcatcc ctattttcca attcctaatt
ctggttcaac agcagaaatt cctaaagtgt ctgcttacca atataggggtt tttcgtgttc
accttcaga ccctaacaaa tttgggttgc ctgaccccca gttatataat cccgaaacag
aacgggttggg atgggcctgt gttggtgtag aggttggcag gggacaaccg ttgggtgttg
ggctaagtgg gcatccttta ttaataaat tggatgacac tgaaaattca catcttgcca
ctgctaattg agacactgat aatagggaca acgtgtgtgt agataataaa caaactcagt
tatgtattat tggatgtacc cctcctttag gtgaacactg gggcgttggc actgtatgta
aaaatgcaca gtctcaggta cagcgtggcg attgtccacc tttggaactt atttccagtg
ttattgagga tgggtgatatg attgatactg gctttgggtg catggatatt acagctttgc
aagctacaaa atgtgatgtg ccacttgata ttaatcaatc tatttgcaa tatccagatt
accttaaaat gtctgcagat acgtatggaa acagcatggt ttttttctt cgtcggggaac
aattgtttgc cagacatttt ttaataaaag ctggcactat aggtgattct gtaccagtat
ctatgtatat taaaggcgtt ggtcaaggtc gtgaacctcc aactacttct atatactcac
gtacgcctag tggctccatg gtgacctctg atgctcaatt gtttaataaa ccttactggg
tacagcgtgc ccagggtcat aataatggca tttgttgggg caaccaattg tttgttactt
gtgtagatac taccgcagat accaacctca ctattagtac tgtatctgca caatctgcat
ctgcactttt taaaccatca gattataagc agtttataag gcatgggtgag gaatatgaat
tacagtttat atttcaattg tgtaaaatta ctcttaccac tgatgtaatg gcctatatcc
atacaatgaa ttctactatt ttggaaaatt ggaattttgg ccttaccttg cctcctactg
ctagtttggg agatgcatat aggtttatta aaaattcagc tactacatgt caacgcgatg
ccctgcaca gcccaaggag gatccattta gtaaatataa attttggggac gttgatctta
aagaaaagtt ttctattgat ttagatcaat ttccactggg cagaaaattt atgctgcagg
ctggtataca gcgacgtcct aagttaggca ccaaacgtcc agcttcttcc ttatctgcat
cttccctctc taccacacgt aaaaaacgca aacttactaa gtaa

```

Anexo C: Propuesta de tema PFI

PROPUESTA DE TEMA		
ENTREGA	1ra fecha [] 2da fecha (RECUPERATORIO) []	
TITULO	Determinación de la replicación viral en muestras de tumores ginecológicos infectados con un CRAd.	
ALUMNO	Malnero, Cristian Miguel. LU:1010624 Licenciatura en Biotecnología cmalnero@uade.edu.ar	FIRMA y ACLARACIÓN ¹  CRISTIAN MALNERO
ALUMNO	Bermúdez, Ismael Rodolfo. LU: 123433 Licenciatura en Biotecnología ibermudez@uade.edu.ar	 Ismael Bermúdez
TUTOR	Lopez, María Verónica. DNI: 22.441.017 mariaavlopez@uade.edu.ar	 Maria Veronica Lopez
¿Externo? ²	NO	
CO-TUTOR	No aplica	
FIRMA y ACLARACIÓN		
CERTIFICACIÓN RECEPCIÓN (COORD. DE PFI)	13/4/13	 Pardiña, Ana L.
RESULTADO DE LA EVALUACIÓN (DIR. CARRERA)		
FIRMAS y ACLARACIONES		
CERTIFICACIÓN NOTIFICACIÓN (ALUMNOS)		

¹ Doy mi consentimiento a la presente propuesta y declaro conocer mis derechos y obligaciones respecto de los Proyectos Finales de Ingeniería de UADE tal cual están detallados en la normativa vigente.

² En caso de tutor externo a UADE indicarlo con una cruz, entregar copia de su CV junto con la propuesta, y proponer co-tutor interno.

1. TIPO DE PROYECTO

Investigación (apunta a generar nuevos conocimientos)

No corresponde a ningún proyecto de INTEC.

2. OBJETIVO

Este trabajo pretende analizar la efectividad de un agente biológico (virus oncolítico) en muestras de pacientes con tumores ginecológicos (útero y ovario).

Objetivos específicos:

- 1) Determinar mediante real time-PCR de la capacidad replicativa de un adenovirus oncolítico en muestras de tumores de pacientes con cáncer de útero y ovario.
- 2) Poner a punto de una nueva PCR para la determinación del genotipo de HPV (virus del papiloma humano) en las muestras de pacientes con cáncer de útero.
- 3) Calcular del costo de esta investigación.

3. ALCANCE

3.1 Alcance del informe de Avance:

Se espera poder analizar un mínimo de cuatro muestras de pacientes con cáncer de útero y una con cáncer de ovario para mediados del mes de agosto de 2013. Se presentaran los resultados parciales de la capacidad replicativa el virus en las muestras analizadas. En cuanto a la PCR para determinar HPV, en el mismo período se espera finalizar con la puesta a punto y estar iniciando la digestión de los productos de PCR con las enzimas de restricción correspondientes o se enviaran los productos a secuenciar. Además se realizara un análisis de los costos de esta investigación.

3.2 Alcance del Informe Final:

Se espera haber analizado un mínimo de 6 muestras de cáncer de útero y dos de ovario. Con estos resultados se podrá estimar la efectividad del adenovirus oncololítico en las muestras de cáncer ginecológicos analizados. Con respecto a la PCR para genotipificar el HPV se pretende que en el informe final se presenten los resultados de la prevalencia en la población estudiada.

4. Descripción

- 1- **Determinación de la efectividad del virus AdF512v4.** Se ha desarrollado en el laboratorio un nuevo adenovirus de replicación condicional (CRAd) denominado AdF512v4. El mismo posee el promotor de la proteína SPARC asociado a dos motivos respondedores a hipoxia e inflamación; a su vez este promotor quimera se encuentra dirigiendo el gen viral E1A Δ Rb (que no puede unir la proteína de retinoblastoma) y el virus tiene una fibra quimera 5/3 que le permite ampliar su rango de infección a las células tumorales [1]. Este nuevo CRAd será utilizado para infectar las muestras de los pacientes con cáncer ginecológico (de útero u ovario) que se obtendrán mediante un acuerdo que se firmó entre el hospital de oncología Marie Curie y el Instituto Leloir. Se estima que el número de muestras a utilizar en esta investigación es de seis muestras de útero y dos de ovario. Estos valores se basan en la estadística del hospital, sin embargo pueden variar en el lapso del proyecto. Las muestras serán transportadas al Instituto Leloir y allí bajo campana

de flujo laminar serán seccionadas e infectadas con AdF512v4. Se tomará una muestra a las 5 horas para verificar la infección y otra muestra a las 72 horas para determinar la replicación. En cada muestra temporal se incluirán tres o cuatro replicas. Se procederá a preparar ADN y posteriormente se utilizará la muestra de ADN para determinar la replicación viral. Para ello se cuantificará por Real-Time PCR el gen E4 utilizando una curva de calibración. Se analizarán los resultados mediante test estadísticos adecuados. Como control en los experimentos se utilizará la versión previa AdF512v1 o el virus silvestre.

- 2- **Puesta a punto de una nueva PCR para HPV.** El cáncer de cérvix y el virus del papiloma humano se han sido asociados en innumerables trabajos [2]. Hasta la fecha se han identificado más de 100 genotipos de HPV, pero unos pocos como el 16, 18, 31 y 33 han sido identificados como de alto riesgo. Los métodos de detección de estos genotipos están siendo estudiados y mejorados. En nuestro caso hemos diseñado un par de cebadores degenerados para la amplificación y posterior determinación del tipo de HPV mediante RFLP (polimorfismo de los sitios de restricción). En este proyecto se procederá a amplificar las muestras de ADN de líneas celulares de cáncer de útero conocidas por estar infectadas por cepas definidas de HPV y posteriormente se procederá a digerir el producto de PCR con una batería de 4-6 enzimas de restricción. Se corroborará esto con la secuencia de los productos de algunas muestras. Una vez definidas las condiciones se procederá a aplicar esta metodología en las muestras de los pacientes que se hallan aislado.

Referencias Bibliográficas

1. Lopez, M.V., et al., *A Tumor-stroma Targeted Oncolytic Adenovirus Replicated in Human Ovary Cancer Samples and Inhibited Growth of Disseminated Solid Tumors in Mice. Mol Ther*, 2012.
2. Munoz, N., *Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. J Clin Virol*, 2000. **19**(1-2): p. 1-5.

5. Aportes

Los alumnos se incluirán dentro del grupo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular y Celular del Instituto Leloir, donde se desarrollará el trabajo. El resultado obtenido le permitirá al grupo evaluar la eficacia del virus que construyo. De ser eficaz el virus el laboratorio continuará con la caracterización del mismo en modelos animales en ensayos pre-clínicos.

En el caso de lograr resultados para una publicación los alumnos serán incluidos en la misma respetando el orden de la autoría según los aportes realizados.

6. Recursos

Este proyecto será desarrollado completamente en el Instituto Leloir, sin embargo se solicita taq platinum polimerasa para cubrir parte de su costo.

INSUMO	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO ESTIMADO
Taq platinum catalogo 10966030 Invitrogen	Enzima para Real Time PCR	2	1800 pesos c/una
TOTAL PRESUPUESTO ESTIMADO: \$3600			

7. Cronograma Tentativo de Actividades

Actividad	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Objetivo específico 1				X	X	X	X	X	X	X	X	
Objetivo específico 2				X	X	X	X	X	X	X	X	
Objetivo específico 3				X	X	X	X	X				

NOTA: CONSIDERAMOS ABRIL COMO EL MES 4