

Tesis Doctoral

Secuencia nucleotídica completa del Adenovirus 7h: análisis de los polimorfismos del gen del hexón de los Adenovirus circulantes en Buenos Aires entre los años 1990-2002

Barrero, Paola Roxana

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Barrero, Paola Roxana. (2004). Secuencia nucleotídica completa del Adenovirus 7h: análisis de los polimorfismos del gen del hexón de los Adenovirus circulantes en Buenos Aires entre los años 1990-2002. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3717_Barrero

Cita tipo Chicago:

Barrero, Paola Roxana. "Secuencia nucleotídica completa del Adenovirus 7h: análisis de los polimorfismos del gen del hexón de los Adenovirus circulantes en Buenos Aires entre los años 1990-2002". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3717_Barrero

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE y N BIBLIOTECA

**Secuencia nucleotídica completa del Adenovirus 7h: análisis de los
polimorfismos del gen del hexón de los Adenovirus circulantes en
Buenos Aires entre los años 1990-2002.**

**Tesista: Paola Roxa Barrero
Licenciada en Ciencias Biológicas**

Director: Dra. Alicia Susana Mistchenko

Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez

71420
VI
Nº 3717

| Indice | | |
|----------------------|----------------------------------|----------------|
| Sección | Subsección | Páginas |
| Resumen | | 2 |
| Abstract | | 3 |
| Introducción | | 4-45 |
| | Filogenia y taxonomía | 4-9 |
| | Estructura del virión | 10-12 |
| | Ciclo replicativo | 12-16 |
| | Expresión génica | 17-36 |
| | Interacción con el huésped | 37 |
| | Mecanismos de defensa | 38-40 |
| | Epidemiología | 41-42 |
| | Patogénesis | 42-44 |
| | Naturaleza del aporte | 45 |
| Materiales y Métodos | | 46-59 |
| | Muestras y datos epidem. | 47 |
| | Datos meteorológicos | 48 |
| | Cultivo y purificación de DNA | 48-49 |
| | Obtención de biblioteca gen. | 49-51 |
| | Epidemiología molecular | 51 |
| | Genotipificación AV7 | 51-52 |
| | Análisis de polimorfismos.... | 52-53 |
| | Diseño de primers específicos | 53-54 |
| | Amplificación y secuenciación | 55-57 |
| | Análisis de secuencias.... | 58-59 |
| Resultados | | 60-112 |
| | Aspectos clínicos y epidemiol... | 61-65 |
| | Datos ambientales | 66-67 |
| | Datos moleculares: hexón AV7h | 68-78 |
| | Polimorfismos gen hexón | 79-89 |
| | Polimorfismos HVRs gen hexón | 90-94 |
| | Inferencia filogenética | 95-96 |
| | Secuenciación genoma AV7h | 97-112 |
| Conclusiones | | 113 |
| Bibliografía | | 114-118 |
| Addendum | | 119-135 |
| | Secuencia genoma AV7h | 119-126 |
| | Polimorfismos y epidemiología... | 127-133 |
| | Primers diseñados | 133-135 |

Resumen

Los Adenovirus circularon en el período 1999-2002 durante todo el año, registrándose un mayor número de casos en el período invernal de baja temperatura y primaveral con cambios de temperatura frecuentes.

El diagnóstico virológico se realizó tempranamente luego de la internación siendo la bronquiolitis el diagnóstico clínico al ingreso más frecuente. Se registró un mayor número de casos en menores de 12 meses y la evolución en general fue favorable registrándose 9 casos fatales en un total de 362 muestras analizadas.

Se encontró una correlación negativa de grado medio con respecto a la temperatura, indicando un aumento en el número de casos cuando el registro térmico desciende. En cuanto a la humedad relativa y el índice UVB, la relación no es tan clara aunque es siempre de grado menor. Este parece ser un parámetro no necesariamente asociado a la aparición de casos de Adenovirus.

El análisis filogenético del hexón completo permitió agrupar las muestras fatales y las separó de las graves y leves en el período 1990-1999. El análisis de las regiones hipervariables en el período 1990-2002 posicionó a las muestras analizadas en el *cluster* GTC2 junto al AV7h.

La secuencia completa del AV7h se llevó a cabo por una estrategia de ensamblado de 8 contigs que permitieron elaborar una secuencia consenso de 35259 pb. con un porcentaje G+C del 51%. Se conservaron intactos los genes para las regiones tempranas, intermedias y tardías. El análisis filogenético ubicó al genoma AV7h junto con el AVB con el que tiene una homología del 84%. Se hallaron ORFs relacionados con proteínas pulmonares que podrían inducir autoanticuerpos o daño pulmonar crónico postviral.

Abstract

Adenovirus 7h Sequencing: Hexon Gene Polymorphism Analysis In A Twelve-Year Period In Buenos Aires, Argentina.

In Argentina, Adenovirus 7h (AV7h) has been frequently associated with fatal cases and chronic lung disease. In order to understand the characteristics of AV7h we accomplished the entire reference sequencing and analysed sample polymorphism in the hexon gene from a twelve-year period (1990-2002). Nasopharyngeal aspirates from children with acute lower respiratory infections were characterized by multiplex-PCR. Primers were designed and PCRs were performed to obtain the full genome for the reference 7h strain 87-922 and the entire hexon gene or hypervariable regions for samples. Amplicons were sequenced, contigs were aligned, a consensus full-length sequence was obtained for the reference strain 87-922 and phylogenetic relationships for hexon gene were inferred by maximum-likelihood criteria. Overall differences between AV7h hexon gene and prototype for serotype 7 (Gomen) sequence were <4% at nucleotide level and <3.5% at amino acid level. Phylogenetic analysis clustered together fatal cases apart from severe and mild cases. The entire genome was completed in 8 contigs with 44, 16, 7, 15, 14, 26, 18 and 15 primer reactions respectively. AV7h was 35263 bp in length and had a GC content of 51% and genes from the early, intermediate, and late regions were present in the expected human adenovirus locations. The genome differs from prototype strain for AVB (subspecie B2) in 16%, and 4% from vaccinal strain AV7(subspecie B1). This work constitutes the first attempt to elucidate intragenotypic variations within AV7h and to reveal particular features of this strain.

Introducción

Filogenia y taxonomía

Los miembros de la familia *Adenoviridae* son virus icosaédricos, sin envoltura que se replican en el núcleo. Su DNA lineal de doble cadena contiene 26-45 kpb y se clasifica como de tamaño medio dentro de los DNA virus. El genoma se caracteriza por llevar terminales extremos repetitivos invertidos (ITRs) y los extremos 5' se unen a una proteína terminal (TP). Los Adenovirus infectan todas las clases de Vertebrados, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Davison *et al.*, 2003). Las relaciones filogenéticas entre los distintos Adenovirus pueden resumirse en la Figura 1.

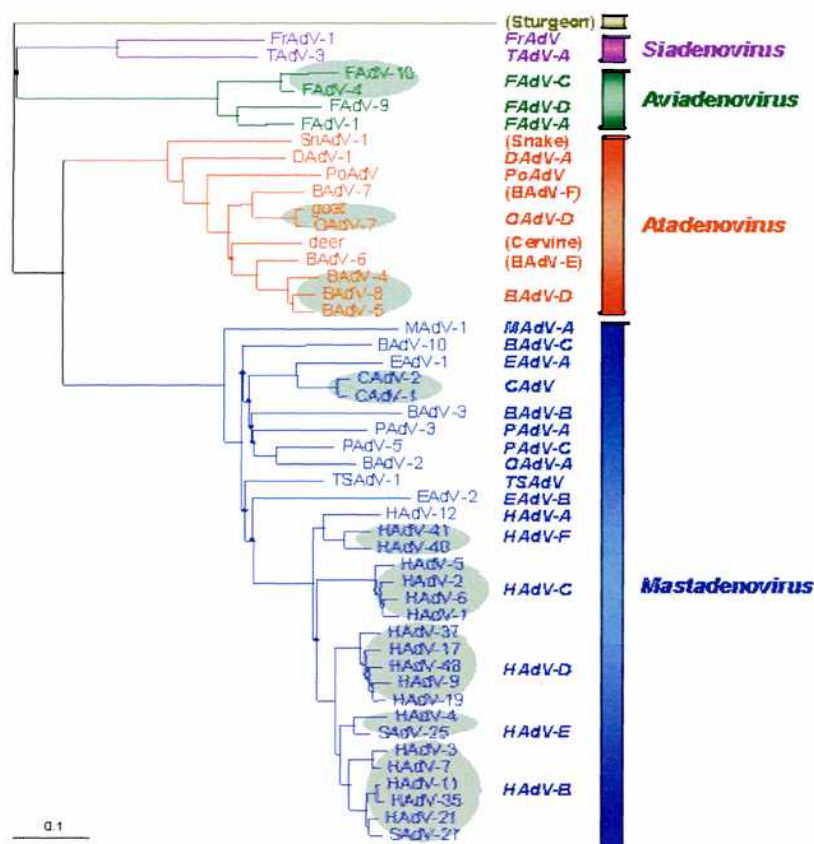


Figura 1: Filogenia de la proteína hexón de la familia *Adenoviridae*. Arbol de distancia con raíz en el esturión. Los géneros se marcan en diferentes colores y se destacan en verde los virus que pertenecen a la misma especie. B: bovino, C: canino, D: pato, E: equino, F: aviar, Fr: rana, H: humano, M: murino, O: ovino, P: porcino, Po: zarigüeyas, Sn: serpiente, T: pavo, TS: musaraña. Tomado de Davison *et al.*, 2003

Actualmente el *ICTV* reconoce 4 géneros de Adenovirus que coinciden con los cuatro clados principales, Siadenovirus (anfibios), Atadenovirus (reptiles), Aviadenovirus (aves) y Mastadenovirus (mamíferos) y se propone un nuevo quinto género Ichtadenovirus para Peces (Benkö y Harrach, 2003, Büchen-Osmond, 2003; Harrach y Benkö, 1998). Aviadenovirus y Mastadenovirus se originaron en Aves y Mamíferos respectivamente y los otros dos géneros tienen un rango más amplio de huéspedes. Los Atadenovirus se caracterizan por su alto contenido en A+T e infecta rumiantes, aves, reptiles y marsupiales. Se conocen dos miembros del género Siadenovirus: uno de aves y otro de rana (Davison *et al.*, 2000). Dentro de cada género, los virus se clasifican en especies (Tabla 1).

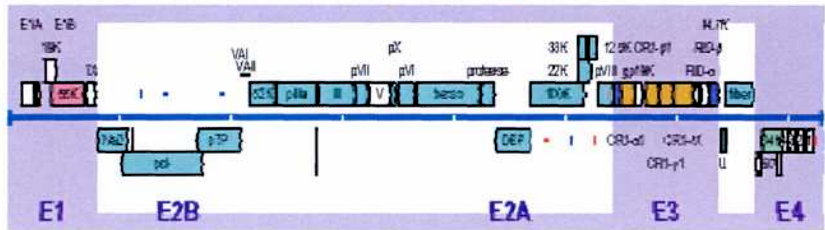
| Familia | Género | Especie Tipo |
|----------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| <u><i>Adenoviridae</i></u> | <u><i>Mastadenovirus</i></u> | <u><i>Adenovirus humano C</i></u> |
| | <u><i>Aviadenovirus</i></u> | <u><i>Adenovirus aviar A</i></u> |
| | <u><i>Atadenovirus</i></u> | <u><i>Adenovirus ovino D</i></u> |
| | <u><i>Siadenovirus</i></u> | <u><i>Adenovirus de pavo B</i></u> |

Tabla 1: Clasificación de la familia Adenoviridae

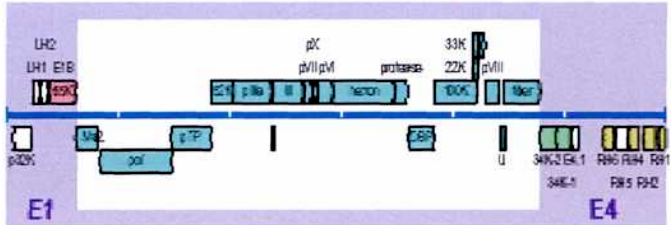
Se ha llegado a la conclusión que los Adenovirus coevolucionaron y coespeciaron con sus hospedadores por similitud entre relaciones filogenéticas inferidas en base a la proteasa viral y a la subunidad pequeña de RNAr mitocondrial de los hospedadores (Benkő y Harrach, 2003). A su vez, se postula que existió un ancestro común previo al origen de los eucariotas compartido entre Adenovirus y bacteriófagos del tipo de PRD1 por similitudes estructurales y de estrategias de replicación y organización genómica (San Martín y Burnett, 2003). Estos predecesores pueden haber adquirido características distintivas como el *splicing* y genes propios que se conservan en todos los géneros. A partir de allí, cada linaje de Adenovirus debe haber incorporado distintos grupos de genes que favorecieron su *fitness* en los diferentes nichos que ocupan.

De esta manera, se pueden diferenciar diferentes organizaciones genómicas que se corresponden con los cuatro géneros de Adenovirus reconocidos (Figura 2). Existen 16 genes comunes a todos los géneros ubicados en la región central del genoma relacionados con la replicación (pol, pTP, DBP), con la encapsidación del DNA (52K, IVa2) y con la formación y estructura del virión (pIIIa, III, pVII, pIX, pVI, hexón, proteasa, 100K, 33K, pVIII y fibra). Los genes específicos de género se ubican en las regiones terminales del genoma y se supone que se han adquirido por captura, recombinación y/o duplicación (Davison *et al.*, 2003). La estructura y función de los genes se detallará más adelante, así como los genes que son particulares a Mastadenovirus.

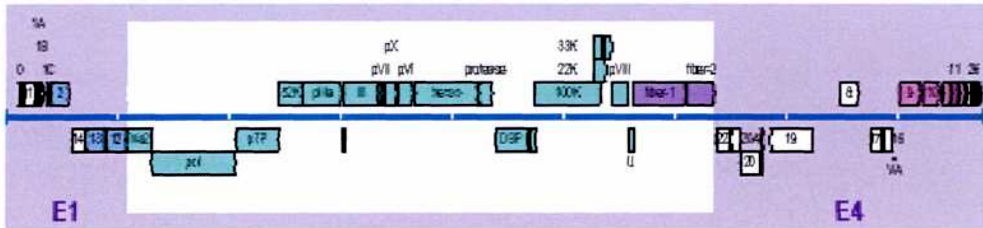
Mastadenovirus: SAdV-25 (HAdV-E)



Atadenovirus: OAdV-7 (OAdV-D)



Aviadenovirus: FAdV-1 (FAdV-A)



Siadenovirus: TAdV-3 (TAdV-A)

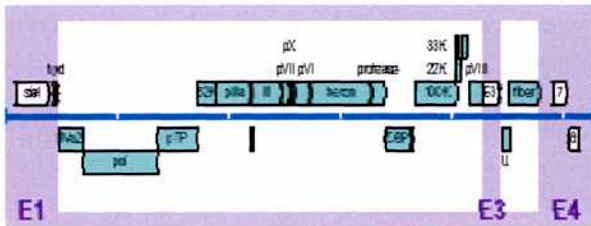


Figura 2: Organización genómica de los diferentes géneros de la familia *Adenoviridae*. Los genes comunes se marcaron en celeste, los específicos en otro color. F: aviar, H: humano, O: ovino, T: musaraña. Modificado de Davison *et al.*, 2003.

Se reconocen 51 serotipos de Adenovirus en humanos que se distinguen en base a su resistencia a neutralización por antisueros anti otros serotipos conocidos. La neutralización tipo específica resulta de la unión de un anticuerpo a epitopes de la proteína hexón y al nudo terminal de la proteína fibra. Regiones hipervariables en el hexón conforman *loops* serotipo específico en la superficie de la proteína (Shenk, 2001).

Los serotipos humanos se clasifican en seis especies (A-F) de acuerdo a diferentes propiedades como la oncogenicidad en roedores y la hemaglutinación. Aunque todos los serotipos humanos pueden transformar cultivos primarios de ratón, sólo los virus de las especies A y B son oncogénicos en ratón (Tabla 2).

| Especie | Serotipos: | Potencial Oncogénico | Hemaglutinación | |
|---------------------------|--|----------------------|-----------------|-------|
| | | | Rhesus | Rata |
| A | 12, 18, 31 | Alto | - | + / - |
| B subespecie B1 | 3, 7, 16, 21, 50(*) | Débil | + | - |
| B subespecie B2 | 11, 14, 34, 35 | | | |
| C | 1, 2, 5, 6 | Ninguno | - | + / - |
| D | 8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51(*) | Ninguno | + / - | + |
| E | 4 | Ninguno | - | + / - |
| F | 40, 41 | Desconocido | - | + / - |

Tabla 2: Clasificación de los Adenovirus humanos.
Modificado de Cann, 1997

Los Adenovirus pueden infectar y replicarse en varios sitios del tracto respiratorio así como en ojos y tracto gastrointestinal. De manera menos frecuente infectan el tracto urinario y el hígado. Ocasionalmente, pueden infectar y causar enfermedad en páncreas, miocardio, o sistema central nervioso, llevando a meningoencefalitis como complicación de una infección respiratoria. Sólo un tercio de los serotipos descritos están asociados con enfermedad, siendo muchas infecciones subclínicas que generan anticuerpos protectivos ante la reintroducción exógena del mismo serotipo. Los virus pueden hacer infecciones latentes en tejido linfoide y reactivarse en el tiempo (Tabla 3) (Lukashok y Horwitz, 1998).

Tabla 3: Patologías causadas por Adenovirus en humanos

| Enfermedad | Individuos a riesgo | Serotipos |
|--------------------------------|--|------------------|
| Faringitis aguda febril | Infantes, niños | 1-3, 5-7 |
| Fiebre faringoconjuntival | Escolares | 3, 7, 14 |
| Enfermedad respiratoria aguda | Reclutas militares | 3, 4, 7, 14,21 |
| Neumonía | Reclutas militares, Infantes, niños | 4, 7 1-3, 7 |
| Queratoconjuntivitis epidémica | Todos | 8, 11, 19, 37 |
| Síndrome coqueluchoide | Infantes, niños | 5 |
| Cistitis aguda hemorrágica | Niños | 11, 21 |
| Gastroenteritis | Infantes, niños | 40, 41 |
| Meningoencefalitis | Niños e inmunocomprometidos | 7, 12, 32 |
| Hepatitis | Infantes y niños transplantados | 1, 2, 5 |
| Miocarditis | Niños | ? |
| <i>Persistencia</i> | En inmunosuprimidos | |
| <i>En tracto urinario</i> | | 34, 35 |
| <i>En colon</i> | | 42-49 |

Estructura del virión

Los Adenovirus tienen una morfología característica con cápside icosaédrica compuesta por tres proteínas principales: hexón (II), base pentón (III) y la fibra (IV), junto con otras proteínas VI, VIII, IX, IIIa y IVa2. El genoma viral es lineal, doble cadena, con uniones covalentes a la proteína terminal (TP) en sus extremos 5' que tienen terminales invertidos repetitivos (ITRs). El DNA viral está muy relacionado con la proteína básica VII y con un pequeño péptido *mu* (μ , X). Este complejo DNA-proteína se acopla a la proteína V, y provee un vínculo estructural con la cápside mediante la proteína VI. El virus lleva una proteasa (Pr) necesaria para procesar algunas proteínas estructurales (precursores) y producir viriones maduros infecciosos. Nota: no existe la proteína I. (Figura 3, Tabla 4) (San Martín y Burnett, 2003).

Tabla 3: Proteínas tardías de los Adenovirus. Modificado de Cann, 1997

| Nombre: | Localización: | Funciones conocidas: |
|---------|--------------------------------------|---------------------------------|
| II | Hexón (monómero) | Estructural |
| III | Base Pentón | Penetración |
| IIIa | Asociada con base pentón | Penetración |
| IV | Fibra | Unión receptor; hemaglutinación |
| V | Core: asociada con DNA y base pentón | <i>Histone-like; packaging?</i> |
| VI | Polipéptido menor Hexón | Estabilización/ensamblado? |
| VII | Core | <i>Histone-like</i> |
| VIII | Polipéptido menor Hexón | Estabilización/ensamblado? |
| IX | Polipéptido menor Hexón | Estabilización/ensamblado? |
| TP | Genoma - <u>Proteína</u> Terminal | Replicación Genoma |

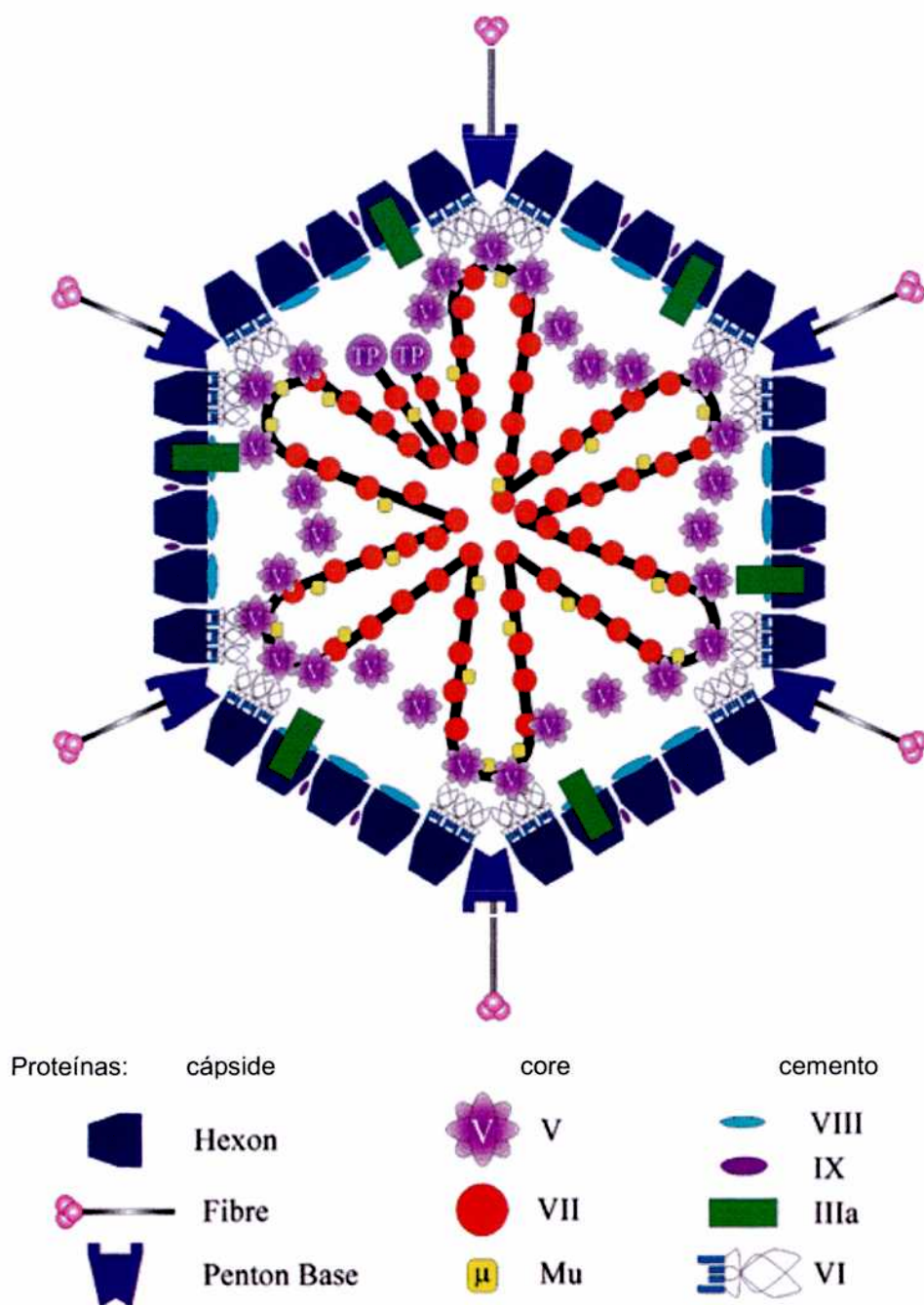


Figura 3: Estructura del virión de Adenovirus. Modificado de Russell, 2000.

La cápside está compuesta por 252 capsómeros, divididos en dos tipos principales: 240 hexones conformando las 20 caras triangulares del icosaedro y 12 pentones formando los 12 vértices. Desde la base de cada pentón protruye una fibra. La estructura puede verse en la Figura 4. Hexón, pentón y fibra constituyen los principales determinantes antigénicos del virus (Valentine y Pereira, 2003).

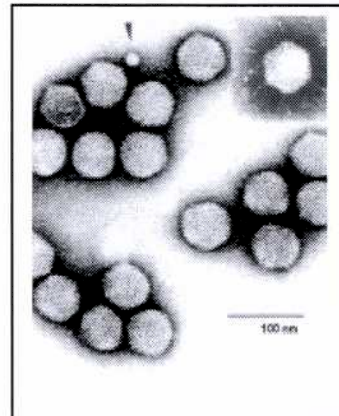
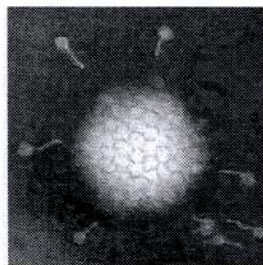


Figura 4: Estructura del virión de Adenovirus. Tomado de Valentine & Pereira, 2003.

Ciclo replicativo

El ciclo de replicación se divide por convención en dos fases separadas por el comienzo de la replicación del DNA. Los eventos tempranos comienzan con la interacción del virus con la célula e incluyen adsorción, penetración, movimiento del DNA viral al núcleo y expresión de un grupo de genes tempranos (*E=early*). Los productos de estos genes tempranos median la expresión viral posterior y la replicación del DNA, inducen la progresión del ciclo celular, bloquean la apoptosis y antagonizan las defensas antivirales del huésped. En células HeLa infectadas a una multiplicidad de 10 unidades

formadoras de placa por célula, la fase temprana dura 5-6 horas, luego se detecta la replicación del DNA viral. En ese momento, la fase tardía del ciclo comienza con la expresión de genes virales tardíos (L= *late*) y el ensamblado de los viriones progenie. El ciclo infeccioso se completa luego de 20-24 horas (Figura 4). Al final del ciclo se produjeron casi 10^4 partículas virales progenie por célula, junto con la síntesis excesiva de proteínas virales y DNA que no son ensamblados en viriones. Las células infectadas se dividen duplicando, al final del ciclo de replicación, el contenido de DNA y proteína (Shenk, 2001).

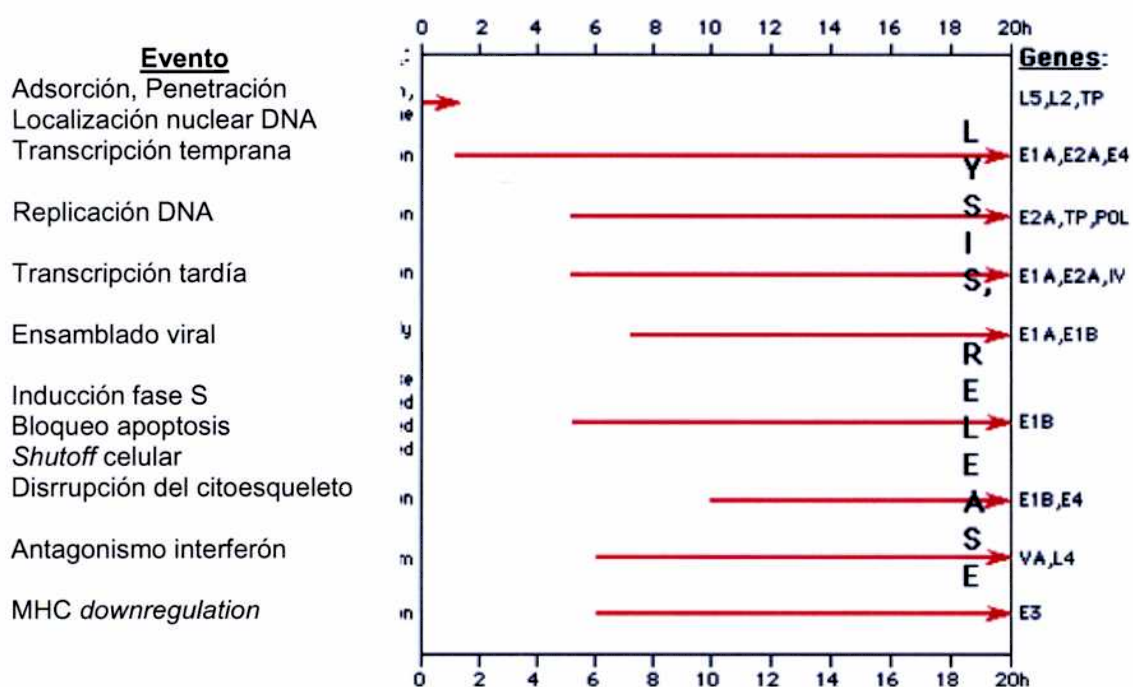
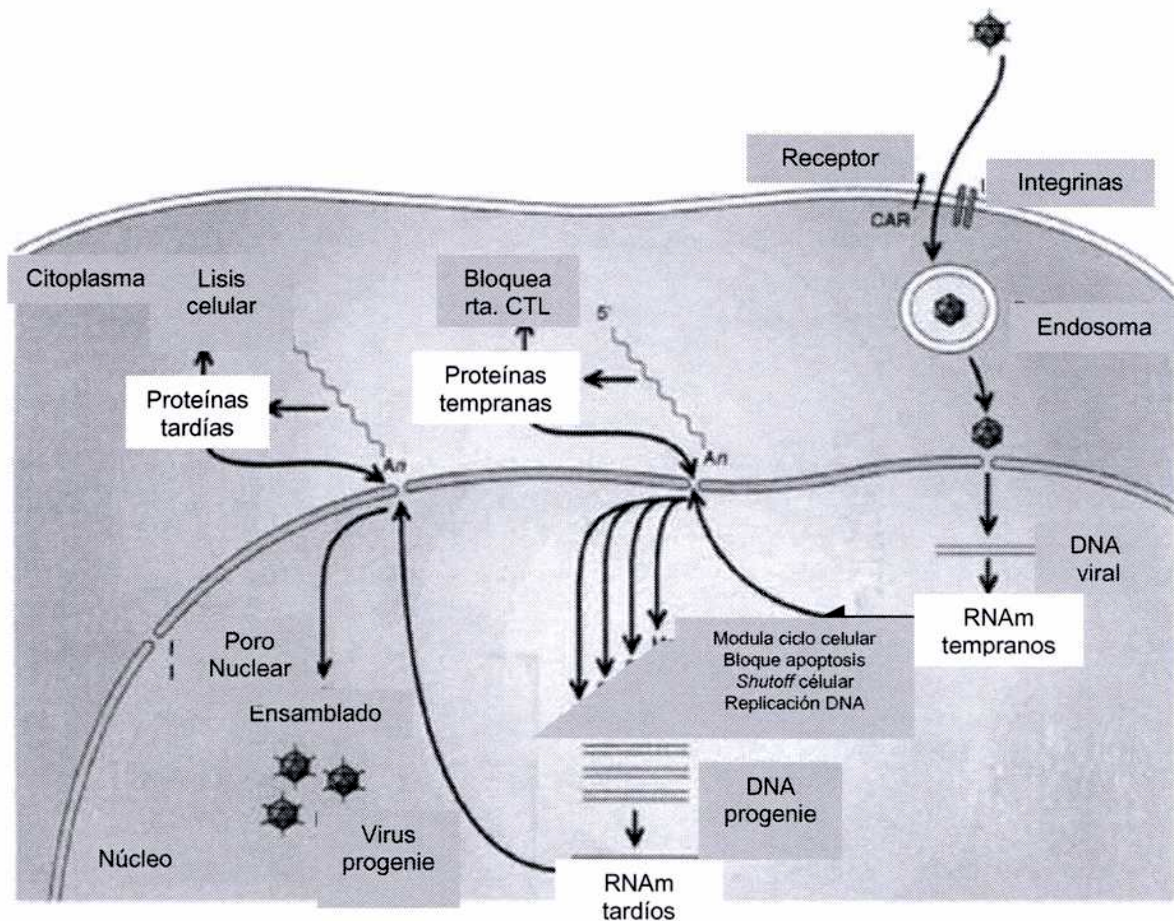


Figura 4: Ciclo replicativo de Adenovirus. Modificado de Cann, 1997.

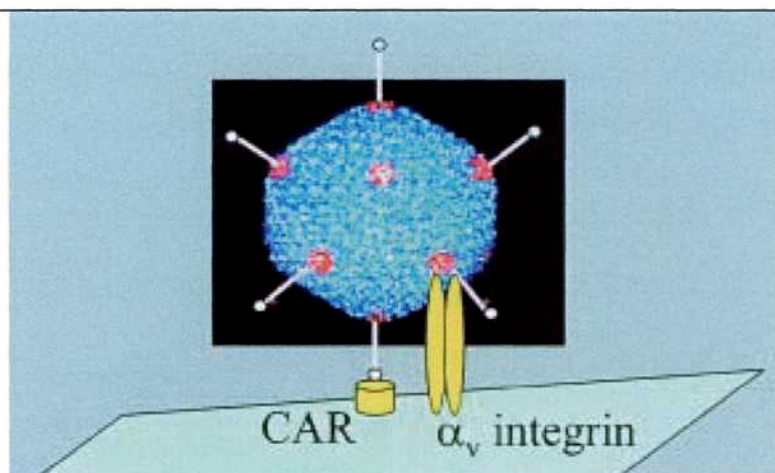
La replicación de todos los Adenovirus es similar y ocurre en el núcleo. En la Figura 5 se resume el ciclo replicativo.



La entrada de la partícula se produce en dos pasos: interacción de la fibra con el receptor y unión de la base del pentón con integrinas. Existen varios receptores celulares para Adenovirus incluyendo el receptor coxsackievirus-adenovirus CAR (especies A, C, D, E, y F, no B), la molécula MHC clase I alfa2 (especies A, B, C, D, E, y F), CD46 (especie B), ácido siálico (especie F serotipos Ad8, Ad19 y Ad37) VCAM (especie C serotipo Ad5p) y sBAR/ sB2AR (común a especie B y exclusivo para subespecie B2 respectivamente)(Boulanger, 1999; Gaggar *et al.*, 2003; Howitt *et al.*, 2003; Segerman *et al.*, 2003). La proteína pentón base se pliega entonces hacia la familia de heterodímeros de integrina de la superficie celular ($\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$) mediante una secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) presente en cada molécula de polipéptido III, permitiendo la internalización via endocitosis mediada por receptor (Figura 6). Los complejos AV-receptor difunden en *coated pits*. El

proceso requiere dinamina, una proteína que regula específicamente la endocitosis mediada por clatrina; y requiere la activación de kinasa lipídica fosfatidilinositol-3-OH kinase quien induce la reorganización de los filamentos de actina (Nemerow y Stewart, 1999; Nemerow , 2000).

Figura 6: Entrada a la célula de los Adenovirus. Modificado de Nemerow & Stewart, 1999



Como dato interesante, los receptores para Adenovirus no se encuentran en la cara apical del epitelio respiratorio sino en las caras basolaterales (Figura 7). Este puede reflejar una presión evolutiva para bloquear la entrada por esta puerta. (Pickles *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002).

Cara apical

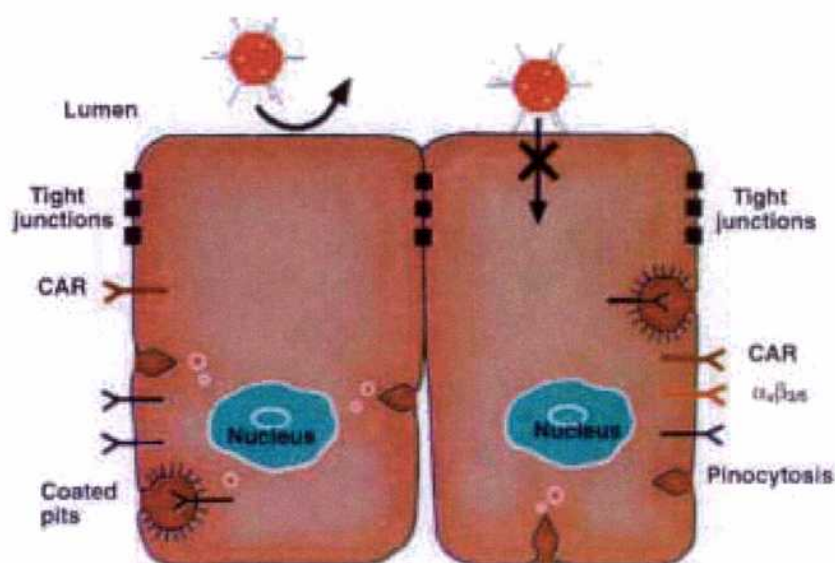
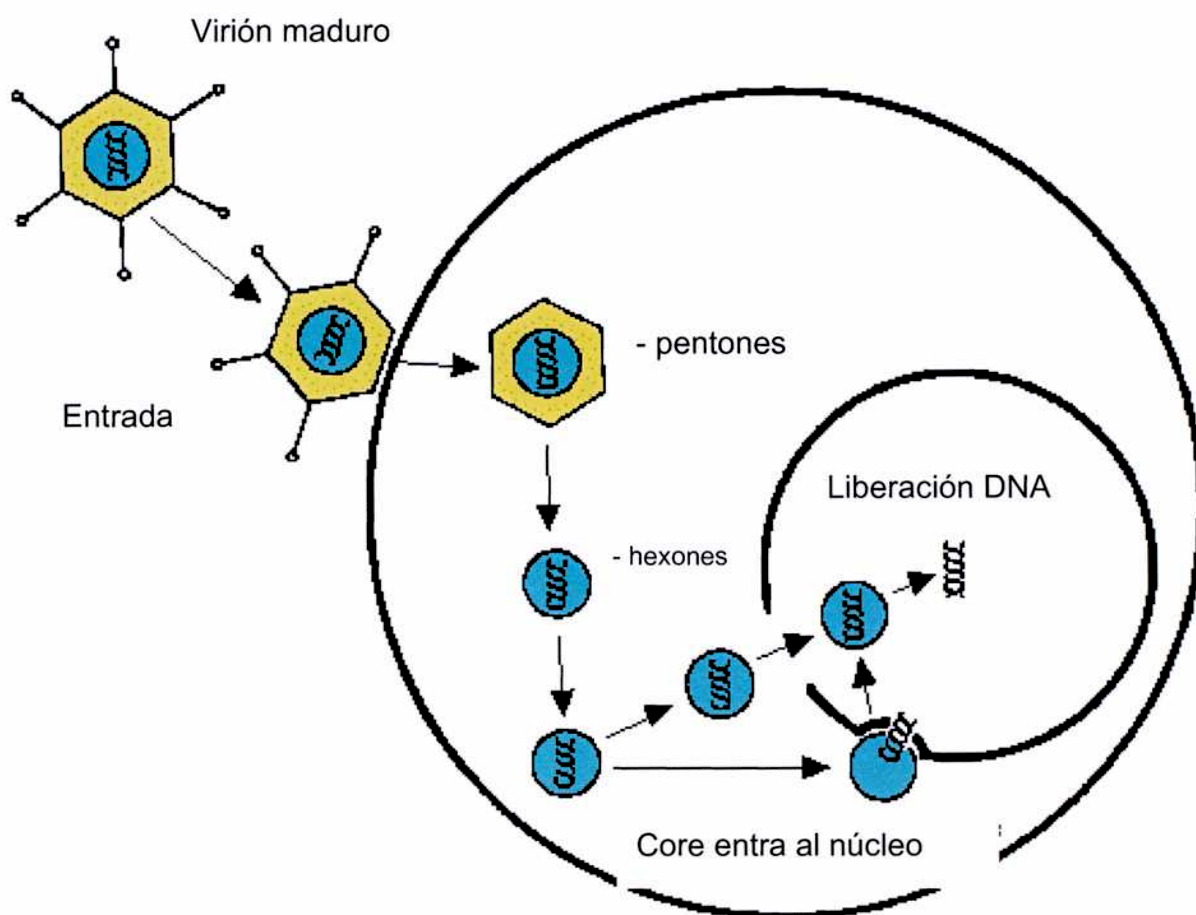


Figura 7: Ubicación de los receptores para Adenovirus. Modificado de Zhang *et al.*, 2002

La penetración involucra fagocitosis en vacuolas cuyas membranas luego son rotas por la actividad tóxica del pentón liberándose así la partícula en el citoplasma.

El *uncoating* sigue una secuencia ordenada: primero los pentones, dejando una partícula esférica parcialmente desnuda en el citoplasma. El core migra al núcleo y el DNA junto con la proteína VII entra por los poros nucleares, a partir de allí se convierte en un complejo DNA viral-histona asociándose con la matriz nuclear a través la proteína terminal unida covalentemente al DNA viral (PT) (Figura 8) (Shenk, 2001).

Figura 8: Penetración a la célula y *uncoating* de Adenovirus. Modificado de Cann, 1997.



Expresión Génica:

Se han descripto 16 genes comunes a todos los géneros que se ubican en la región central del genoma y están relacionados con la replicación (pol, pTP, DBP), con la encapsidación del DNA (52K, IVa2) y con la formación y estructura del virión (pIIIa, III, pVII, pIX, pVI, hexón, proteasa, 100K, 33K, pVIII y fibra). En particular los Mastadenovirus presentan un gen específico (V) entre pVII y pX. Los genes específicos de género se ubican en las regiones terminales del genoma E1 E3 y E4. En particular los Mastadenovirus presentan E1A, pIX, E3 (entre pVII y exón U) compartido con Siadenovirus, E4 orientado hacia la izquierda y los VARNA genes entre pTP y 52K compartidos con Aviadenovirus. Adicionalmente los ITRs aumentan de tamaño (93-369 nt).

El genoma de los Adenovirus género Mastadenovirus presenta un bloque central de genes tardíos orientados hacia la derecha desde 52K hasta la fibra interrumpidos en la misma hebra por un grupo de genes tempranos en la región E3 y en la hebra opuesta por E2, como DBP en la región E2A y pTP y DNA polimerasa en la región E2B (Figura 9). Las regiones terminales están ocupadas a la derecha por los genes E4 y a la izquierda por E1A y E1B más dos genes intermedios (IX y IVa2).

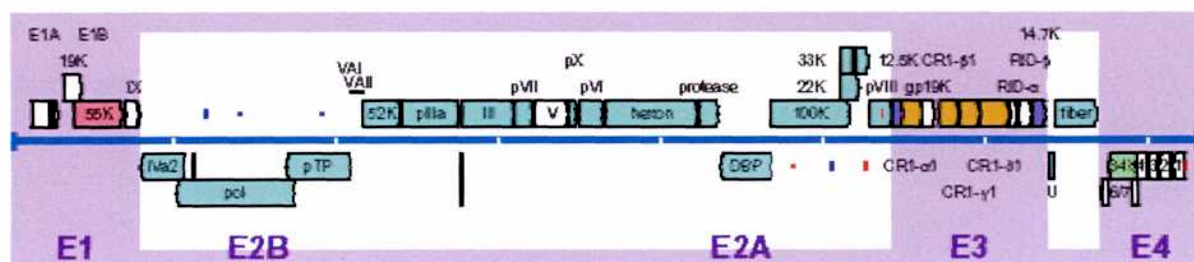


Figura 9: Genoma de Mastadenovirus. Los genes comunes se marcaron en celeste, los específicos en otro color. Modificado de Davison *et al.*, 2003.

El mecanismo de *splicing* fue descubierto en Adenovirus humanos como el proceso por el cual varios genes tardíos se expresan de un líder compartido no traducido tripartito (Berget *et al.*, 1977). Luego se vió también en genes tempranos e intermedios (E1A, DBP, pTP y pol en E2B, IVa2, E3 y E4). Este mecanismo no es universal en Adenovirus siendo en humanos E1B 19K, E1B55K y IX genes de un exón. El patrón "líder-exon" facilita la evolución de nuevos genes por captura o duplicación sólo requiriendo la presencia de un sitio aceptor de *splicing* a la izquierda de la nueva región codificante a insertar o duplicar. Un ejemplo de esto es la presencia del gen de la fibra duplicado en los Adenovirus humanos F, aunque sólo una copia sea funcional, y la presencia de una dUTPasa celular duplicada sin sitio activo en E4 ORF1 (Benkö y Harrach, 2003, Davison *et al.*, 2003).

El cromosoma viral lleva 5 unidades de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3, y E4), dos intermedias (IX y IVa2), y una unidad tardía (*major late*) que es procesada para generar 5 familias de RNAm tardíos (L1 to L5), que serán transcritos por la RNA polimerasa II (Tabla 6). El cromosoma presenta también una o dos copias (dependiendo del serotipo) de genes asociados al virus (VA) que serán transcritos por la RNA polimerasa III. Por convención, el mapa se dibuja con el gen E1A hacia el extremo izquierdo. Ambas hebras del DNA viral se transcriben hacia la derecha (*rightward* o 5'-3') en el mapa convencional codificando las unidades E1A, E1B, IX, *major late*, VA RNA, y E3 y hacia la izquierda (*leftward* o 3'-5') las unidades E4, E2, y IVa2 (Shenk, 2001).

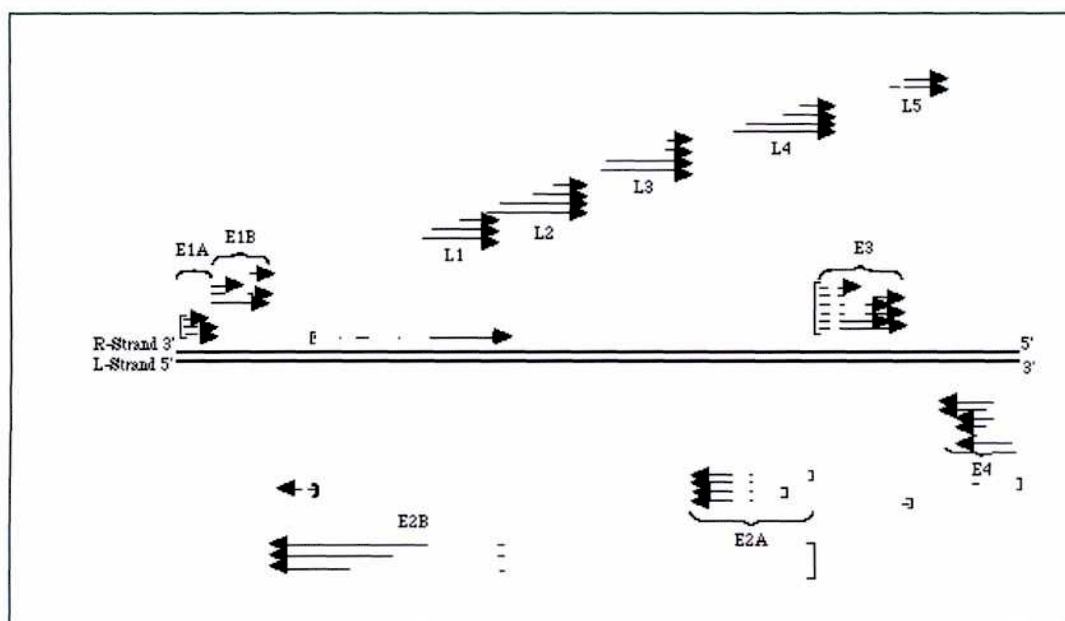
| Fase: | Genes Transcritos: |
|-------------------------|--|
| Inmediatamente temprana | E1A |
| Temprana | E1B, E2A, E2B, E3, E4 |
| Intermedia | IX y IVa2 |
| Tardía | Genes <i>Late</i> , proteínas del virion |

Tabla 6: Expresión génica en Adenovirus. Modificado de Cann, 1997.

La organización de las unidades de transcripción en el cromosoma viral serviría como reguladores en el tiempo. Así, la transcripción del genoma está regulada por factores virales actuando en trans: los productos de los genes inmediatamente tempranos regulan la expresión de los genes tempranos y éstos a su vez de los intermedios y tardíos (Figura 5)(Cann, 1997).

Cada gen transcripto por la RNA polimerasa II da lugar a múltiples RNAm que se diferencian por *splicing* alternativo y en algunos casos por el uso de diferentes sitios poly(A) (Figura 10) (Berget, 1977).

Figura10: Mapa de transcripción de Adenovirus.
Modificado de Cann, 1997.



Cada transcripto da origen a un número diferente de proteínas, que puede o no coincidir con el número de RNAm que se generen. Algunas proteínas generadas del mismo transcripto tienen secuencias en común (E1A por ejemplo) mientras que otras no (E1B por ejemplo). No existe un consenso para la nomenclatura de las proteínas llamándose algunas por su masa molecular, otras por sus funciones, otras por su ORF y también por su unidad de transcripción (Figura 11).

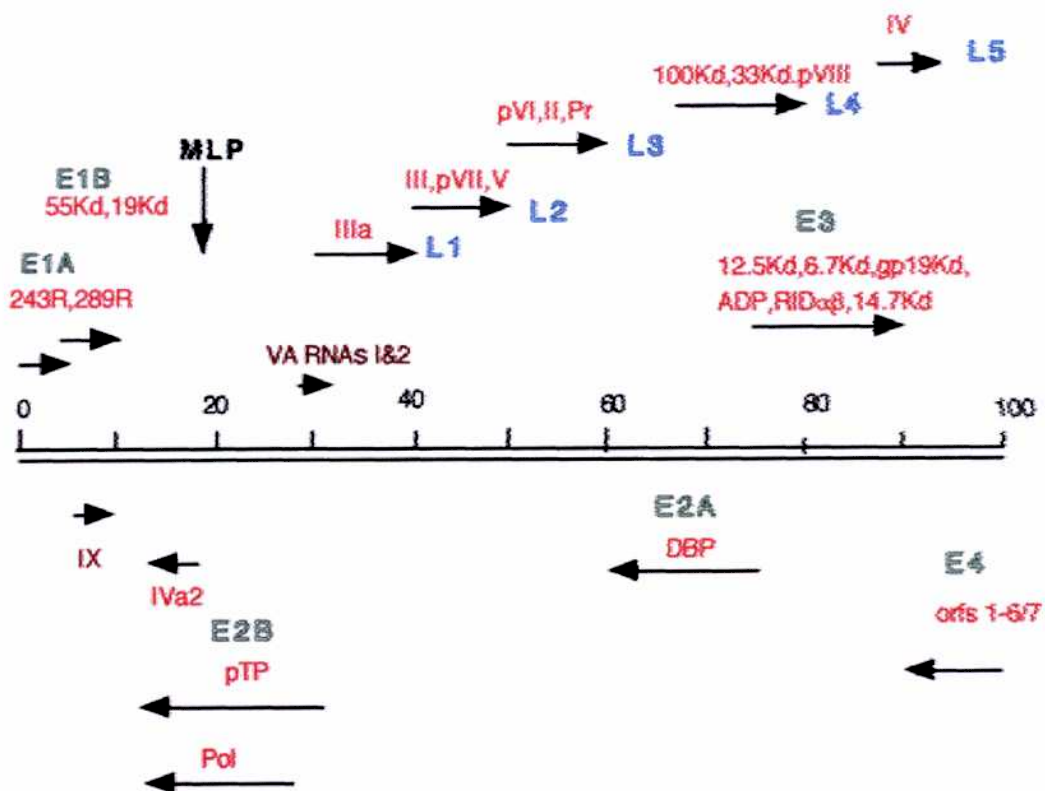


Figura 11: Expresión del genoma en Adenovirus. Los transcritos tempranos se marcan en verde, los tardíos en azul, en marrón la ubicación de los genes VA RNA y en rojo las proteínas que codifica cada uno. Las flechas indican la dirección de la transcripción. MLP: *Major late promoter*, promotor tardío mayor. Modificado de Russel, 2000.

Expresión de genes tempranos

En general, la expresión génica temprana tiene tres objetivos:

1. Inducir la entrada de la célula en fase S del ciclo celular, dándole al virus un ambiente óptimo para su replicación.
2. Generar mecanismos de escape que protejan la célula infectada de la defensa antiviral del organismo.
3. Sintetizar proteínas virales necesarias para la replicación.

E1A codifica dos proteínas que activan la transcripción e inducen la entrada de la célula en fase S del ciclo celular; E1B codifica a su vez dos proteínas que previenen el arresto mediado por p53 de la fase G1 y bloquean la apoptosis; E2 codifica tres proteínas que modifican la replicación del DNA; E3 expresa productos que modulan la respuesta del hospedador a la infección y la familia de RNAm tardíos está involucrada en la producción y ensamblado de la cápside viral. Sólo E4 codifica proteínas para funciones diferentes: mediadores de la regulación de la transcripción y transporte del RNAm y moduladores de la replicación del DNA y apoptosis.

El producto del gen E1 se subdivide en E1A y E1B. El primer RNAm y proteína que se detecta ~1h luego de la infección es **E1A** (inmediatamente temprana). Esta proteína es un factor transcripcional que actúa en trans sobre los demás genes tempranos (transactivador) siendo capaz de activar la transcripción de promotores tanto virales como celulares de manera secuencia inespecífica, modificando el entorno celular (Cann, 1997).

E1A tiene dos componentes principales en 5' y en 3' llamadas 289R (o 13S) y 243R (o 12S), en base al número de residuos de aminoácidos o en base al coeficiente de sedimentación del RNAm que las codifica. Ambas se generan por splicing alternativo dando productos con 46 aa de diferencia que comparten motivos conservados CR1, CR2 y CR3 separados por secuencias no conservadas. Durante la fase tardía del ciclo infeccioso se acumulan 3 RNAm adicionales para E1A con función desconocida.

Los productos de E1A modulan el metabolismo celular tornando a la célula más susceptible a la replicación viral. El metabolismo de la célula se caracteriza básicamente por llevar a una división celular precisa reteniendo intactas las funciones celulares. Diversos mecanismos ayudan a que este proceso no sufra interferencia externa y a la remoción de las células defectivas. El primero invoca al sistema inmune innato y adaptativo, mediante la regulación del factor de transcripción NF- κ B, y el segundo opera llevando las células a apoptosis por numerosas rutas, siendo una de ellas el factor transcripción p53 (Russell, 2000; Shenk, 2001).

Brevemente, NF- κ B es un transactivador nuclear que es liberado en el citoplasma por clivaje proteolítico de su factor inhibitorio asociado, I κ B migrando hacia el núcleo y activando los genes de respuesta NF- κ B, entre otros el promotor del gen E3. La fosforilación de por el complejo kinasa, IKK, resulta crucial para la proteólisis de I κ B (Hiscott *et al.*, 2001).

La proteína p53 es un supresor de tumores que regula la transcripción de numerosos genes relacionados con el arresto del ciclo celular y la apoptosis. En células normales, p53 está presente en bajas cantidades, pero sus niveles

aumentan en respuesta a daño genético response y otras injurias. La regulación de los niveles de p53 se realiza a nivel proteico, utilizando la proteína celular mdm2, que se une a p53 actuando como ubiquitina ligasa, llevando a p53 al proteosoma para degradación. Otra proteína celular, p19arf, contribuye a este sistema uniéndose a mdm2, bloqueando su actividad ligasa y estabilizand a p53. Un factor adicional es que p53 puede ser activado por la proteína SUMO (*small ubiquitin-like modifier*).

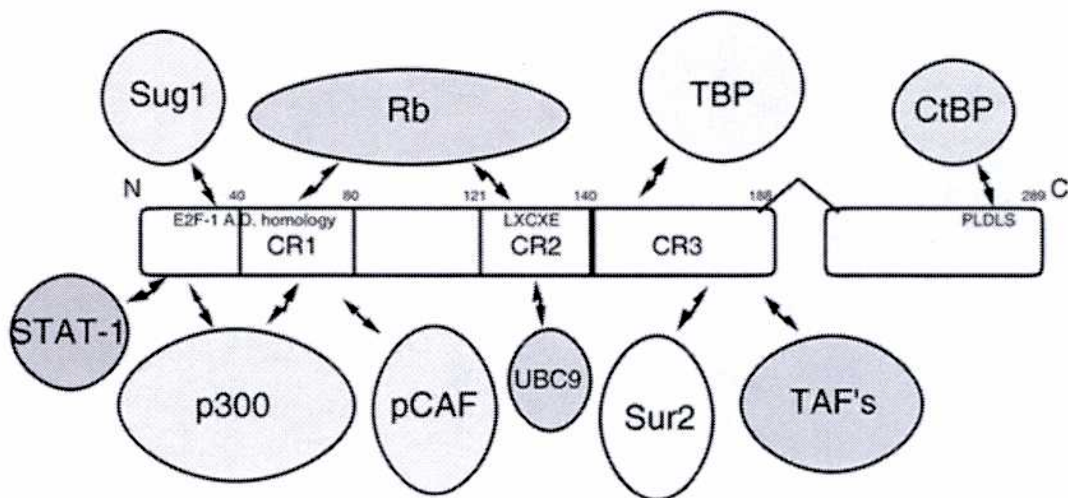


Figura 12: Unión de proteínas celulares a E1A. PLDLS y LXCXE son motivos de reconocimiento. E2F-1 A.D. *homology* se refiere a secuencias que desplazan E2F-1 de Rb y p300. Modificado de Russell, 2000.

La proteína E1A interacciona con: (Figura12)

- Se une a p21 e inhibidores ciclina kinasa dependientes (CDK), estimulando división celular y crecimiento. Se une a ciclinas A y E (complejos CDK), que regulan el pasaje a fase celular S (síntesis de DNA).

- Se une a la familia de transactivadores p300/CBP, que regulan la transcripción celular. Así modula la actividad asociada con acetiltransferasas p300/CBP (pCAF), alterando el nucleosoma. Inhibe la actividad del transactivador STAT-1, requerido para la inducción de la respuesta interferón y la activación de la apoptosis vía caspasas independiente de p53.
- Se une a la familia de proteínas de oncogenes Rb/p130, interfiriendo en la actividad acetiltransferasa de Rb y promoviendo la activación de transcriptos como E2F; crítico para la síntesis de componentes de la fase S. Luego de la unión a pRb, la liberación de E2F y ETF lleva a la transcripción de p53 y p19arf. Así promueve la síntesis de p53 y mantiene su integridad.
- E1A secuestra CBP, que en células normales evita la unión de mdm2, activando a p53.
- E1A se une a UBC9, proteína del SUMO activando p53
- Interacciona vía motivos PLDLS con la proteína CtBP que se une a su vez a Rb y funciona como co-represor transcripcional
- Interacciona con el complejo multiproteico Sur-2 estimulando la transcripción de genes virales.
- Se une a *TATA-box-binding protein* (TBP) y *TBP-associated protein* (TAF) regulando la transcripción de genes celulares.

E1A también bloquea la vía de NF- κ B interfiriendo en los procesos de regulación del ciclo celular (Figura 13).

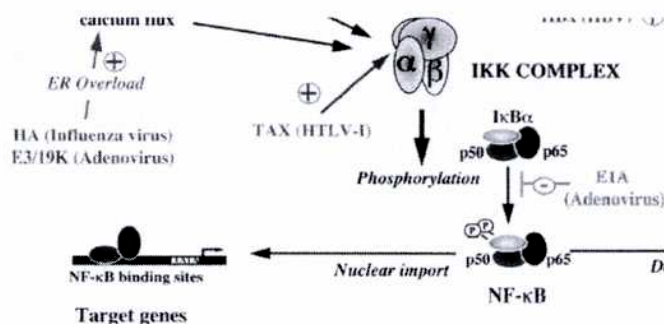


Figura 13: Interacción de E1A con NF- κ B. Modificado de Hiscott *et al.*, 2001.

Adicionalmente otras proteínas virales modulan y cooperan con la actividad de E1A como E4, y E1B.

E1B codifica 2 proteínas de 19 kDa y 55 kDa no relacionadas en secuencia de aminoácidos. Estas dos proteínas actúan de manera independiente y por mecanismos diferentes pero ambas tienen función anti-apoptótica. La proteína E1B 58 kDa directamente detiene la actividad supresora de tumores de p53 inhabilitándola para transactivar la transcripción. E1B 19-kDa inhibe apoptosis por un mecanismo similar a la proteína bcl-2 involucrada. En la supervivencia celular por interacción con miembro de la familia Bax (de transcripción promovida por p53) que induce apoptosis y necrosis.

En la Figura 14 se resume la acción sobre la célula infectada de E1A y E1B.

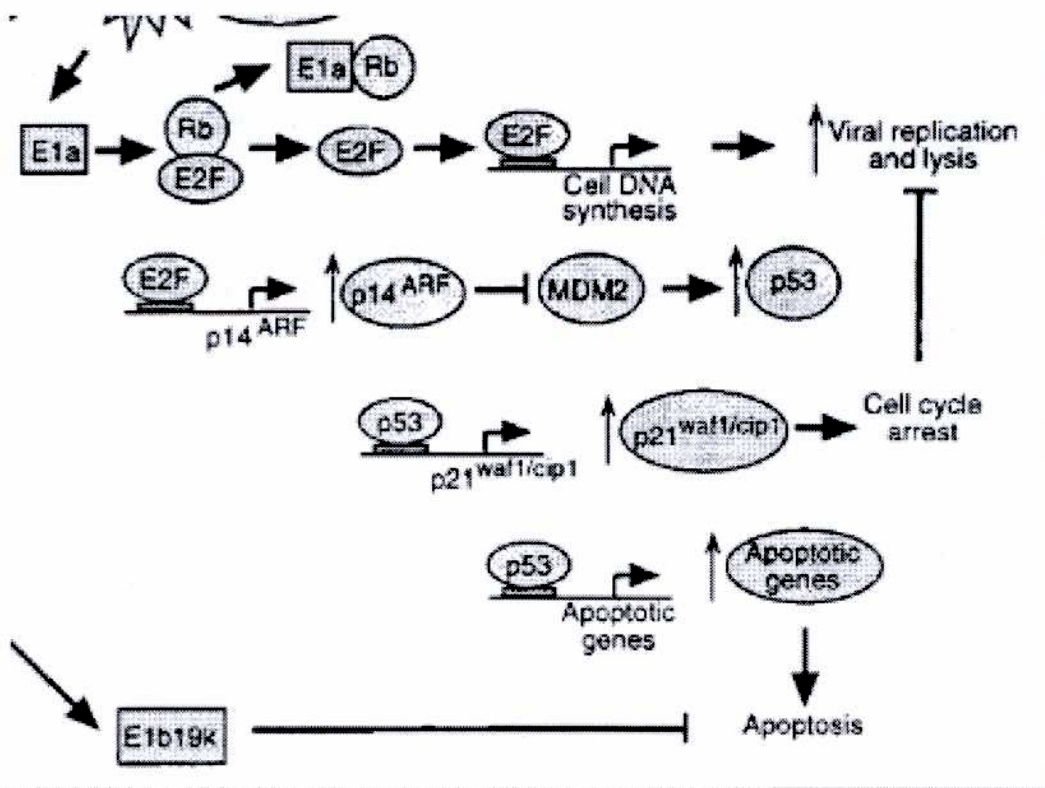
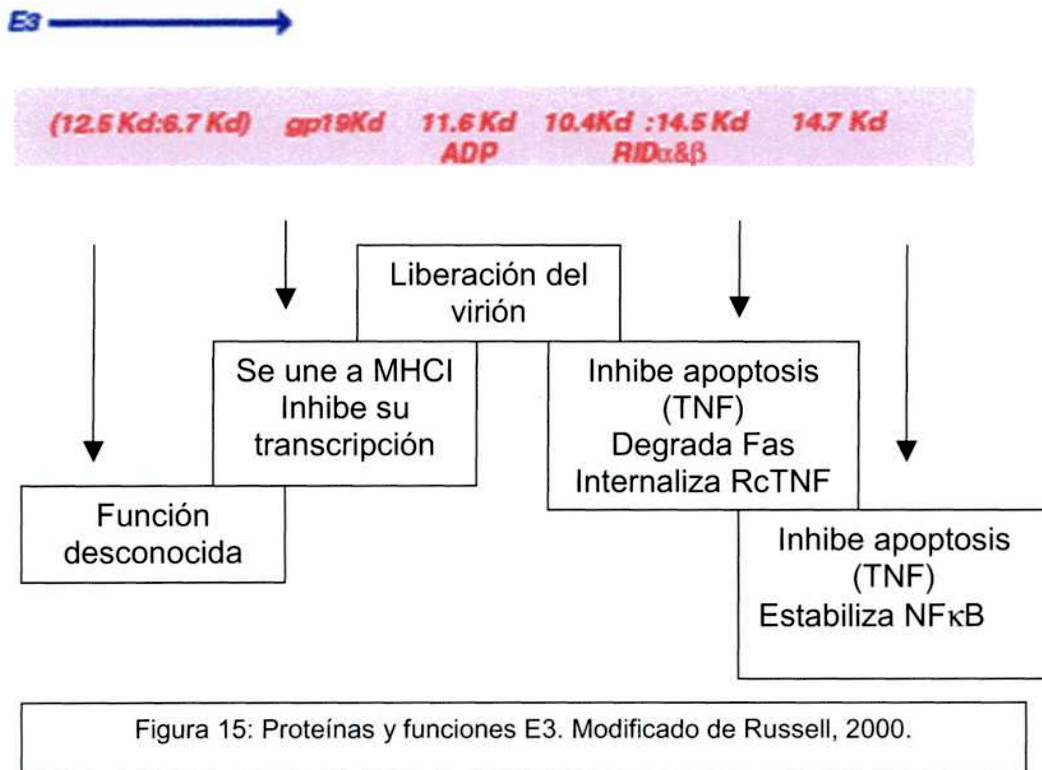


Figura 14: Interacción de E1A y E1B con célula hospedadora. Modificado de Dix *et al.*, 2001.

El gen E2 se divide en dos partes: E2A (DBP) y E2B (pTP y Pol). Provee la maquinaria para la replicación del DNA viral y la transcripción subsiguiente de los genes tardíos

Otras proteínas virales modulan mecanismos de apoptosis, mayormente los productos derivados de la unidad de transcripción E3. Existen 7 proteínas E3, ninguna de ellas es esencial para la replicación en cultivo de células, implicando que su función está relacionada con el bloqueo del sistema inmune. Una de estas proteínas (*Adenovirus death protein=ADP*) facilita la citólisis y liberación de los virus progenie. E3-gp19K, conservada en todos los Adenovirus respiratorios, es la primera línea de defensa contra CTL, se localiza en la membrana celular y se une a todos los MHC clase I evitando su transporte a superficie para ser reconocida por los CTLs. Los Adenovirus que infectan tracto gastrointestinal carecen de esta proteína, pero *downregula* el MHC clase I reprimiéndolo a nivel transcripcional, mediante E1A. Otras proteínas E3, RID y E3-14.7K inhiben apoptosis inducida por CTL en células infectadas. E3 permite a los Adenovirus evadir la respuesta inmune del hospedador (Figura 15) (Russell, 2000).



Los productos del *cassette* E4 se llaman orfs 1–6/7 y principalmente facilitan el metabolismo de RNAm viral en asociación con E1B promueven la replicación del DNA viral y el *shutoff* de la síntesis proteica celular. Se asocian también a la resistencia a lisis por CTLs. Se han asociado a proteínas kinasas activadas por DNA evitando la concatenación del DNA viral, como lo hacen bajo activación de p53 sugiriendoun bloqueo de la apoptosis. E1B y E4 contrarrestan las actividades de E1A. E4 orf4 inhibe la activación del promotor E2F. E4 orf6 tiene un efecto directo en la transactivación de p53 por interacción con E1B 55k cuando se une a p53, liberándolo para su degradación. E4 orf3 alivia la inactivación de p53 por E1B (Figura 16).

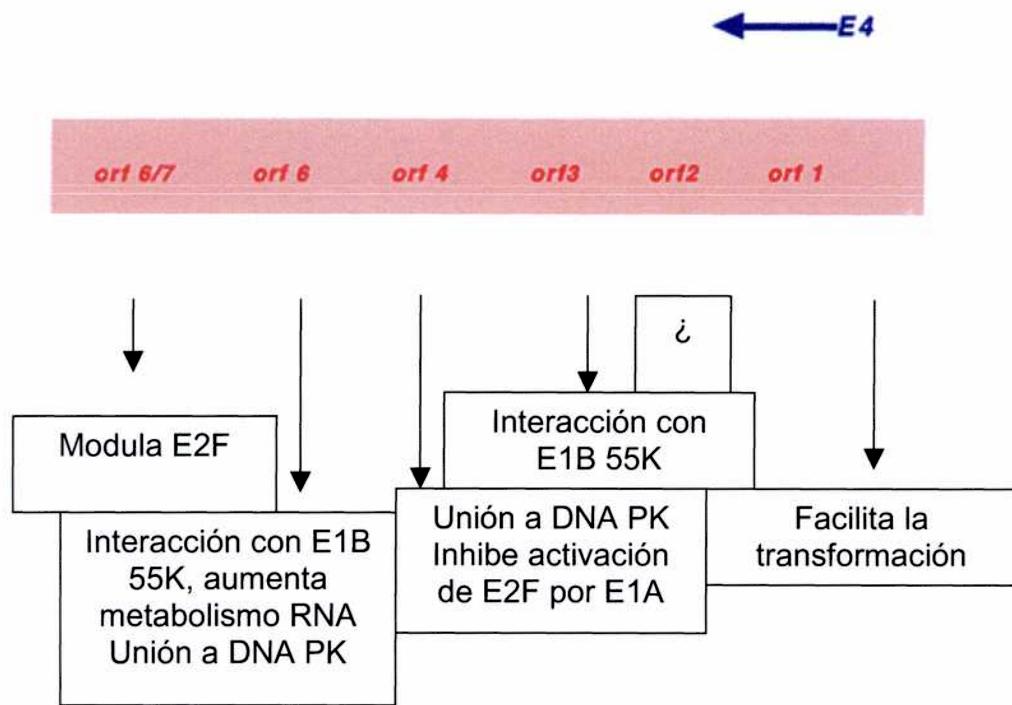


Figura 16: Proteínas y funciones de E4. Modificado de Russell, 2000.

Todas las observaciones hechas indican que los Adenovirus, en el curso del ciclo infeccioso secuestran la maquinaria celular y alteran el ambiente celular para favorecer la replicación viral, teniendo profundos efectos en las funciones celulares normales. En la Figura 17 se resume lo explicado hasta el momento.

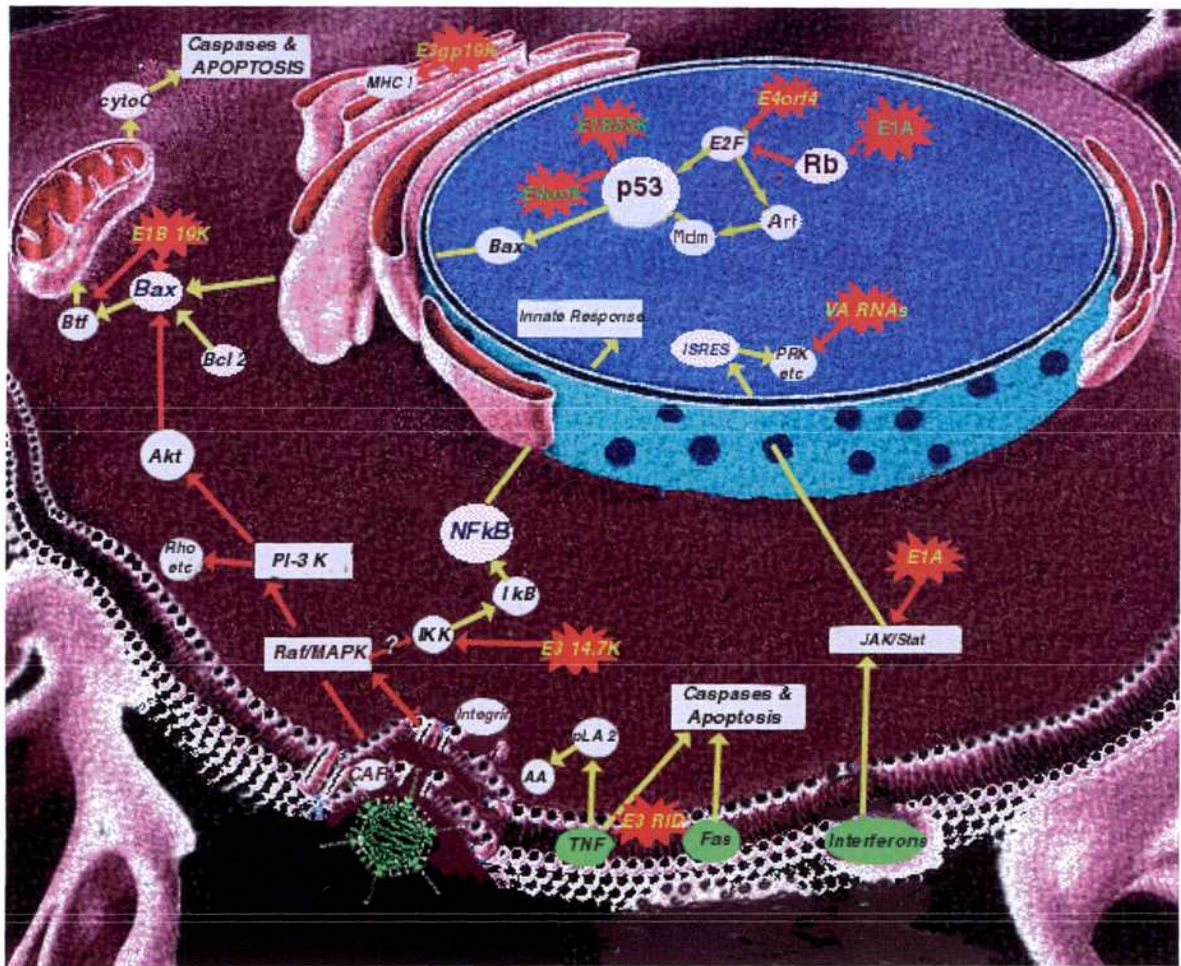


Figura 17: Mecanismos de interacción del Adenovirus con la célula.
Modificado de Russell, 2000.

Replicación del DNA Viral

Con la acumulación de las proteínas de E2 comienza la replicación del DNA 5-8 horas post-infección y continúa hasta la muerte de la célula.

Activación de expresión de genes tardíos y *shutoff* celular

Una vez que los RNAm tempranos se sintetizaron se traducen en polisomas junto con los RNAm celulares. Inicialmente, no tienen ninguna ventaja competitiva, pero luego de la replicación del DNA, al entrar en la fase tardía, los RNAm celulares son excluidos de los polisomas.

Los genes tardíos comienzan a ser expresados de manera eficiente al comienzo de la replicación del DNA viral. Las regiones tardías están organizadas en una sola unidad de transcripción grande cuyo transcripto primario tiene 29,000 nucleótidos. Este transcripto se procesa por *splicing* alternativo o uso de diferentes sitios poly(A) para generar múltiples RNAm, agrupados en 5 familias L1 a L5, según el uso de sitios de adición poly(A) común. La expresión de esta amplia familia de RNAm se halla bajo el control del promotor tardío principal o *major late promoter*. Este promotor tiene actividad baja pocas horas post-infección pero luego se vuelve varios cientos de veces más activo

Cuando comienza la replicación del DNA y se sintetizan todos los RNAm tardíos, la acumulación citoplasmática de RNAm celular se bloquea aunque la síntesis y procesamiento de los transcriptos celulares continúe, sugiriendo que el transporte está bloqueado. Este proceso está mediado por E1B 55-KD y por E4 34-KD que existen como complejo. Las mismas proteínas son esenciales

para una acumulación RNAm viral citoplasmática eficiente post infección. Sólo RNAm para β -tubulina continúa acumulándose en el citoplasma pero no es traducido. Varios componentes regulatorios cooperan para facilitar la traducción selectiva de los RNAm virales tardíos post infección. El primero involucra a proteína kinasa celular R (PKR), activada por RNA doble cadena. Los VA RNAs inhiben la activación de la PKR, protegiendo la síntesis de proteínas virales y proveyendo una compartimentalización funcional.

Finalmente, hay una activación selectiva de la síntesis proteínas virales tardías por la proteína L4 100-kd que puede unirse a RNAm, funcionando en el polisoma favoreciendo la traducción (Shenk, 2001).

El ensamblado ocurre en el núcleo, pero comienza en el citoplasma cuando los monómeros individuales forman los capsómeros hexón y pentón. Las cápsides vacías inmaduras a partir de estos protómeros son ensambladas en el núcleo, donde se forma el core de DNA genómico asociado a proteínas del core. La infección puede ser lítica facilitada por la proteína ADP (*adenovirus death protein*) (E3-11.6K), que también induce apoptosis. Las partículas virales tienden a acumularse en el núcleo y se visualizan en el microscopio como cristales eosinófilos llamados cuerpos de inclusión (Figura 18). Se cree que son la base de las infecciones latentes siendo la reactivación provocada por lisis accidental de las células infectadas, liberando partículas virales desde el núcleo. Este tipo de mecanismo de persistencia se conoce más como infección oculta.

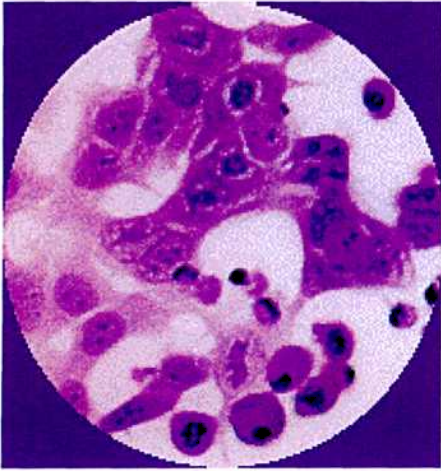


Figura 18: Infección lítica por Adenovirus. Las células infectadas con Adenovirus tienen afinidad por la Hematoxilina (colorante azul-purpúreo). Las células infectadas se redondean y la monocapa se desintegra. Las inclusiones basofílicas oscuras en el núcleo representan el cúmulo de proteínas virales en el sitio de ensamblado del virus.

Descripción del hexón:

El hexón es un homotrímero, consistiendo cada monómero en una proteína compleja de aproximadamente 900 aa. El estudio por cristalografía de rayos X y microscopía electrónica del trímero (hexón) de AV2 revela una base densa hexagonal que contiene tres copias de los dominios P1 y P2 (internos), desde la cual se proyectan tres *loops* superficiales: L1, L2 y L4, que contienen varios epitopes. De los tres *loops*, L1 es el más largo y complejo, proyectándose hacia el exterior, lo que le permite una mayor interacción con el medio (Figura 19) (Roberts *et al.*, 1986; Stewart *et al.*, 1991 y Athappilly *et al.*, 1994).

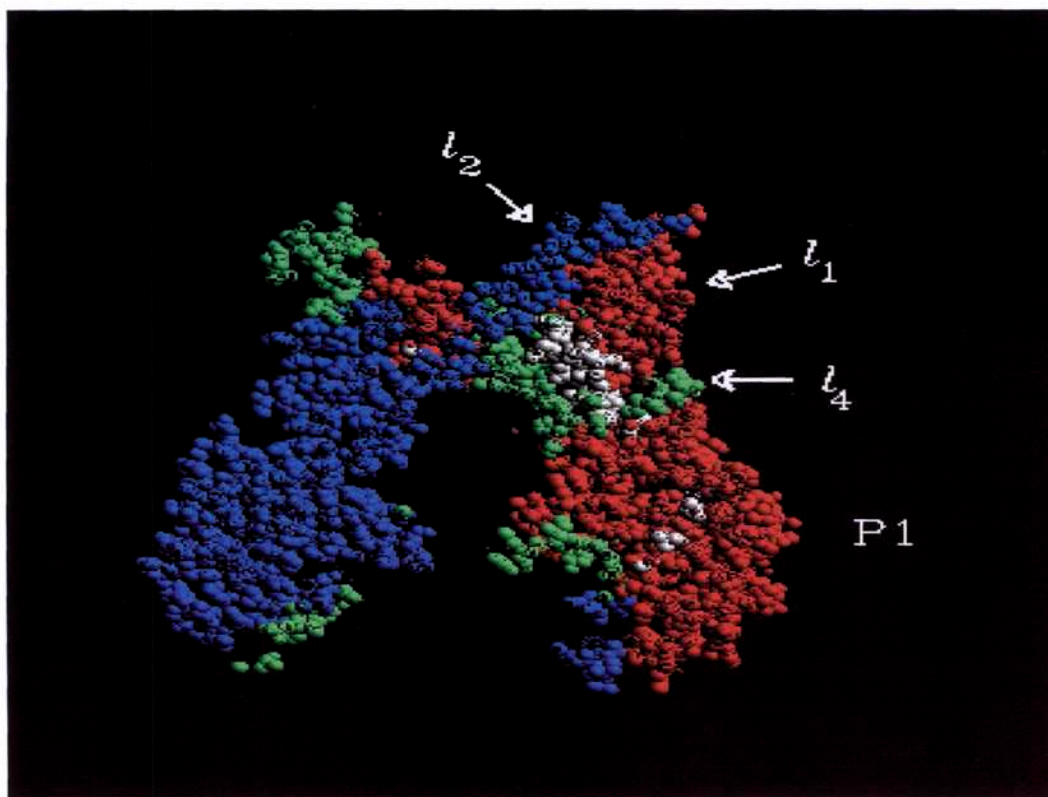


Figura 19 :Estructura del Hexón de Adenovirus. Tomado de San Martin & Burnett (2003).

El gen del hexón se ubica entre 0.51 y 0.6 unidades de mapa de la hebra positiva del genoma y se puede dividir en tres segmentos diferentes: una región variable central (nucleótidos 403-1356) y dos regiones altamente conservadas en los flancos. Las regiones más variables se hallan en L1 y L2 (entre los nucleótidos 403-912 y 1219-1356) (Li y Waddell, 1999). L1 y L2 son determinantes de serotipo y L4 es determinante de subgénero. El loop interno L3, en cambio, es compartido por serotipos de los subgéneros B, E y F (Pring-Akerblom *et al.*, 1995). Dentro de la región variable se definen siete regiones hipervariables (HVR) que difieren tanto en secuencia como en longitud. Las HVR 1 a 5 se ubican en L1 y HVR 7 en la punta de L2. HVR1 tiene la mayor variabilidad, relacionada con el tropismo (Crawford-Mikszta *et al.*, 1996).

HVR1 y HVR6 constituyen la base de L1; se ha sugerido que su variabilidad puede compensar el efecto topológico de otros cambios en la proteína. La variable longitud de HVR4 y HVR5 sugiere mecanismos de inserción en ellas (Figura 20) (Crawford-Mikszta *et al.*, 1996).

La neutralización es específica de serotipo y se dirige a los epitopes ϵ . Una sola molécula de anticuerpo anti-hexón por virión es necesaria para neutralizar la infectividad. L1 y L2 parecen buenos candidatos para epitopes de neutralización conformacionales, no lineales, compuestos por dos o más HVRs (Crawford-Mikszta *et al.*, 1996 y Wohlfart *et al.*, 1988).

Las cepas intermedias y variantes genotípicas aparecen por recombinación entre dos serotipos parentales; además, el gen del hexón evoluciona rápidamente. Las HVR son *hotspots* para recombinación ilegítima (inserciones, deleciones, duplicaciones y translocaciones en regiones de

homología limitada) y para mutaciones de una sola base, mayormente en sitios ricos en purinas. Sectores de ADN donde una hebra es de polipurinas y la otra de polipirimidinas distorsionan la estructura de la hélice, volviéndose sitios determinantes de mutaciones (Crawford-Mikszta *et al.*, 1996).

Tipos genómicos de AV7

Por análisis de variaciones génicas en el hexón de los diferentes genotipos que integran el serotipo 7 se ha determinado la presencia de dos *clusters* genómicos

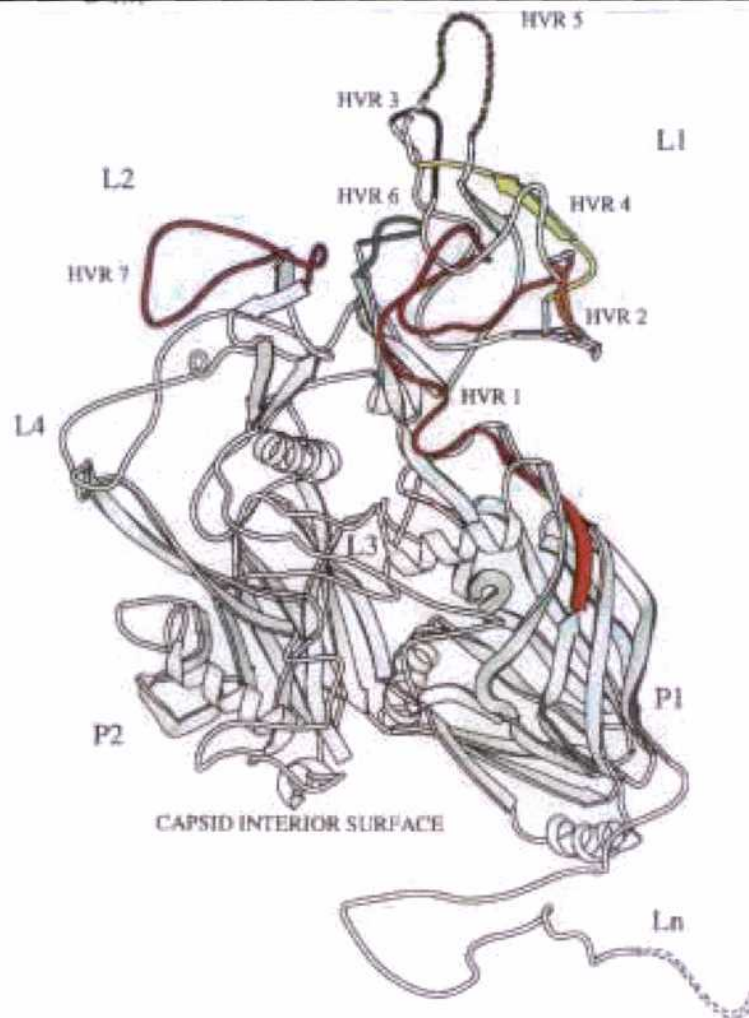
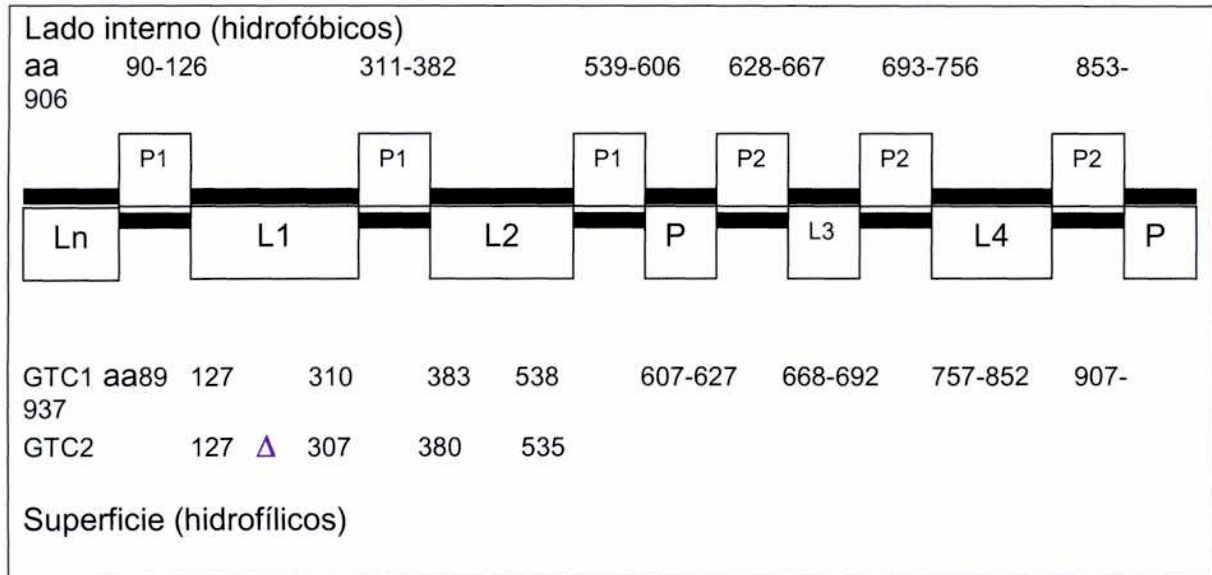
- *Cluster* de tipo genómico 1 (GTC1): incluye Ad7p y Ad7p1
- *Cluster* de tipo genómico 2 (GTC2): incluye Ad7b Ad7c Ad7d Ad7g y Ad7h

El grado de homología es mayor al 98% dentro de un *cluster* y entre 93 y 94.5% entre *clusters*. Dada la presencia de dos motivos repetidos cortos en el GTC2 se sugiere que éste podría derivar del GTC1 por recombinación ilegítima (13). Existe una deleción de 9 nt en L1 del GTC2 flanqueada por estas repeticiones cortas.

El prototipo del serotipo es la cepa Gomen (AV7p) perteneciente al GTC1, su hexón ha sido secuenciado completamente y consta de 2814 nucleótidos y la proteína de 937 aminoácidos (aa). Comparado con otros miembros del subgénero B es más corto (15 y 9 nucleótidos que AV3 y AV16 respectivamente) (Li Q. *et al.*, 1997)

La ubicación de las 7 HVRs de acuerdo al perfil hidropático se puede ver en la Figura 20.

Figura 20: a- Esquema del perfil hidropático del Hexón de Adenovirus.
 b- Esquema del hexón de Adenovirus. Abreviaturas: L (loop), P (pedestal), Pc (conector del pedestal), Ln (loop amino terminal) Tomado de Crawford-Miksza *et al.*, 1996.



Interacción con el huésped

Latencia

Los Adenovirus pueden mantener una asociación con su hospedador humano persistiendo por años luego de la infección inicial, probablemente en linfocitos. Existen tres proteínas que podrían facilitar la persistencia por antagonizar la respuesta antiviral del hospedador: E1A y VA RNAs, que inhiben la respuesta celular a interferon α y β , y las proteínas E3 que protegen las células infectadas de la muerte por CTLs y *tumor necrosis factor* (TNF). La infección latente por Adenovirus se ha postulado como elemento importante en la patogénesis de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (*chronic obstructive pulmonary disease*= COPD) que ocurre en adultos fumadores. Se encontró DNA E1A en células epiteliales, sugiriendo un rol en COPD. En estudios en niños, la infección persistente se asoció con asma y con enfermedad pulmonar crónica postviral (Hogg, 2001). El significado de estas observaciones requiere mayor estudio.

Se demostró que el promotor de E1A y los VA RNAs transcriptos por la RNA polimerasa III se expresan constitutivamente en células infectadas persistentemente, y el promotor E3 contiene varios sitios de unión para el factor de transcripción linfoide NF κ B, facilitando su expresión constitutiva en células linfoides. Estos genes virales protectivos se inducen en respuesta a interleuquina-6 (IL-6), quimocina producida en el sitio de infección. La transcripción de genes E2 se activa por IL-6 produciendo DBP (*DNA-binding protein*), que a su vez activa los promotores de E1A y E3 (Shenk, 2001).

Mecanismos de defensa

La morbilidad asociada con Adenovirus es baja y resulta evidente que existe una defensa bien orquestada del hospedador tanto innata como adaptativa

La respuesta innata está constituida por péptidos de 3–4 kDa llamados defensinas, quemoquinas que reclutan neutrófilos y macrófagos, activación de complemento y células NK (*natural killer*). La transcripción del factor NF- κ B es también importante en estadios tempranos de la infección activando la transcripción de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión (Russell *et al.*, 2000).

Antagonistas virales de Interferon α y β

Los interferones funcionan por unión a receptores celulares, activan las cascadas celulares de Jak/STAT, llevando los complejos STAT al núcleo donde se unen a elementos de respuesta a interferón (*interferon-response elements* =ISREs) en el DNA celular. Los ISREs regulan la transcripción de genes como la protein kinasa inducida por RNA doble cadena (PKR) y la 2'-5' oligoadenilato sintetasa (OAS) entre otros inmunomoduladores, que funcionan como respuesta antiviral. Diferentes serotipos de Adenovirus llevan uno o dos genes VA RNA; la especie C lleva 2 (VA RNA_I y VA RNA_{II}). La síntesis de VA RNA comienza durante la fase temprana del ciclo infeccioso y se acelera durante la fase tardía. La síntesis de una forma inactiva de PKR se induce por interferón, y se activa por la presencia de RNA doble cadena. PKR activada activa el factor de elongación eIF-2 α que secuestra eIF-2B y se

produce un arresto de la traducción (Ma y Mathews, 1996; Goodbourn *et al.*, 2000).

Antagonistas virales de linfocitos T citotóxicos (CTL) y TNF- α

La histopatología de la enfermedad pulmonar presenta dos estados. El primero se caracteriza por daño leve a moderado en células del epitelio bronquiolar y difusa infiltración celular en regiones peribronquiolares y alveolares. En ese estadio aparecen en tejido pulmonar infectado TNF- α , IL-1, e IL-6. El segundo estadio de la enfermedad consiste meramente en infiltración por linfocitos. Estos dos estadios de patogénesis resultan de una respuesta inicial no específica del hospedador a la infección viral que incluye síntesis de citoquinas seguida por respuesta específica CTL.

El reconocimiento y posterior lisis por CTLs de una célula infectada requiere que los antígenos virales se presenten en un contexto de MHCI en la superficie de la célula infectada. Las células infectadas que expresan E3 gp19-KD son menos sensibles a lisis mediada por CTL. Como señalamos anteriormente, esta proteína reside en la membrana del retículo endoplásmico y su dominio luminal se une directamente al dominio de unión a péptido de MHC I, reteniéndolo. CTLs portan Fas ligando en superficie celular e induce apoptosis cuando el Fas ligando interacciona con el receptor Fas (CD95) en la célula target. Las proteínas E3 bloquean la apoptosis mediada por Fas. E3 14.7-KD o el complejo E3 14.5-KD–E3 10.4-kd proteína puede evitar citolisis por TNF- α inhibiendo la activación de fosfolipasa citosólica A2, que actúa *downstream* del receptor de TNF- α . E3 14.7KD interacciona con FLICE

(caspasa 8) que actúa *downstream* de los receptores FAS y TNF, y esta interacción es la responsable del parte del bloqueo de apoptosis por ambos receptores. Se sugiere que existe reactividad cruzada en CTLs humanos para reconocer diferentes subgrupos de Adenovirus (Smith *et al.*, 1998).

Las células CD4 *helper* son importantes para la respuesta proliferativa a la infección, por reconocimiento de antígenos virales presentados en un contexto MHC clase II. Estas células T *helper* pueden estimular la proliferación de células B y proveer inmunoglobulinas para la respuesta humoral.

Respuesta humoral

La respuesta humoral es el componente principal de la defensa del hospedador y depende de la capacidad de reconocimiento de antígenos extraños por las células B. El reconocimiento mediado por células T *helper* inicia una masiva proliferación y libera inmunoglobulinas específicas para que interactúen directamente con los antígenos. Los anticuerpos neutralizantes se dirigen contra epitopes componentes de la cápside. Los 51 serotipos de Adenovirus humanos se clasifican en base a su capacidad neutralizante específica siendo la protección humoral muy restringida a cada serotipo (Russell, 2000; Valentine y Pereira, 2003).

Epidemiología

Entre los agentes causantes de infección respiratoria aguda en niños, los Adenovirus (AV) tienen un rol importante en la infección severa y/o fatal y en el desarrollo de enfermedad pulmonar crónica. Entre los serotipos de AV más frecuentemente aislados, los miembros del subgénero B, especialmente del serotipo 7 (AV7), han sido asociados con manifestaciones clínicas severas (Hogg, 2001).

Por análisis con enzimas de restricción los AV7 pueden subdividirse en varios genotipos diferentes abarcando desde 7a hasta 7i, con un patrón de distribución geográfica particular: AV7b en Australia, Europa y Estados Unidos; AV7c en Africa y AV7d en China (Kajon y Waddel, 1992).

Estudios epidemiológicos y del impacto clínico de enfermedades respiratorias por AV7 llevados a cabo en Argentina, Chile y Uruguay entre los años 1984 y 1990 revelaron que el 5,6% correspondía a AV7b, 9,9% a AV7c y 84,5% a AV7h. En ese estudio sólo AV7h se asoció a casos fatales de enfermedad respiratoria aguda, posiblemente dada su alta prevalencia y/o su alta patogenicidad (Kajon *et al.*, 1994).

La distribución temporal indica que ocurrió un desplazamiento de Ad7c, prevalente en 1984 hacia el genotipo 7h en 1986, el cual continuó siendo el predominante en los 10 años siguientes (Waddel *et al.*, 1985). Sin embargo, a partir de 1991 comenzó a aparecer otro tipo genómico (7i) que se asocia también a casos fatales (Mistchenko *et al.*, 1998.)

Diversos organismos poseen mecanismos endógenos de mutación, incluyendo recombinación ilegítima, los cuales les otorgan una ventaja para su supervivencia. Se ha sugerido que los AV han adoptado un mecanismo

evolutivo que les confiere capacidad de mutar en regiones inmunogénicas, lo que les permite escapar del sistema inmune del huésped y asegurar así su perpetuación (Crawford-Mikszta *et al.*, 1996). Sin embargo, se desconocen los mecanismos evolutivos precisos que han actuado en la diversificación de los AV7 y en la prevalencia de un tipo genómico sobre otro, a través del tiempo.

Patogénesis

Durante la infección por Adenovirus se producen inmunocomplejos circulantes que se depositan en riñón y pulmón, causando una respuesta inflamatoria que dificulta el intercambio gaseoso en la membrana alvéolo-capilar (Mistchenko *et al.*, 1992). Los niveles séricos elevados de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y TNF- α se correlacionan con una evolución desfavorable, explicando la similitud entre un cuadro séptico bacteriano y la infección diseminada por Adenovirus (Mistchenko *et al.*, 1994). En las infecciones severas o fatales hay una severa disminución de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y de efectores *natural killer*, con valores elevados del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra). A diferencia del resto de las citoquinas, el TGF- β 1 está significativamente elevado en pacientes con evolución favorable (Mistchenko *et al.*, 1998).

Desde el punto de vista histológico, durante el período agudo el virus se multiplica en bronquios pequeños y bronquiólos terminales, causando necrosis parcial del epitelio, con abundante cantidad de proteínas virales (fundamentalmente hexón) en los neumonocitos de tipo II y macrófagos alveolares (Ladenheim *et al.*, 1995; Hogg *et al.*, 1989). Estas alteraciones están a menudo asociadas con áreas de atelectasia, dando el patrón

característico de daño alveolar difuso. El análisis de la matriz extracelular muestra un discreto incremento de las fibras intersticiales reticulares, junto con colágeno y fibras elásticas, más pronunciado en las paredes de los bronquiolos respiratorios y ductos alveolares. Los septos intraalveolares muestran una red delicada de fibras colágenas de tipo I y III (Rosman *et al.*, 1996).

En las etapas finales de la infección, la cantidad de células infectadas que expresan antígenos virales es pequeña y el daño está conformado por fibrosis extensa y difusa del parénquima pulmonar, bronquios, bronquiolos terminales y respiratorios y septos alveolares, con paredes engrosadas, proliferación de células similares a fibroblastos, positivas para vimentina y α -actina de músculo liso, usualmente llamadas miofibroblastos (Rosman *et al.*, 1996). La diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto se asocia con la expresión de α -actina de músculo liso (Thibeault *et al.*, 2000). Los miofibroblastos son células del intersticio pulmonar de mamíferos y proliferan en el tejido pulmonar con fibrosis. A menudo, los bronquios y bronquiolos muestran hiperplasia epitelial o metaplasia escamosa, algunas veces asociada con hipertrofia de las uniones parietales de las células del músculo liso. Los abundantes infiltrados linfomonocitarios en las paredes alveolares y lesiones residuales de fibrosis septal sugieren la participación de mecanismos de daño adicionales a la lesión que *per se* produce el virus. Estos mecanismos podrían intervenir en la patogénesis de la enfermedad. El análisis de la matriz extracelular muestra un incremento de distribución aleatoria de las fibras de colágeno tipo I y III en los septos intraalveolares, con aumento difuso de la red de reticulina. El TGF- β 1 estimula la

diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto por un mecanismo antiapoptótico, lo que contribuiría al efecto fibrogénico de esta citoquina (Zhang y Phan, 1999).

El desarrollo del modelo animal para el estudio de la patogenia de la infección por Adenovirus, en la rata *Sigmodon hispidus*, mostró un patrón similar, y permitió dividir la infección dos fases (Prince *et al.*, 1993; Ginsberg *et al.*, 1991). Una temprana, que aparece en las primeras 24 horas, se caracteriza por la acumulación de neutrófilos, macrófagos y monocitos en los alvéolos pulmonares. Comienza con el influjo de polimorfonucleares en las primeras 6 horas, llegando a un máximo a las 24 horas. Es reemplazado por un infiltrado mononuclear compuesto de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y fagocitos mononucleares, que llega al máximo al 5° día, fase tardía. La eliminación del virus también sigue un curso bifásico, con una fase de eliminación rápida en la cual se clarifica el 60% del virus dentro de las primeras 24 horas, seguida de una fase lenta en la cual el DNA viral se detecta por semanas o meses. Mientras en la fase temprana la eliminación sería efectuada por polimorfonucleares neutrófilos, en la tardía intervendrían los linfocitos T citotóxicos (CTL), eliminando las células infectadas.

Naturaleza del aporte original proyectado

Los Adenovirus constituyen aproximadamente el 4-9% de los agentes etiológicos de la infección respiratoria aguda baja (Viegas *et al.*, 2003). Los serotipos 3, 7 y 21, pertenecientes al subgénero B, están frecuentemente asociados con infección severa y/o fatal y con daño pulmonar residual, en particular la entidad conocida como "enfermedad pulmonar crónica" (*chronic lung disease*) (Macek *et al.*, 1994; Wenman, 1982). Estos rasgos diferencian la infección por Adenovirus de las causadas por otros virus respiratorios, siendo especialmente característicos de ciertos serotipos. Desde el aislamiento de la cepa prototipo de Av7 (Av7p) en 1958, se ha descrito 20 tipos genómicos diferentes, distribuidos en todo el mundo (Wadell, 1984; Wadell *et al.*, 1985). Estudios de epidemiología molecular mostraron que desde el año 1984 hasta el presente el Adenovirus 7h circula en nuestro país y se encuentra frecuentemente asociado a infección severa y/o fatal (Niel *et al.*, 1991; Kajon y Wadell, 1992). Recientemente ha sido encontrado también en Brasil, Japón y EEUU (Erdman *et al.*, 2002; Hashido *et al.* 1999; Tanaka *et al.*, 2000).

Por otra parte se conocen las secuencias completas de sólo 4 de los 51 Adenovirus humanos AV2, AV5, AV 11, 12 y AV40 y de varios Adenovirus que afectan otras especies de Vertebrados como el Adenovirus Aviar CELO y Adenovirus canino 1 entre otros (Gingeras *et al.*, 1982; Roberts *et al.*, 1984; Chroboczek *et al.*, 1992; Chiocca *et al.*, 1996; Morrison *et al.*, 1997, Stone *et al.*, 2003). Mientras el número de secuencias disponible aumente, mejor será la predicción sobre el origen y la evolución de los Adenovirus.

Materiales y métodos.

Materiales y métodos

Muestras y datos epidemiológicos:

Para la determinación de la secuencia completa se empleó el stock original de la cepa patrón de Adenovirus serotipo 7 genotipo h (cepa 87-922) que fue aislada en 1987 en el Laboratorio de Virología del Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez a partir de un aspirado nasofaríngeo de un paciente con neumonía. La misma fue caracterizada por restricción enzimática (Niel *et al*, 1991; Kajon y Waddell, 1992).

Adicionalmente para el estudio de polimorfismos del gen hexón se estudiaron retrospectivamente muestras que fueron remitidas al Laboratorio de Virología del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez por distintas instituciones de la Ciudad de Buenos Aires y conurbano bonaerense entre los años 1999 y 2002 para el análisis de etiología en infecciones respiratorias agudas. Se recuperaron también muestras del año 1990 (1 muestra de evolución fatal), 1991 (1 muestra de evolución fatal), 1992 (2 muestras de casos fatales) y 1998 (1 muestra caso grave). Las secreciones nasofaríngeas (SNF) de pacientes hospitalizados fueron enviadas junto con una ficha epidemiológica y procesadas en el día por técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta (IFI) para detectar Adenovirus (AV), Virus Sincicial Respiratorio, Parainfluenza 1-2-3, e Influenza A y B. Las secreciones fueron conservadas en freezer a -20 °C para su posterior estudio. Los datos epidemiológicos y clínicos se organizaron en bases de datos (Epi6 y MS Excel).

Datos meteorológicos

Se obtuvieron datos de temperaturas medias mensuales (°C), humedad relativa media (%) y radiación solar UVB (dosis eritémica mínima en piel sensible blanca tipo II) del Servicio meteorológico Nacional (Fuerza Aérea Argentina). Los datos se graficaron y se realizó un test de correlación de Spearman para evaluar la relación existente entre los parámetros meteorológicos y la frecuencia de los Adenovirus. Para el cálculo de p se realizó un test a dos colas con un nivel de significación de 0.05. Se tomaron adicionalmente datos de 1998 para ampliar esta parte del estudio.

Cultivo y purificación de DNA

Para el estudio de los polimorfismos del gen hexón las muestras que resultaron positivas por IFI para Adenovirus fueron preservadas en *freezer* a -20°C hasta el momento de inoculación así como también aquellas muestras que presentaron clínica compatible con Adenovirus e IFI negativa. Previo al pasaje en células se procedió a la clarificación del material por centrifugación a 10000 r.p.m. por 30 minutos, luego se inocularon 200 μL del sobrenadante en botellas de 3 mL de cultivo de células 293 o Hep-2 (ATCC) mantenidas en MEM Hanks al 2% SFB y se observó diariamente hasta la aparición de efecto citopático. Se realizaron hasta tres pasajes en ciego antes de considerar un cultivo como negativo. Cuando el efecto citopático fue visible, se procedió al congelamiento del cultivo para su posterior análisis molecular. El DNA de las muestras 1990-2002 se extrajo con una resina comercial que secuestra los inhibidores de PCR presentes tanto en el cultivo como en el inóculo.

Para la secuenciación del genoma, se inoculó en células 293 la cepa patrón de Adenovirus 7h (87-922), llegando a un volumen total de 300 mL. Al tener

100 % de efecto citopático, las células se congelaron y se procedió a la purificación del virus en gradiente de Cloruro de Cesio. Brevemente, el cultivo se resuspendió en PBS y se centrifugó a 35000 r.p.m. en una ultracentrifuga por 3 hs., se resuspendió en Tris-HCl 20 mM y se agregó buffer TES (Tris-HCl 20 mM, pH8, EDTA 10mM, 0.5% p/V SDS) conteniendo RnasaA (10 µg/mL). Luego se incubó 30 min a 37 °C y se digirió con Proteinasa K (100 µg/mL) por 3 hs más. Se agregó NaCl hasta concentración de 1M y se incubó a 65 °C para reducir la viscosidad. Luego se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó con etanol. La pureza del DNA se midió por espectrofotometría (Tollefson *et al.*, 1998, Sambrook y Russell, 2001).

Obtención de biblioteca genómica de DNA viral

Se digirió de 1µg del DNA extraído con las enzimas de restricción *BamH I*, *Bgl II*, *Hind III* y *Sma I* por 1 h en el buffer correspondiente y a la temperatura indicada por el protocolo (37 °C para *BamH I*, *Bgl II* y *Hind III* y 25 °C para *Sma I*). Los fragmentos se corrieron en geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE a 4 °C por 3 hs se tiñeron con bromuro de etidio, se purificaron y clonaron en el plásmido pGemT (Zhou M. *et al.*, 1995). Se aplicó la fórmula siguiente para calcular la cantidad de inserto necesario para cada fragmento usando como constantes una relación molar inserto vector de 3:1, tamaño del vector 3 kb y 50 ng de vector en todos los casos.

$$\text{Inserto (ng)} = \frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)} \times \text{relación molar inserto vector}}{\text{Tamaño del vector (kb)}}$$

Se cotejaron los cortes esperados de acuerdo a Niel *et al.*, 1991

*Bam*H I: 10 fragmentos

Bgl II: 12 fragmentos

Hind III: 9 fragmentos

Sma I: 7 fragmentos

Se transformaron y plaquearon bacterias *E. coli* JM109 (*endA*⁻) competentes en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (sal de sodio 100ug/ mL), 0.5mM isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) y 80 ug/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-gal). Las colonias blancas obtenidas se propagaron en medio líquido LB-ampicilina (2 mL). Dada la heterogeneidad del tamaño de los fragmentos se usó para obtener una cantidad homogénea de DNA plasmídico un sistema de amplificación de DNA circular llamado *rolling cycling*. Este sistema utiliza hexámeros al azar como *primers* y la enzima Phi29 DNA polimerasa con actividad *proofreading*. Brevemente, los hexámeros al azar se unen al DNA circular en sitios múltiples, y la enzima polimerasa extiende cada uno de esos fragmentos. Cuando la enzima encuentra otro fragmento extendido, se desplaza y sintetiza un fragmento monocatenario que será alcanzado por los hexámeros al azar y usado como templado para la siguiente ronda de amplificación. El proceso continúa, la amplificación resulta exponencial y se realiza a temperatura constante (amplificación isotérmica a 30 °C). Puede usar como templados la colonia bacteriana, cultivo líquido, o *glycerol stock*. Se obtienen 1- 1.5 μg de producto final en 10μL (100-150 ng/μL) que se aplica directamente, sin necesidad de purificación posterior como templado de secuenciación rindiendo 5

reacciones de secuenciación por cada reacción de amplificación de DNA plasmídico.

Epidemiología molecular período 1990-2002:

Para el estudio de los polimorfismos del gen hexón, una vez obtenido el efecto citopático, se extrajo el ADN y se procedió a la caracterización molecular de la siguiente manera:

1. PCR genérica para confirmar el cultivo (Hierholzer *et al.*, 1993)
2. PCR especie específica (Xu *et al.*, 2000)
3. PCR-RFLP para determinar especie-*subespecie* y patrones de restricción enzimática (Kidd *et al.*, 1996)
4. PCR multiplex especie B:1 (Xu y Erdman, 2001)

Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 2% (p/v) en buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) teñidos con bromuro de etidio.

Se seleccionaron para este estudio sólo los Adenovirus serotipo 7, de diferentes años en el período 1990-2002.

Genotipificación de los AV7 del período 1990-2002

Se compararon las secuencias obtenidas entre sí y con las disponibles en bases de datos públicas (GenBank).

Se obtuvo una matriz de distancia con los componentes DNAdist para nucleótidos y Protdist para aminoácidos del *software* PHYLIP v3.5c (Felsenstein, 1989), que permitió establecer homologías entre las cepas y se analizó la presencia de marcadores distintivos de acuerdo a la gravedad del paciente.

Se construyó un árbol por el método de *Maximum-Likelihood* que refleje las relaciones filogenéticas entre las muestras tanto en hexones completos como

en la región hipervariable. Se visualizó el mismo con el programa Treeview v1.5.2 (Page, 1996).

Análisis de los polimorfismos hallados en el gen hexón entre 1990-2002

Las secuencias obtenidas se alinearon de afuera hacia adentro en una estrategia de tipo *contig* y los polimorfismos se analizaron con el programa DNASP v3.5 (Rozas y Rozas, 1999). La diversidad se midió como el número total de sitios segregantes o polimórficos (S) dividido la longitud del fragmento (L) dividido el número de ciclos de PCR aplicados (S/L/ciclos). La diversidad media se calculó como el número total de sustituciones sobre el tamaño del amplicón (S/L) y se expresó como porcentaje (S/L*100). Se calculó κ como la relación entre transiciones y transversiones. El coeficiente ω se determinó como el cociente entre las mutaciones no sinónimas y las sinónimas (d_{ns}/d_s). Las secuencias de aminoácidos fueron inferidas usando el código universal y analizadas con el componente Protean del programa Lasergene. Se tomó en cuenta si los cambios de reemplazo de aminoácidos fueron conservativos o no conservativos con respecto a la carga. Se consideró una sustitución como fijada cuando estuvo presente en todo el período analizado (desde la caracterización del AV7h en 1987 hasta 2002) y fijada sólo en muestras cuando no estuvo presente en la cepa patrón de AV7h pero sí en todas las muestras analizadas desde 1990 hasta 1999 para el hexón completo y 1999 hasta 2002 para la región hipervariable del hexón.

Todas las comparaciones se realizaron con respecto a la cepa prototipo del serotipo 7 (7p) cepa Gomen. Se analizaron por separado muestras con secuenciación completa del hexón (1990-1999) y muestras con región hipervariable secuenciada (1999-2002), tomando como corte de regiones

hipervariables los nucleótidos 403 a 1356 y los aminoácidos 136 a 452 (numerados de acuerdo al hexón de la cepa AV7p Gomen).

Diseño de *primers* específicos:

Los *primers* específicos fueron diseñados con el programa Primer Select del paquete de *software* Lasergene (DNASTar Inc., Madison WI). Se tuvo en cuenta para el diseño la estabilidad del *primer* (que no tuviera estructura secundaria) y su composición, ya que influye en temperatura de *annealing* y auto-apareamiento en dímeros.

Hexón

A partir del esquema de los *primers* conocidos para secuenciación (Takeuchi *et al.*, 1999) se diseñaron *primers* específicos a partir de la secuencia completa disponible del Adenovirus 7 patrón cepa Gomen (Figura 21).

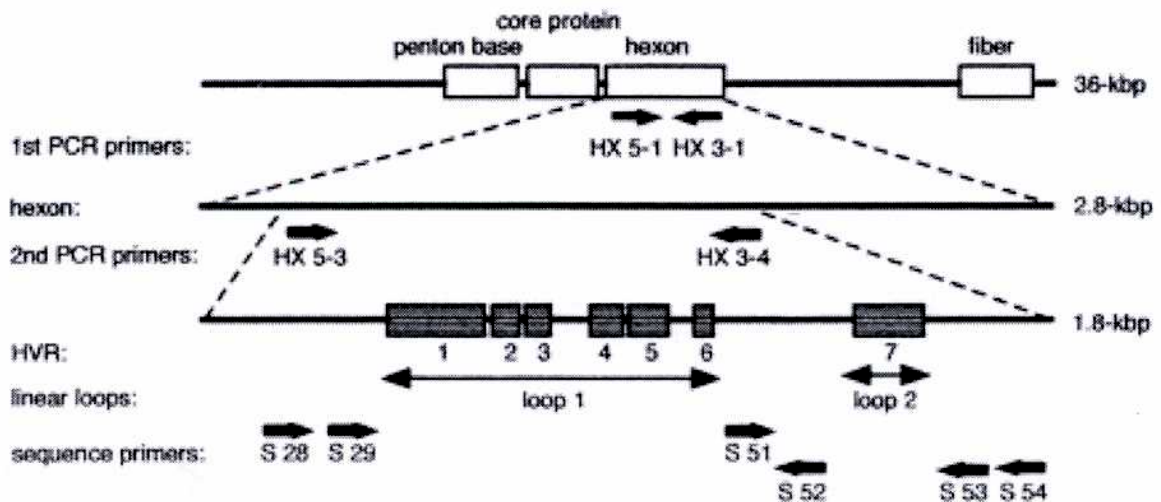


Figura 21: Esquema de la estrategia de secuenciación del gen hexón. Tomada de Takeuchi *et al.*, 1999.

Genoma AV7h

Las regiones del genoma que no pudieron ser secuenciadas por la estrategia de *shotgun* se secuenciaron usando productos de PCR generados con *primers* internos diseñados *ad hoc*.

Se tomaron como moldes principales para el diseño de *primers* las secuencias del prototipo de AV7 cepa Gomen disponibles en las bases de datos públicas. Para completar el genoma se tomó como molde la secuencia completa del Adenovirus especie B, prototipo serotipo 11, cepa Slobitski (Ad11p) (Stone *et al.*, 2003). Se tomaron subregiones para completar lo diseñado sobre AV7 cepa Gomen.

Se muestran en la Tabla 7 las regiones abarcadas por secuencias disponibles de AV7 Gomen y las subregiones tomadas como molde de AV11p.

| <i>Molde</i> | <i>GenBank</i> | <i>Región (pb)</i> |
|--------------|----------------|--------------------|
| AV7 Gomen | X03000 | 0-10704 |
| AV11p | AY163756 | 10600-13750 |
| AV7 Gomen | AD001675 | 13684-15367 |
| AV11p | AY163756 | 15100-18700 |
| AV7 Gomen | AF065065 | 18115-21387 |
| AV11p | AY163756 | 21000-27200 |
| AV7 Gomen | AF104382 | 26578-31899 |
| AV11p | AY163756 | 31300-34794 |

Tabla 7: Moldes tomados para el diseño de primers para amplificación y secuenciación del genoma del AV7h.

Amplificación por PCR y secuenciación

La amplificación por PCR fue realizada en termocicladores usando protocolo general (5 μ L de DNA, 1U *Taq* polimerasa, $MgCl_2$ 1.5 mM, KCl 50 mM, dNTPS 200 μ M, *primers* 0.2 μ M, 10 mM Tris-HCl pH8.3 concentración final) por 30 ciclos de 95 °C 20 seg, 50 °C 20 seg y 72 °C 1min. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 2% (p/v) en buffer TAE teñidos con bromuro de etidio.

Los productos de amplificación se purificaron con columnas comerciales y las reacciones de secuencia fueron realizadas de acuerdo al método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) con cada uno de los *primers* que correspondiere a una concentración de 10 μ M y los productos marcados con distintos fluorocromos se analizaron en secuenciador automático por electroforesis capilar. Se marcaron 300-500 ng de DNA para las regiones hipervariables y fragmentos genómicos, 800ng para los hexones completos y 1,2 ug para los insertos clonados por 30 ciclos de acuerdo al protocolo de secuenciación (95 °C 20 seg, 50 °C 20 seg y 60 °C 1min). Las muestras se inyectaron 112 seg a 2 kV y se corrieron por 5 hs a 6 kV.

Hexón

Los AV que resultaron tipificados como AV7 y la cepa patrón de AV7h (87-922) se analizaron por secuenciación para determinar su genotipo mediante una PCR de 2,8 kb (*primers* 5-1 y 3-1) con un sistema comercial que utiliza una mezcla de *Taq* DNA polimerasa y *Pfu* DNA polimerasa permitiendo tener un mayor rendimiento de la reacción e incorporando la actividad exonucleasa

3'5' (*proofreading*) (Figura 21). Para el análisis de los polimorfismos se llevó a cabo la amplificación de 953 pb. correspondiente a regiones hipervariables del gen hexón que permiten separar los AV7 en dos *clusters* genómicos: *Cluster* de tipo genómico 1 que incluye Ad7p y Ad7p1 y *Cluster* de tipo genómico 2 que incluye Ad7b Ad7c Ad7d Ad7g y Ad7h (Crawford-Miksza y Schnurr, 1996 y Li y Waddell, 1999). Una vez obtenido el producto de PCR, se llevó un volumen de 200uL que luego se purificó con columnas de sílica comerciales directamente o por recuperación de banda de gel agarosa de bajo punto de fusión al 1% (p/v) si se visualizaban productos no específicos adicionales. La imagen se digitalizó y se cuantificó con el *software* AlphaEase v5.04 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) por densitometría comparativa de la banda de gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio tomando como referencia marcadores comerciales de peso molecular y de masa conocidos.

Alternativamente se planificó una estrategia de clonado del producto de PCR obtenido en un vector pGemT (Zhou M. *et al.*, 1995). Para el tamaño del inserto de PCR (2,8 kb) fue necesario ligar 140 ng de inserto con 50 ng de vector linearizado. Esta estrategia se utilizó pensando en la conservación del material original de las muestras más viejas (1990-1999). Se transformaron y plaquearon bacterias *E. coli* JM109 (endA^-) competentes en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (sal de sodio 100ug/ mL), 0.5mM isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y 80 ug/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal). Las colonias blancas obtenidas se crecieron en medio líquido LB-ampicilina (25 mL) y el DNA plasmídico se obtuvo por una preparación de volumen medio en columnas comerciales. Se verificó la

presencia del inserto por corte con *EcoR* I 1h a 37°C y resolución en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en buffer TAE. Se aplicó el mismo protocolo de cuantificación que el usado para los insertos de PCR.

Genoma AV7h

Secuenciación de los clones obtenidos de la biblioteca genómica

El DNA plasmídico se secuenció en equipo automático capilar usando *primers* universales (*forward* y *reverse* de M13, T7 y Sp6). De acuerdo a los procedimientos estándar de la estrategia de *shotgun*, para tener certeza de los resultados obtenidos sería necesario secuenciar 375 clones con insertos de 800 pb cada uno (Sambrook y Russell, 2001).

PCR para genoma AV7h

Se estandarizó un protocolo general de PCR y se obtuvieron fragmentos desde 400 a 1200 pb. se llevó un volumen de 200uL que luego se purificó con columnas de silica comerciales directamente o por recuperación de banda de gel agarosa de bajo punto de fusión al 1% (p/v) si se visualizaban productos no específicos adicionales. La imagen se digitalizó y se cuantificó de la misma manera que lo explicado anteriormente para el hexón.

Análisis de secuencias del Genoma de AV7h

Los electroferogramas obtenidos se visualizaron con el programa Chromas (v 1.45, 32-bit) de la Universidad de Griffith (Queensland, Australia), se alinearon con el programa ClustalX v1.83 (Thompson *et al.*, 1997) y se analizaron con los distintos componentes del paquete Lasergene (DNASTar Inc., Madison WI) y Phylip v 3.5c (Felsenstein, 1989).

Datos de biblioteca genómica

Para el ensamblado de las secuencias obtenidas se adoptó una estrategia de tipo *contig* donde se alinean los fragmentos secuenciados teniendo en cuenta la calidad de la secuencia y la contaminación con secuencias provenientes del vector si las hubiera. Se determinaron las regiones faltantes y se solucionaron regiones de conflicto secuenciando con *primers* específicos.

Análisis de las secuencias nucleotídicas

Se determinó la longitud total del genoma, se calculó la frecuencia de las bases y el porcentaje de G+C, se ubicaron los marcos abiertos de lectura (ORF), regiones intergénicas, promotores, señales de *splicing* y poliadenilación por los programas ORF Finder (NCBI) y GeneMark v2.4. (Borodovsky y McIninch, 1993).

Deducción de la secuencia de aminoácidos de las proteínas virales

Se utilizó el código universal para inferir la secuencia de aminoácidos de acuerdo a los marcos abiertos de lectura predichos.

Análisis de recombinación

Se analizó la presencia de variantes intertípicas generadas por recombinación utilizando secuencias de referencia y los programas Simplot v2.4 y RDP v1.07 (Lole *et al.*, 1999; Martin y Rybicki, 2000).

Antigenicidad y homología con proteínas pulmonares

Se predecirá para las proteínas hexón, pentón, fibra y E1A los potenciales determinantes antigénicos (epitopes B y T) por métodos basados en la estructura tridimensional de la proteína y localización de regiones de mayor hidrofiliidad con la ayuda del programa Protean del *software* Lasergene.

Se buscarán en GenBank las proteínas de mayor homología con el péptido predicho, que puedan funcionar como mimotopes de proteínas virales generando autoanticuerpos.

Resultados

Aspectos clínicos y epidemiológicos de las infecciones por Adenovirus en niños

Muestras período 1999-2002

En el transcurso del período 1999-2002 se analizaron un total de 15103 muestras, de las cuales 5334 resultaron positivas para alguno de los virus analizados (AV, Virus Sincicial Respiratorio, Parainfluenza 1-2-3, e Influenza A y B). Se registraron 362 muestras positivas para AV. Las frecuencias de los AV fueron 2,42% en 1999, 1,95% en 2000, 1,56% en 2001 y 3,56% en 2002. La prevalencia resultó 9,24% en 1999, 4,8% en 2000, 4,1% en 2001 y 9,73% en 2002 (Tabla 8).

Tabla 8: Resumen de muestras. Modificado de Viegas *et al.*, 2003

| Año | Muestras totales | Etiología viral | Adenovirus |
|------------|-------------------------|------------------------|-------------------|
| 1999 | 4008 | 1050 (26.2) | 97 (9.2) |
| 2000 | 3788 | 1542 (40.7) | 74 (4.8) |
| 2001 | 3458 | 1326 (38.3) | 54 (4.1) |
| 2002 | 3849 | 1416 (36.8) | 137 (9.7) |

En general la prevalencia es menor que otros agentes etiológicos virales (RSV 78.8%, Influenza A 8.3%), ocupando los Adenovirus el tercer puesto (7.8%) en un análisis generalizado realizado en nuestro laboratorio (Viegas *et al.*, 2003). Allí también pudimos observar que el aumento en el número de casos de AV en 1999 y en 2002 ($\chi^2 = 33,19$; $p < 0,00001$) se debió probablemente a la co-ocurrencia de una epidemia de sarampión en 1998-9 que disminuyó el número de casos de RSV en 1999 y una campaña masiva de vacunación anti-influenza en 2001 que probablemente provocó la desaparición de casos en 2002, alterando así el orden en los patrones de prevalencia que normalmente hemos observado.

De los pacientes analizados, 45.01% provenían del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez y el resto de otras Instituciones municipales y de la Provincia de Buenos Aires.

En el período analizado se detectaron más pacientes con AV de sexo masculino (56.6%) que femenino (43.4%).

El diagnóstico fue realizado en promedio a los 2 días post-internación aunque el rango de detección varió desde día 1 al día 90 (N=230).

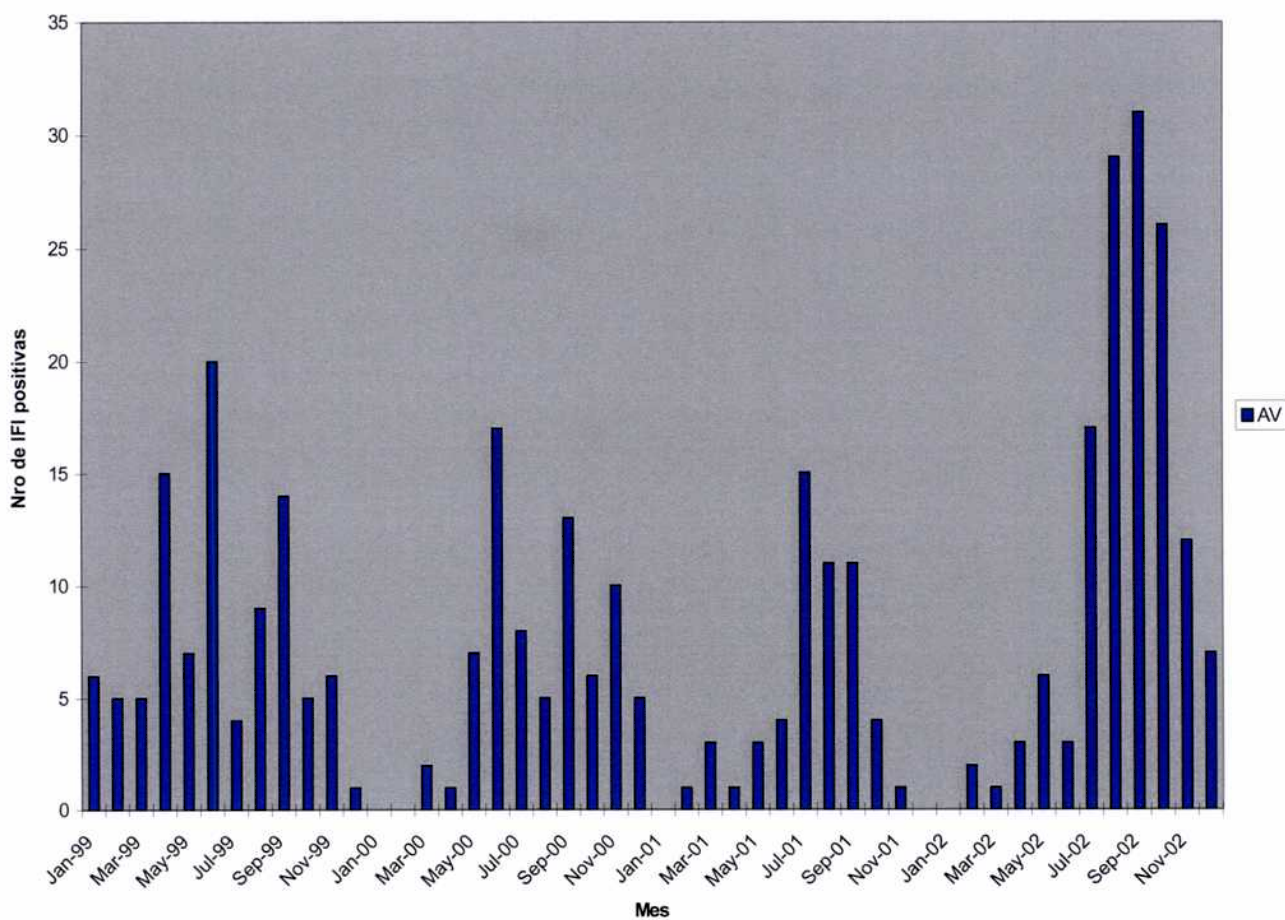
Se registró dificultad respiratoria moderada en el 65.5% de los casos, grave en el 22.1% y leve en 12.4 pacientes (N=290).

Si bien se detectó infección por AV a lo largo del año (Gráfico 1), la mayor ocurrencia se observó durante los meses de invierno seguido por los meses cálidos (fines de octubre y noviembre).

Los Adenovirus, como se puede observar en la Figura 22, no presentan una estacionalidad marcada a comparación de otros virus como el Sincicial Respiratorio siendo su patrón carácter endémico más que epidémico en

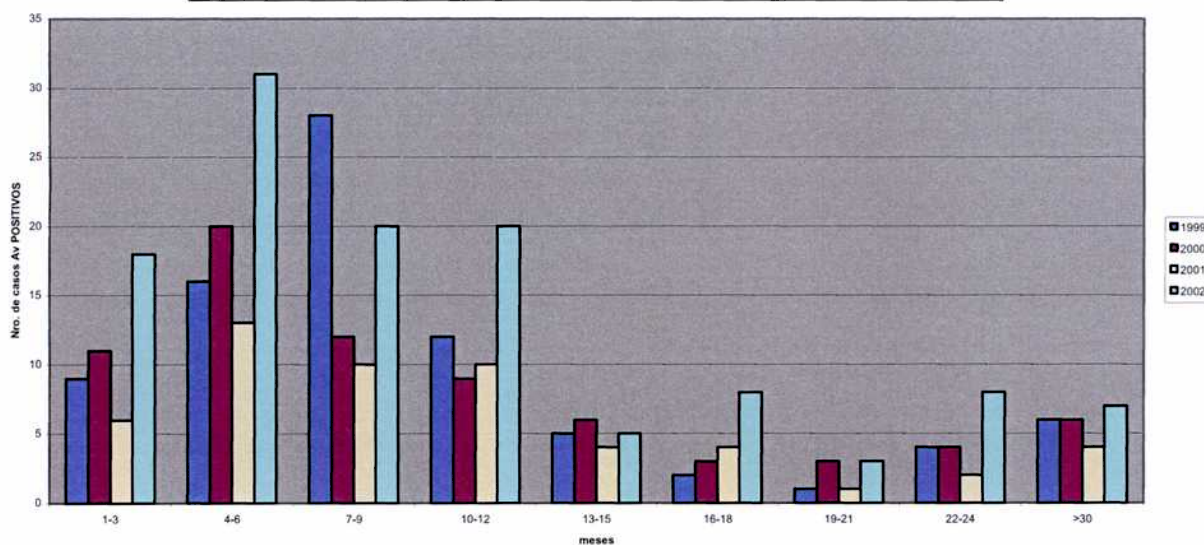
general. Se registró un mayor número de casos en el período invernal de baja temperatura. Se analizará con mayor detenimiento la estacionalidad en la sección de datos ambientales.

Figura 22: Distribución por mes AV positivos 99-02 (meses)



La distribución por edades de los pacientes infectados con Adenovirus se puede ver en el Figura 23. La mediana de las edades fue de 1.5 meses en 1999, 2 meses en 2000 y 2001 y 3 meses en 2002 (rango desde 1 mes hasta 6 años).

Figura 23: Distribución por edad AV positivos 99-02 (meses)



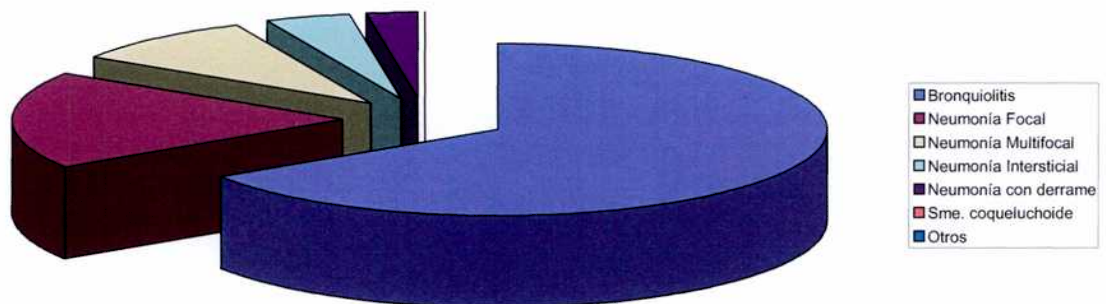
Las causas de internación pueden observarse en la Figura 24. La mayor causa de internación fue bronquiolitis (189 pacientes) seguida por neumonía focal (51 pacientes), neumonía multifocal (24 pacientes), neumonía intersticial (11 pacientes), neumonía con derrame (11 pacientes) y síndrome coqueluchoide (3 pacientes). Otros motivos de internación fueron catarro de vías aéreas superiores, displasia bronco-pulmonar, neumonitis, distress respiratorio, fístula pleuro-pulmonar, supuración pleuro-pulmonar epiglottitis, shock séptico, faringitis y otras. Se registraron enfermedades de base como leucemia linfoblástica aguda, linfangioma, síndrome de Down, Kawasaki, Fibrosis quística y Varicela.

Diez casos presentaron infección mixta, 7 con Virus Sincicial Respiratorio y 3 con Virus Parainfluenza 3

Nueve casos resultaron fatales, tres con nexo epidemiológico (a partir de una infección intrahospitalaria) y uno con enfermedad pulmonar secuelar.

Gráfico 24: Causa de Internación por AV muestras 99-02

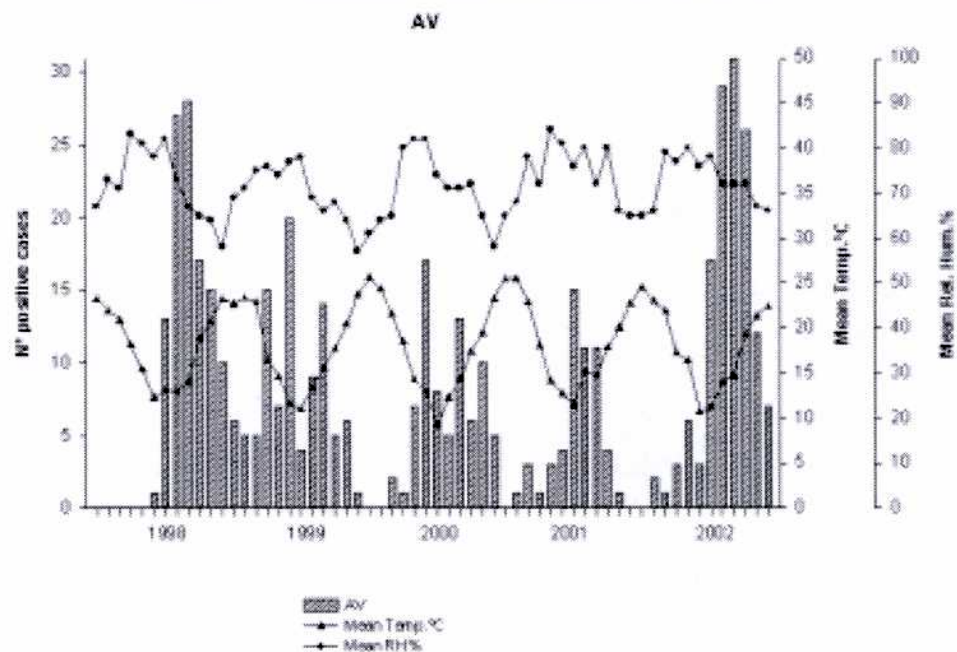
N=321



Datos ambientales

Se recopilaron datos disponibles sobre número de casos mensuales de Adenovirus desde 1998 hasta 2002. Se graficaron juntamente con los datos de temperatura y humedad relativa % promedio mensual (Figura 25)

Figura 25: Relación entre datos meteorológicos y frecuencias de AV 1998-2002
Modificado de Viegas *et al.*, 2003.



Para evaluar la correlación entre infección por Adenovirus y los distintos parámetros meteorológicos se realizó un test de correlación de Spearman divariado con respecto a la temperatura media, humedad relativa % y radiación solar UVB (Tabla 8).

| |
|---|
| <p>Tabla 8: AV- Coeficientes de correlación de Spearman Modificado de Viegas <i>et al.</i>, 2003.</p> |
|---|

Coeficientes

| | |
|-----------------------------|------------------------|
| <i>Temperatura media</i> | -0.41 ($p = 0.0021$) |
| <i>Humedad relativa (%)</i> | -0.1 ($p = 0.4892$) |
| <i>UVB</i> | -0.32 ($p = 0.0172$) |

Se encontró una correlación negativa de grado medio significativa con respecto a la temperatura media, coincidiendo con lo deducido gráficamente en la sección anterior. En cuanto a la humedad relativa % la correlación resultó ser levemente negativa pero no significativa. De la misma manera la correlación negativa fue no significativa para UVB. Todo tiende a evidenciar que la naturaleza del virus no se ve afectada por estos parámetros climáticos dado su patrón anual ininterrumpido de circulación y señala como principal causante de los brotes a la susceptibilidad de los huéspedes a condiciones ambientales de temperatura desfavorable como los registros bajos (invierno) y los cambios bruscos (primavera).

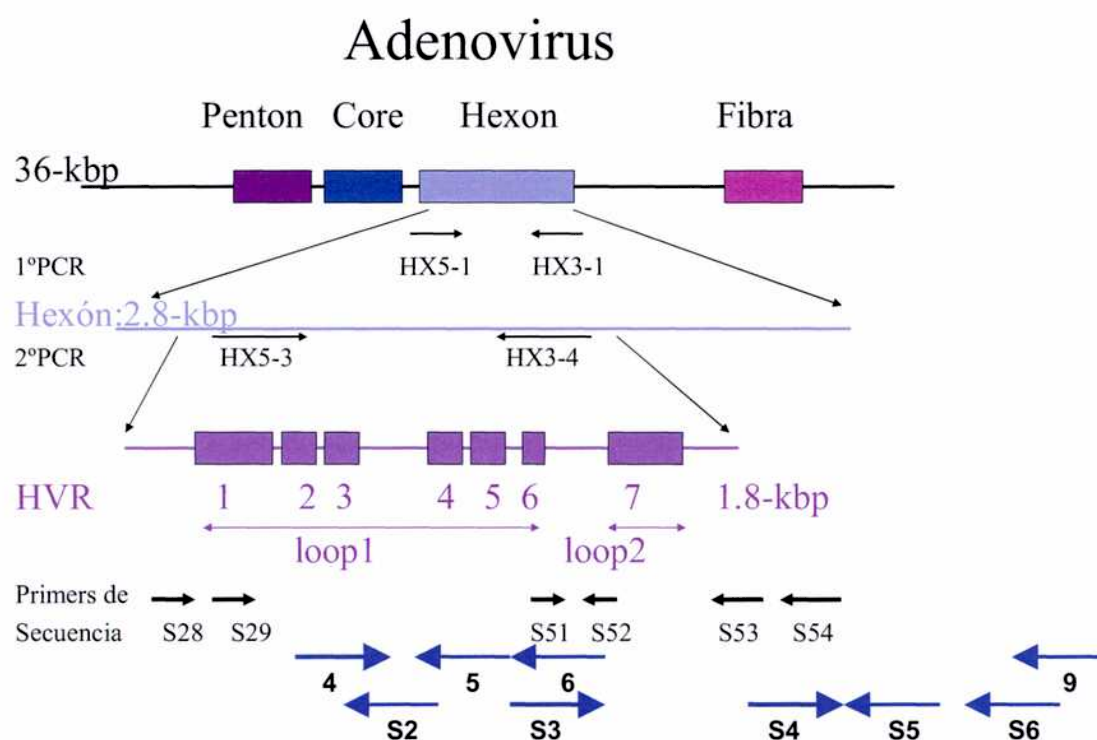
Datos moleculares

Secuenciación del hexón del AV7h

Diseño de primers específicos:

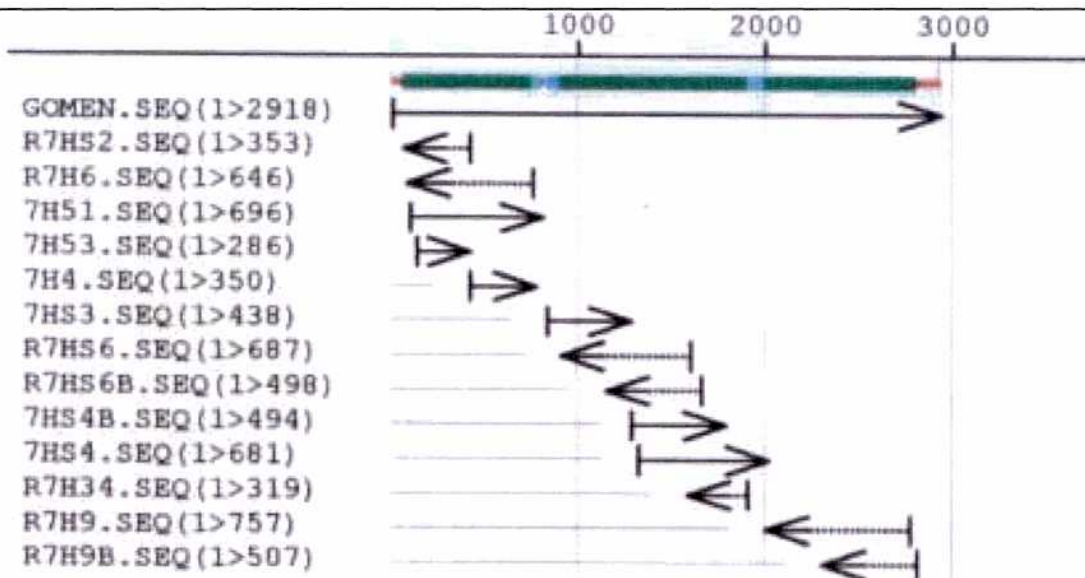
Se diseñaron *primers* específicos con el programa Primer Select del paquete de *software* Lasergene (DNASTar Inc., Madison WI) a partir de la secuencia completa disponible del Adenovirus 7 patrón cepa Gomen y la PCR se generalizó en treinta ciclos a 94 °C por 15 seg, 50 °C por 1 min y 72°C por 2 min con una extensión final a 72°C por 10 min. El esquema gráfico ampliado de los *primers* usados se ve en la Figura 26.

Figura 26: Primers usados para amplificación y secuenciación. Los *primers* señalados en negro fueron tomados de Takeuchi *et al.*, 1999; en azul se señalan los *primers* diseñados *de novo* para Av7h.



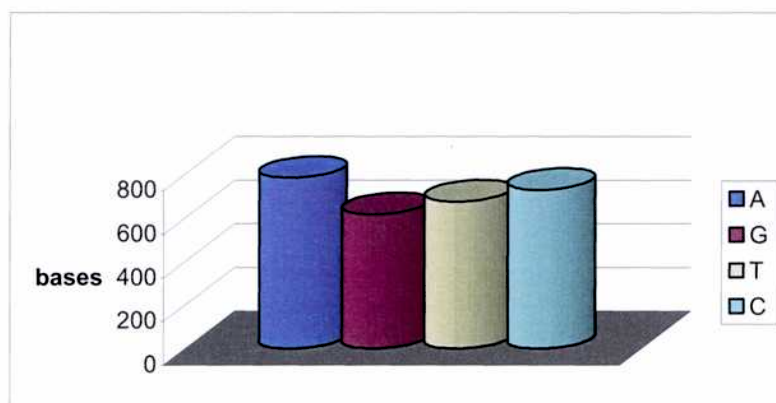
La cepa patrón de Adenovirus 7h (87-922) fue secuenciada íntegramente (2808 nt) siguiendo la estrategia de “afuera hacia adentro” desde las regiones más conservadas hacia las más variables en una “caminata” a lo largo de los diferentes *primers* utilizados (Figura 27).

Figura 27: Esquema del armado de la secuencia del gen hexón Av7h.
Las flechas indican la dirección de los *primers*



Se dedujo la secuencia de aminoácidos de 2808 bases cuya composición fue A+T=52.03% y G+C= 47.97% sin bases ambiguas (Figura 28).

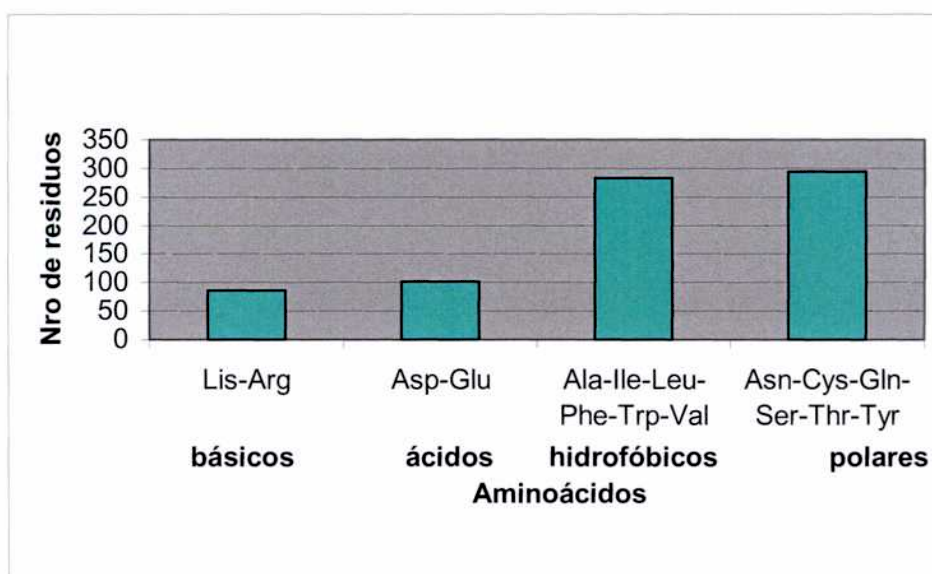
Figura 28: Composición nucleotídica hexón AV7h



Predicción del perfil proteico

De los 934 aa se predice una proteína estable de 105,28 kDa con un pI teórico de 5.43 de fórmula: $C_{4712}H_{7129}N_{1249}O_{1427}S_{36}$ cuya composición se ve en la Figura 29.

Figura 29: Composición aminoacídica hexón AV7h



En cuanto al uso del codon, se detectó un leve sesgo mayormente en sitios sinónimos siendo los codones NNC altamente preferidos salvo en el caso de los aminoácidos Ile (I), Leu (L) y Val(V). Se conoce que la presencia de

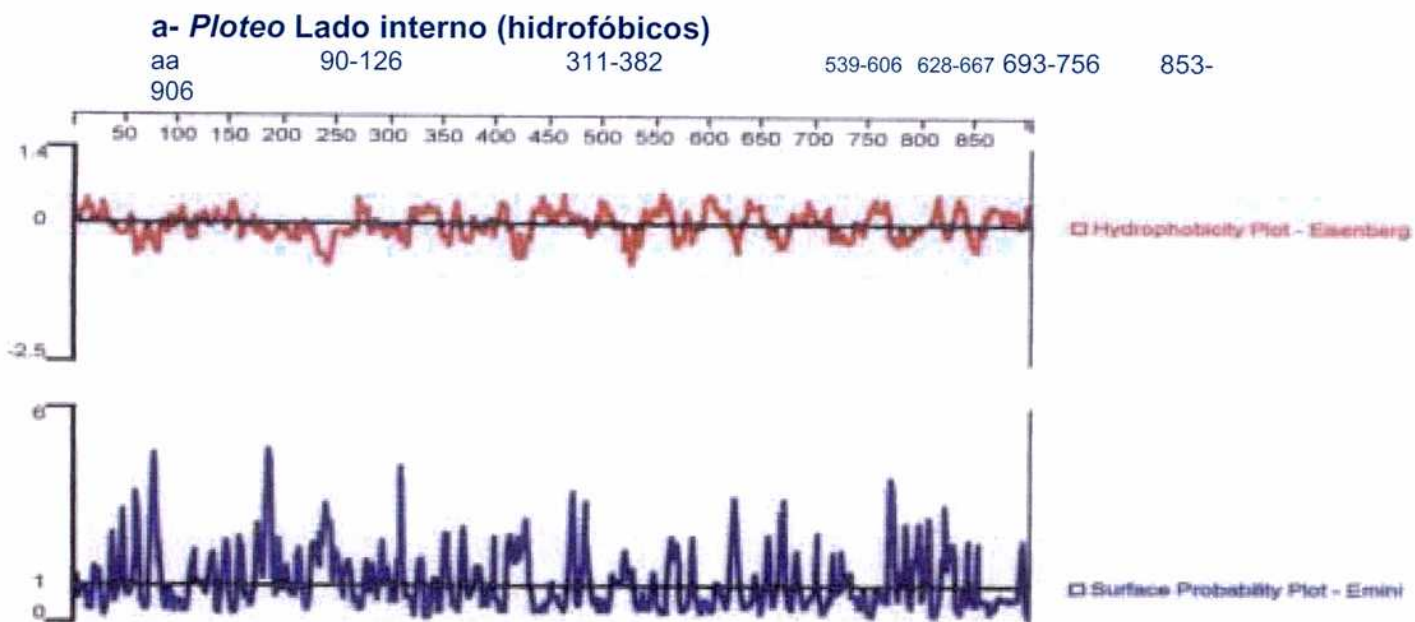
purinas (A-G) y pirimidinas (T-C) en la segunda posición se relacionan respectivamente con hidrofiliidad e hidrofobicidad. Se usaron, en distinta medida, todos los codones disponibles (61 tRNA disponibles) para la traducción (Tabla 9).

Tabla 9: Usos del codón hexón AV7h

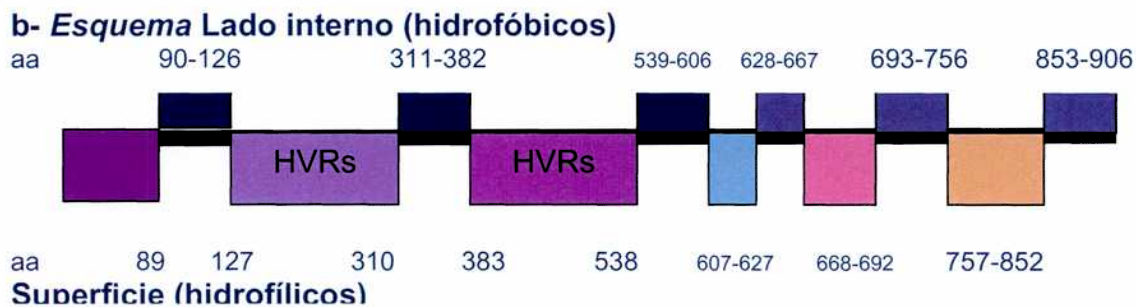
| | | | | | | | |
|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|
| UUU-F | 18 (0,82) | UCU-S | 16 (1,55) | UAU-Y | 15 (0,55) | UGU-C | 1 (0,50) |
| UUC-F | 26 (1,18) | UCC-S | 15 (1,45) | UAC-Y | 40 (1,45) | UGC-C | 3 (1,50) |
| UUA-L | 2 (0,18) | UCA-S | 9 (0,87) | UAA-* | 0 (0,00) | UGA-* | 0 (0,00) |
| UUG-L | 7 (0,62) | UCG-S | 4 (0,39) | UAG-* | 0 (0,00) | UGG-W | 13 (1,00) |
| CUU-L | 24 (2,12) | CCU-P | 18 (1,22) | CAU-H | 4 (0,67) | CGU-R | 5 (0,71) |
| CUC-L | 7 (0,62) | CCC-P | 15 (1,02) | CAC-H | 8 (1,33) | CGC-R | 7 (1,00) |
| CUA-L | 3 (0,26) | CCA-P | 22 (1,49) | CAA-Q | 16 (1,07) | CGA-R | 2 (0,29) |
| CUG-L | 25 (2,21) | CCG-P | 4 (0,27) | CAG-Q | 14 (0,93) | CGG-R | 3 (0,43) |
| AUU-I | 19 (1,54) | ACU-T | 24 (1,41) | AAU-N | 32 (0,94) | AGU-S | 7 (0,68) |
| AUC-I | 11 (0,89) | ACC-T | 24 (1,41) | AAC-N | 36 (1,06) | AGC-S | 11 (1,06) |
| AUA-I | 7 (0,57) | ACA-T | 15 (0,88) | AAA-K | 22 (1,13) | AGA-R | 18 (2,57) |
| AUG-M | 32 (1,00) | ACG-T | 5 (0,29) | AAG-K | 17 (0,87) | AGG-R | 7 (1,00) |
| GUU-V | 15 (1,22) | GCU-A | 22 (1,54) | GAU-D | 31 (1,02) | GGU-G | 9 (0,57) |
| GUC-V | 8 (0,65) | GCC-A | 21 (1,47) | GAC-D | 30 (0,98) | GGC-G | 23 (1,46) |
| GUA-V | 4 (0,33) | GCA-A | 10 (0,70) | GAA-E | 22 (1,19) | GGA-G | 21 (1,33) |
| GUG-V | 22 (1,80) | GCG-A | 4 (0,28) | GAG-E | 15 (0,81) | GGG-G | 10 (0,63) |

Se localizaron las regiones del gen descritas y se analizaron los perfiles de hidrofobicidad e hidrofiliidad y se observó que, conforme a la literatura, las regiones hipervariables (HVRs) contienen residuos hidrofílicos (Figura 30).

Figura 30: Esquema del perfil hidropático del Hexón de AV7h.
 a- Ploteo de hidrofobicidad. b- Esquema del ploteo



aa 89 127 310 383 538 607-627 668-692 757-852
Superficie (hidrofílicos) Comparación con secuencias reportadas



| Referencias: | |
|---|---|
| hidrofóbicos | hidrofílicos |
|  Pedestal 1 |  Loop amino terminal |
|  Pedestal 2 |  Loop 1 |
|  Conector del pedestal |  Loop 2 |
| |  Loop 3 |
| |  Loop 4 |

Se comprobó la presencia de residuos hidrofóbicos en las regiones de aa90-126, 311-382, 539-606, 628-667, 693-756 y 853-906. A su vez se vió que las regiones hidrofílicas fueron aa1-89,127-310 (HVR), 383-538 (HVR), 607-627, 668-692 y 757-852. Las regiones hidrofílicas presentan mayor exposición en superficie y resultan portenciales antígenos.

Se comparó la secuencia del hexón del AV7h obtenida de la cepa 87-922 en nucleótidos y aminoácidos con las siguientes cepas

| <i>Cepa</i> | <i>Acceso GenBank</i> | <i>Características</i> |
|------------------------|-----------------------|------------------------|
| Ad7p (Gomen) 2811nt | X76551 | secuencia completa= |
| Ad7h | U76956 | HVR=1419 nt |

Observamos que a nivel nucleotídico la cepa Gomen (Ad7p X76551) y la secuencia obtenida de Ad7h (87-922) difieren en un 4% y a nivel aminoacídico en un 3.5% (Tabla 9). Esto es esperable ya que pertenecen a distintos GTC, el Ad7p al GTC1 y el Ad7h al GTC2. Vemos también que la secuencia obtenida del Ad7h completa difiere de la reportada en las HVR (Ad7h HVR X76551) en 1.57% a nivel nucleotídico (22 nt) y 2.22% a nivel aminoacídico (9 aa) permaneciendo en el mismo GTC. La cepa que se usó en este estudio era la original, que no había sido repicada desde su aislamiento en 1987.

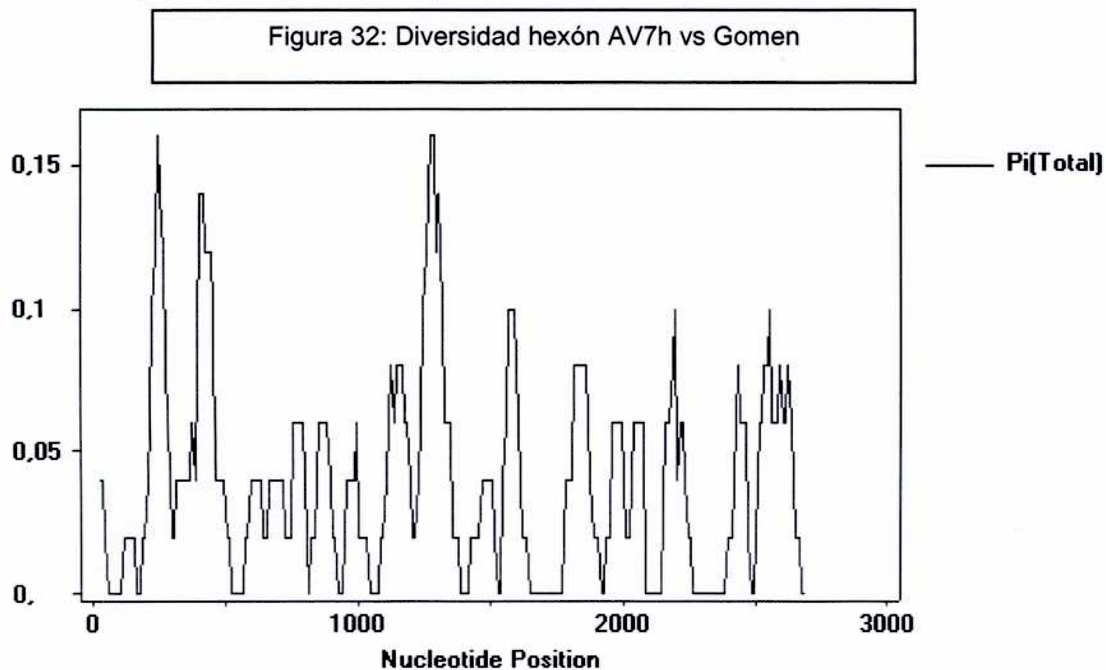
| | | | |
|--------|---------|---------|---------|
| | X76551 | 87-922 | U76956 |
| X76551 | 0.00000 | 0.0400 | 0.0474 |
| 87-922 | 0.03534 | 0.0000 | 0.0157 |
| U76956 | 0.05301 | 0.02211 | 0.00000 |

Tabla 9 Matriz de distancia, se muestra en negro la matriz correspondiente a aminoácidos y en color a nucleótidos.

| | | | | | | | |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------|
| X76551 | VAFKMATPSM | MPQWAYMHIA | GQDASEYLSP | GLVQFARATD | TYFSGMGNKFR | NPTVAPTHDV | |
| 87-922 | --- | | | | | | |
| U76956 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | TTDRSQRLML | RFVPVDREDN | TYSYKVRVTL | AVGDNRVLDM | ASTFFDIRGV | LDRGPFKPY | |
| 87-922 | | | | | | | |
| U76956 | ----- | ----- | ----- | ----- | ---Y..... | ----- | |
| X76551 | SGTAYNSLAP | KGAPNTSQWI | VTAGEERAVT | TTNTFGIAS | MKGDNITKEG | LEIGKDITAD | HVR 1/A1 |
| 87-922 | | | ..T..D---N | A..Y..... | T..... | | |
| U76956 | ----- | ----- | ..T..D---N | A..Y..... | T.....D | ----- | |
| X76551 | NKPIYADKTY | QPEPQVGES | WTDTDGTNEK | FGGRALKPAT | KMKPCYGSFA | RPTNIKGGQA | HVR 2/A2 |
| 87-922 | | | ..I..... | | | ..T..T..... | |
| U76956 | ----- | ----- | ..I..... | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | KNRKVKPTEG | DVETEEDID | MEFFDGREAA | DAFSPEIVLY | TENVNLETDP | SHVVYKPGTS | HVR 3/A3 |
| 87-922 | | N..... | ..S..... | | | | |
| U76956 | ----- | ..T..... | ..A..... | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | DDNSHANLGO | QAMPNRPNYI | GFRDNFVGLM | YYNSTGNMGV | LAGQASQLNA | VVDLQDRNTE | HVR 4/A4 |
| 87-922 | .G..... | | | | | | |
| U76956 | .G..... | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | LSYQLLLDSL | GDRTRYFSMW | NQAVDSYDPD | VRIIENHGIE | DELPNYCFPL | DGIGPAKTYQ | HVR 5/B1 |
| 87-922 | | ..S..... | |V..... | |G.K.. | |
| U76956 | ----- | ..S..... | ----- |V..... | ----- |GNK.. | |
| X76551 | GIKSKDNGWE | KDDNVKSNE | IAIGNNQAME | INIQANLWRS | FLYSNVALYL | PDVYKYTPTN | |
| 87-922 | ...PR.TA.. | ..TK..TA.. |L... | | | | |
| U76956 | ...PR.TA.. | ..TK..TA.. |L... | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | ITLPANTNTY | EYMNGRVVSP | SLVDSYINIG | ARWSLDPMDN | VNPFNHHRNA | GLRYRSMLLG | HVR 6/B2 |
| 87-922 | | | | |D..D. | | |
| U76956 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | NGRYVPFHIQ | VPQKFFAVKN | LLLLPGSYTY | EWNFRKDVNM | VLQSSLGNDL | RTDGATISFT | |
| 87-922 | | | | | | | |
| U76956 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | SINLYATFFP | MAHNTASTLE | AMLRNDTNDQ | SFNDYLSAAN | MLYPIPANAT | NIPISIPSRN | |
| 87-922 | | | ..G..... | ..K..... | | | |
| U76956 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | WAAFRGWSFT | RLKTKETPSL | SGGFDPYFVY | SGSIPYLDGT | FYLNHTFKKV | SIMFDSSVSW | |
| 87-922 | .PP..... | |R. | | | | |
| U76956 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | PGNDRLLSPN | EFEIKRTVDG | EGYNVAQCNM | TKDWFLVQML | ANYNIGYQGF | YIPEGYKDRM | |
| 87-922 | | | | | | | |
| U76956 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | YSFRNFQPM | SRQVVDEVNY | TDYKAVTLPY | QHNSGFVGY | LAPTMRQGEF | YPANYPYPLI | HVR 7/D |
| 87-922 | | | | | | | |
| U76956 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | GTTAVKSVTQ | KKFLCDRTMW | RIPFSSNFMS | MGALTDLGQN | MLYANSAHAL | DMTFEVDPMD | |
| 87-922 | | | | | L..... | | |
| U76956 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| X76551 | EPTLLYLLFE | VFDVVRVHQP | HRGVIEAVYL | RTPFSAGNAT | T | | |
| 87-922 | | | | | . | | |
| U76956 | ----- | ----- | ----- | ----- | - | | |

Figura 31: Comparación de las secuencias inferidas de aminoácidos Cepas Gomen (Ad7p X76551) y 87-922 (Ad7h HVR X76551). Los puntos (.) significan igual residuo, los guiones (-) no hay secuencias disponible y los cambio de aminoácidos están

Se muestran en la Figura 31 las diferencias en aminoácidos obtenidas entre las cepas. Se hace especial hincapié en la localización de las regiones hipervariables del gen hexón. La nomenclatura y localización de las mismas varía según el autor. Se localizan HVR1-6 en el loop 1 y HVR 7 en el loop 2 para Crawford-Mikszs (1996), Takeuchi y Li & Waddell (1999) pero cambia cuando Li *et al.* (1997) definen el perfil hidropático de los hexones adenovirales y se nombran A1-A4 en loop1, B1 y 2 en loop 2 y D en loop4. Si graficamos la diversidad en nucleótidos P_i , tomada como el número promedio de diferencias por sitio con respecto a la cepa prototipo del serotipo 7 (Gomen) avanzando de a 10 nucleótidos en ventanas de 50 bases de longitud vemos que la mayor diversidad se encuentra localizada en zonas definidas como hidrofílicas, ubicadas en los loops del hexón hacia la superficie (Figura 32 y Tabla 10).



| Ventana | Punto medio | Pi | Región (aa) |
|-----------|-------------|---------|-------------|
| 201-250 | 225 | 0,10000 | 75-85 |
| 211-260 | 235 | 0,12000 | Loop |
| 221-270 | 245 | 0,16000 | amino |
| 231-280 | 255 | 0,14000 | terminal |
| 241-290 | 265 | 0,12000 | |
| 381-430 | 405 | 0,14000 | 135-151 |
| 391-449 | 415 | 0,14000 | Loop 1 |
| 401-459 | 425 | 0,12000 | |
| 411-469 | 444 | 0,12000 | |
| 421-479 | 454 | 0,10000 | |
| 1220-1269 | 1244 | 0,10000 | 414-438 |
| 1230-1279 | 1254 | 0,12000 | Loop 2 |
| 1240-1289 | 1264 | 0,14000 | |
| 1250-1299 | 1274 | 0,16000 | |
| 1260-1309 | 1284 | 0,16000 | |
| 1270-1319 | 1294 | 0,12000 | |
| 1280-1329 | 1304 | 0,14000 | |
| 1290-1339 | 1314 | 0,10000 | |
| 2160-2209 | 2184 | 0,08000 | 728-731 |
| 2170-2219 | 2194 | 0,10000 | Loop 4 |

Regiones antigénicas

Los epitopes B y T fueron predichos y se pueden ver en la Figura 33. El índice de antigenicidad que los define integra cargas y polaridad para predecir los epitopes T.

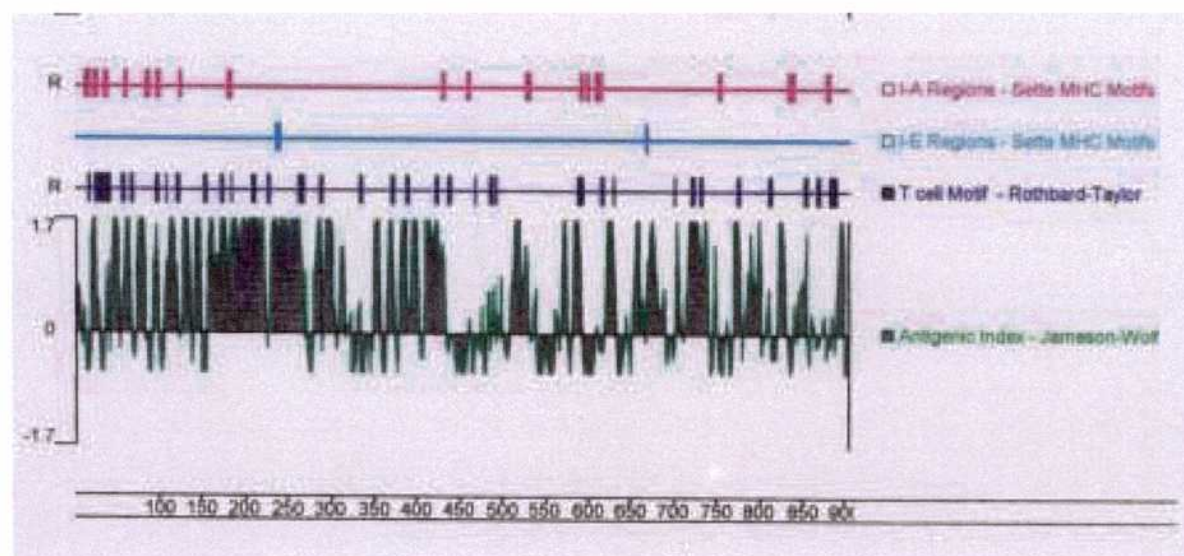


Figura 33: Localización gráfica de las regiones antigénicas Hexón AV7h

Epitopes B

Hexapéptidos: aa12-17, 21-26, 33-38, 57-62, 83-88, 95-100, 121-127, 178-183, 427-432, 456-461, 526-531, 589-594, 596-601, 750-755.

Octapéptido: aa876-883

Nonapéptido: aa833-841

Decapéptido: aa 606-615

Epitopes T

Tetrapéptidos: aa15-18, 23-26, 28-31, 106-109, 141-154, 182-185, 208-211, 225-228, 369-372, 386-389, 466-469, 485-488, 490-493, 628-631, 699-702, 719-722, 730-733, 773-776, 810-813, 851-855

Pentapéptidos: aa56-60, 64-68, 119-123, 170-174, 286-290, 333-337, 420-424, 434-438, 588-592, 614-618

Heptapéptidos: 93-99, 262-268

Octapéptidos: aa31-41, 882-889

En algunos casos los epitopes B y T predichos colocalizan o se solapan como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11: Localización de los epitopes predictivos para Hexón AV7h. se muestra resaltado en verde la colocación de epitopes B y T. Se indica la localización en el hexón en aa y en estructura.

| | <i>Epitopes B</i> | <i>Epitopes T</i> | <i>Epitopes B</i> | <i>Epitopes T</i> | |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| Loop amino terminal | 12-17 | 15-18 | | 434-438 | Loop 2 |
| | 21-26 | 23-26 | 456-461 | | |
| | | 28-31 | | 466-469 | |
| | 33-38 | 31-41 | | 485-488 | |
| | 57-62 | 56-60 | | 490-493 | |
| Pedestal 1 | | 64-68 | 526-531 | | Pedestal 1 |
| | 83-88 | | | 588-592 | |
| | 95-100 | 93-99 | 589-594 | | |
| Loop 1 | | 106-109 | 596-601 | | conector |
| | | 121-127 | 119-123 | 606-615 | |
| | | | 141-154 | 614-618 | Pedestal 2 |
| | | | 170-174 | 628-631 | |
| | | 178-183 | | 699-702 | Pedestal 2 |
| | | | 182-185 | 719-722 | |
| | | | 208-211 | 730-733 | |
| Pedestal 1 | | | 225-228 | 750-755 | Loop 4 |
| | | | 262-268 | 773-776 | |
| | | | 286-290 | 810-813 | |
| Loop 2 | | | 333-337 | 833-841 | Pedestal 2 |
| | | | 369-372 | 851-855 | |
| | | | 386-389 | 876-883 | |
| | | 420-424 | 882-889 | | |
| | 427-432 | | | | |

Polimorfismos del gen hexón en muestras clínicas: 1990-2002

Cultivo

Se aislaron 273/362 muestras positivas para AV en el período 1999-2002 en células 293 o Hep-2 (75.4%). Cabe destacar que 10 muestras con IFI negativa resultaron positivas por cultivo y PCR confirmatoria para AV. Se realizó un testeo adicional de los anticuerpos monoclonales comerciales usados para diagnóstico en cultivo con 38 muestras por duplicado positivos para PCR genérica.

Tabla 12: Evaluación de Mabs comerciales para AV

| <i>Cultivo</i> | <i>Coincidencia (+)</i> | <i>Coincidencia (-)</i> | <i>No coincidencia</i> |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Positivo | 19 | 3 | 16 |
| Negativo | 1 | 0 | 4 |
| Totales | 20 | 3 | 20 |

Se vió que sólo el 50 % de los casos concuerdan en el diagnóstico, evidenciando que los epitopes usados comercialmente para detección de Adenovirus pueden no detectar algunos serotipos. Algunas de estas muestras no concordantes se caracterizaron como AV7 posteriormente por PCR.

Epidemiología molecular:

Se determinó semicuantitativamente mediante la PCR genérica, por comparación entre la banda obtenida a partir del DNA extraído del aspirado nasofaríngeo y la obtenida del DNA extraído del cultivo celular, si el título viral había aumentado, condición que resultó indispensable para la posterior caracterización molecular donde la sensibilidad del método predomina sobre

la especificidad. La PCR especie específica nos permitió distinguir entre las 6 especies de Adenovirus (A-F) y verificar los de mayor importancia en infecciones respiratorias agudas pediátricas. La determinación del especie-*subespecie* nos permitió separar los AV B:1 (AV 3,7,16 y 21) de los AV B:2 (AV 11,14,34 y 35). Finalmente la PCR especie B:1 diferenció los AV serotipo 3,7 y 21.

Se analizaron por PCR 312 muestras por uno o más de los métodos utilizados resultando 252 positivas (80.7%) (Figura). En algunos casos se procesaron aspirados nasofaríngeos sin pasaje por cultivo. Los resultados fueron

PCR especie específica: 41 Especie C y 16 Especie B (Figura 34 y 35)

PCR-RFLP para determinar especie-*subespecie*: 96 B:1 y 10 B:2

PCR multiplex especie B:1: 149 AV7 y 38 AV3.

Figura 34: PCR especie específica. Calle 1: marcador de 100 pb, calles 2 a 9, 11, 13 a 18 producto a cortar con Taq I, calles 10 y 12 especie B:2 (290 pb), calle 19 control negativo y calle 20 control positivo

1 * 2 * 3 * 4 * 5 * 6 * 7 * 8 * 9 * 10 * 11 * 12 * 13 * 14 * 15 * 16 * 17 * 18 * 19 * 20

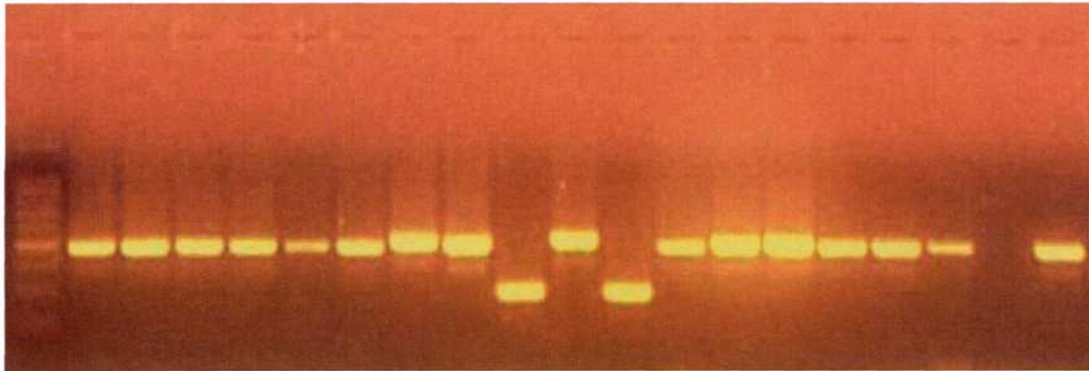
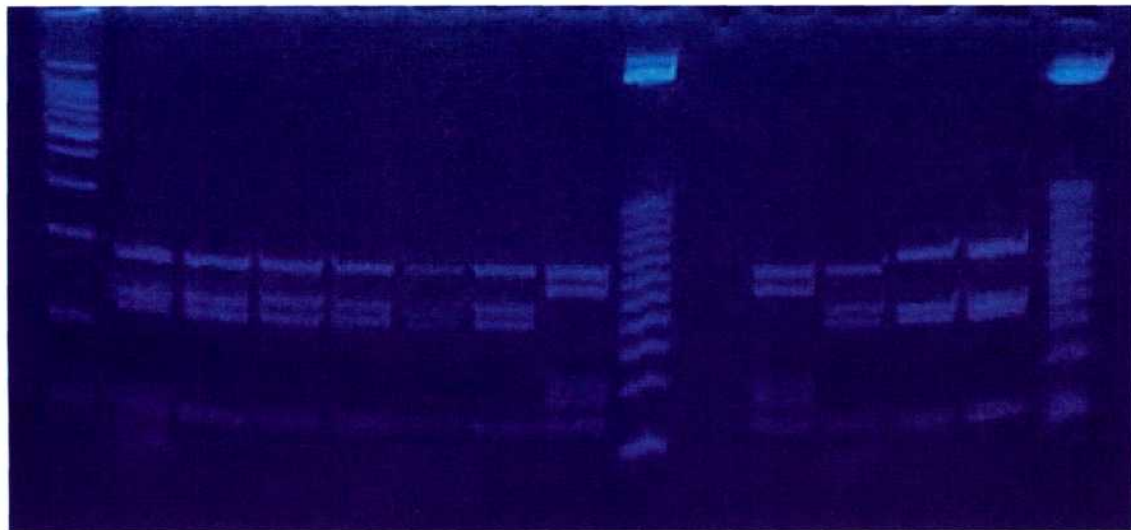


Figura 35: Restricción con Taq I de los productos de 420 a 510 bp. Calle 1 marcador de 100 pb, calle 9 marcador de 25 pb, calle 15 marcador de 10 pb; calle 2 AV7h calles 3 a 7 y 12 patrón similar a AV7h, calles 8 y 11 patrón simil AV7g y p, calle 10, control negativo, calle 13 patrón especie C, calle 14 AV2.



1 * 2 * 3 * 4 * 5 * 6 * 7 * 8 * 9 * 10 * 11 * 12 * 13 * 14 * 15

Las PCRs utilizadas demostraron tener diferente sensibilidad siendo ésta mayor en la PCR multiplex especie B:1 detectando tanto DNA viral extraído de aspirados nasofaríngeos como de sobrenadante de cultivo y menor en la PCR especie específica detectando sólo DNA viral extraído de cultivo celular. La tipificación por PCR mostró que el especie B:1 (AV7 y AV3) es el más importante, seguido por el C (AV5 y AV2) y el B:2 (AV 11).

Se continuaron estudiando 32 muestras de AV7 pertenecientes al período 1999-2002 por secuenciación. Adicionalmente se agregaron a este estudio de polimorfismos del hexón para ampliar el período abarcado muestras del año 1990 (1 muestra de evolución fatal), 1991 (1 muestra de evolución fatal), 1992 (2 muestras de casos fatales) y 1998 (1 muestra caso grave) como se detalla en la Tabla 13. Se analizaron hexones completos y regiones hipervariables por separado. El corte para las regiones hipervariables fueron los nucleótidos 403 a 1356 y los aminoácidos 136 a 452 (numerados de acuerdo a cepa Gomen). Los hexones completos se estudiaron desde 1990 hasta 1999, incluyendo la secuencia aportada por este trabajo de la cepa patrón de AV7h. Los polimorfismos en las regiones hipervariables fueron analizadas en el período 1990-2002, teniendo sólo información de las regiones hipervariables para el período 2000-2002

Tabla 13: Muestras seleccionadas para análisis de polimorfismos AV7
 La evolución clínica (evol) se evaluó con la dificultad respiratoria, mod corresponde a moderada en algunos casos la evolución resultó fatal. Se resalta la cepa patrón de Av7h usada para comparaciones.

| Año | Nº Adeno | Evol | Código | |
|-------------|-----------------|--------------|---------------|-----------|
| 1987 | 922 | grave | 87-922 | |
| 1990 | F55 | fatal | BA55-90 | |
| 1991 | F10 | grave | BA10-91 | |
| 1992 | F22 | fatal | BA22-92 | |
| | F23 | fatal | BA23-92 | |
| 1998 | 3 | fatal | BA3-98 | |
| 1999 | 1 | mod | BA1-99 | |
| | 4 | mod | BA4-99 | |
| | 496 | mod | BA496-99 | |
| | 991 | mod | BA991-99 | |
| | 1325 | mod | BA1325-99 | |
| | 1390 | mod | BA1390-99 | |
| | 2972 | fatal | BA2972-99 | |
| | 3106 | grave | BA3106-99 | |
| | 3150 | mod | BA3150-99 | |
| | 3187 | fatal | BA3187-99 | |
| | 3434 | mod | BA3434-99 | |
| | 2000 | 3017 | mod | BA3017-00 |
| | 2001 | 6800 | grave | BA6800-01 |
| 2002 | 148 | mod | BA148-02 | |
| | 1924 | mod | BA1924-02 | |
| | 2026 | mod | BA2026-02 | |
| | 2169 | mod | BA2169-02 | |
| | 2268 | mod | BA2268-02 | |
| | 2687 | mod | BA2687-02 | |
| | 2688 | mod | BA2688-02 | |
| | 2966 | mod | BA2966-02 | |
| | 3029 | mod | BA3029-02 | |
| | 3037 | mod | BA3037-02 | |
| | 3270 | mod | BA3270-02 | |
| | 3282 | mod | BA3282-02 | |
| | 3387 | mod | BA3387-02 | |
| 3478 | mod | BA3478-02 | | |

Los hexones completos fueron amplificados con los *primers* hx5-1 y 3-1 dando un amplicón de 2,8Kb y secuenciados con los *primers* internos diseñados. Las regiones hipervariables fueron amplificadas y secuenciadas con los *primers* hx4 y S5 dando un producto de 953 pb.. Adicionalmente se analizaron muestras de AV3 para chequear el error del método. Diferentes productos finales fueron logrados y gráficamente podemos observar el comienzo y el alcance de cada secuencia obtenida (Figura 36).

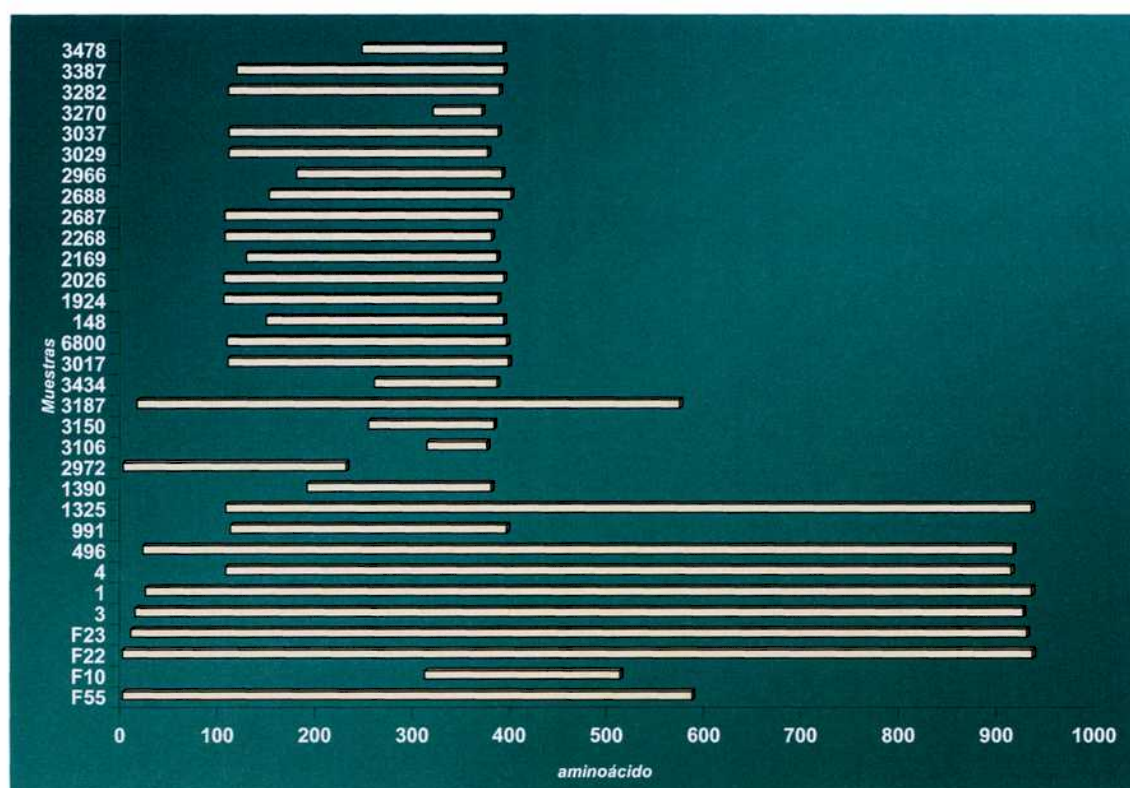


Figura 36: Alcance de las secuencias AV7 1990-2002 medido en aminoácidos

Se realizaron 2 PCRs diferentes para cada fragmento y 2 lecturas de cada *primer* para cada PCR, resultando cada base leída en dos sentidos dos veces (redundancia de 4). En los casos en que se clonó (muestras de 1990-1999) no se produjo ninguna diferencia entre las secuencias obtenidas de clones y las secuencias de PCR directa. Las secuencias de muestras AV3 coincidieron con lo reportado minimizando el error del método.

Se detallan a continuación las mutaciones encontradas en el período analizado para las 9 muestras que tuvieron secuencia completa del hexón. (Tabla 14). Se tomó para comparación la cepa prototipo del serotipo 7 (Gomen) y se incluyó la cepa patrón de AV7h. Se contabilizaron las transiciones (ts) y transversiones (tv). Las sustituciones se clasificaron en sinónimas (S) y no sinónimas (NS), estas últimas fueron analizadas de acuerdo a su carga y se consideró un cambio como no conservativo (NC) cuando resulta en un aminoácido de polaridad diferente y conservativo (C) cuando la carga permanece igual. Se consideraron como mutaciones fijadas aquellas que se presentaron en todo el período analizado.

Tabla 14: Mutaciones en hexones 1990-1999. Nd: no disponible, Ts: transición, Tv: transversión, S: sinónimo, NS: no sinónimo, C: conservativo, NC: no conservativo, P: positivo, N: negativo, PSC: polar sin carga, NP: no polar, Negrita: fijaciones: FS: fijación sinónima, NS: fijación no sinónima, Itálica: Fijaciones en muestras, FSm: fijación sinónima en muestras, FNSm: fijación no sinónima en muestras, In: inserción, Del: deleción, (*) base sin cambio

| Hexones nt | Gomen | 1987 | 1990 | 1992 | | 1998 | 1999 | | | | | Mut | Sust | Nat | Reemplazo | | | |
|---------------|-------|------|------|------|-----|------|------|-----|-----|------|------|-------|------|--------|-----------|--------|-------|--------|
| | | av7H | 55 | 22 | 23 | 3 | 1 | 4 | 496 | 1325 | 3187 | Ts/Tv | S/NS | fijado | AA | cambio | C/NC | carga |
| 9 | C | * | T | * | nd | nd | nd | nd | nd | nd | ts | S | | | | | | |
| 12 | A | C | C | C | nd | nd | nd | nd | nd | nd | tv | S | | | | | | |
| 24 | C | G | * | G | nd | nd | nd | nd | nd | nd | tv | S | | | | | | |
| 25 | C | * | G | * | nd | nd | nd | nd | nd | nd | tv | NS | | 9 | Q-E | NC | PSC-N | |
| 70 | C | * | * | T | * | * | nd | nd | * | nd | ts | S | | | | | | |
| 87 | G | * | * | * | * | * | C | nd | * | nd | * | tv | S | | | | | |
| 102 | A | * | * | * | C | * | * | nd | * | nd | * | tv | S | | | | | |
| 130 | A | * | * | * | * | * | C | nd | * | nd | * | tv | NS | | 44 | K-Q | NC | P-PSC |
| 132 | A | G | G | G | * | G | * | nd | * | nd | G | ts | S | | | | | |
| 177 | C | * | * | * | * | * | * | nd | T | nd | * | ts | S | | | | | |
| 189 | A | * | * | * | * | * | * | nd | C | nd | * | tv | S | | | | | |
| 191 | T | * | * | * | C | * | * | nd | * | nd | * | ts | NS | | 64 | L-P | C | NP |
| 207 | A | G | G | G | G | G | G | nd | G | nd | G | ts | S | FS | | | | |
| 222 | A | G | G | G | * | G | G | nd | * | nd | G | ts | S | | | | | |
| 223 | G | * | * | * | * | * | * | nd | A | nd | * | ts | NS | | 75 | D-T | NC | N-PSC |
| 224 | A | * | * | * | * | * | * | nd | C | nd | * | tv | NS | | 75 | | | |
| 231 | C | A | A | A | * | A | A | nd | * | nd | A | tv | S | | | | | |
| 246 | T | G | G | G | G | G | G | nd | * | nd | G | tv | S | | | | | |
| 249 | C | G | G | G | G | G | G | nd | * | nd | G | tv | S | | | | | |
| 255 | G | C | C | C | C | C | C | nd | * | nd | C | tv | S | | | | | |
| 258 | G | C | C | C | C | C | C | nd | * | nd | C | tv | S | | | | | |
| 261 | T | C | C | C | C | C | C | nd | * | nd | C | ts | S | | | | | |
| 264 | A | G | G | G | G | G | G | nd | * | nd | G | ts | S | | | | | |
| 281 | T | * | * | * | G | * | * | nd | * | nd | * | tv | NS | | 94 | L-R | NC | NP-P |
| 310 | C | A | A | A | A | A | A | nd | * | nd | A | tv | S | | | | | |
| 339 | T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | ts | S | FS | | | | |
| 351 | T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | ts | S | FS | | | | |
| 372 | G | * | * | * | * | * | * | * | C | * | * | tv | S | | | | | |
| 390 | C | T | T | T | T | T | T | T | * | T | T | ts | S | | | | | |
| 393 | T | C | C | C | C | C | C | C | * | C | C | ts | S | | | | | |
| 415 | G | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | ts | NS | FNS | 139 | A-T | NC | NP-PSC |
| 417 | A | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | ts | S | FS | | | | |
| 418 | G | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | ts | NS | | 140 | G-N | C | PSC |
| 419 | G | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | ts | NS | | 140 | | | |
| 420 | A | * | * | * | * | * | * | * | T | * | * | tv | S | | | | | |
| 421 | G | * | * | * | * | * | * | * | C | * | * | tv | NS | | 141 | E-R | NC | N-P |
| 422 | A | * | * | * | * | * | * | * | G | * | * | ts | NS | | 141 | | | |
| 426 | A | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | tv | NS | FNS | 143 | E-D | C | N |
| 428 | G | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | ts | NS | FNS | 143 | | | |
| 429 | A | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | tv | NS | FNS | 144 | R-N | NC | P-PSC |
| 430-438 | in | del | del | del | del | del | del | del | in | del | del | NS | | | 147 | T-A | NC | PSC-NP |
| 448 | A | T | T | T | T | T | T | T | * | T | T | tv | NS | | 150 | N-Y | C | PSC |
| 459 | C | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | tv | S | | | | | |
| 470 | T | C | C | C | C | C | C | C | * | C | C | ts | NS | | 157 | M-T | NC | NP-PSC |
| 492 | A | G | G | G | G | G | G | G | * | G | G | ts | S | | | | | |
| 522 | T | * | * | * | * | * | * | * | C | * | * | ts | S | | | | | |
| 599 | C | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | ts | NS | FNS | 200 | T-I | NC | PSC-NP |
| 618 | G | A | A | * | A | A | A | A | * | A | A | ts | S | | | | | |
| 624 | A | * | * | * | * | * | * | * | * | T | * | tv | S | | | | | |
| 627 | T | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | tv | S | | | | | |
| 633 | T | * | * | * | * | * | * | * | C | * | * | ts | S | | | | | |
| 648 | C | T | * | * | T | T | T | T | * | T | T | ts | S | | | | | |
| 669 | G | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | tv | S | | | | | |
| 674 | T | * | * | * | * | * | A | * | * | * | * | tv | NS | | 225 | F-Y | NC | NP-PSC |
| 682 | C | A | * | * | * | * | * | * | * | * | * | tv | NS | | 228 | P-T | NC | NP-PSC |
| 687 | A | * | * | * | G | * | * | * | * | * | * | ts | S | | | | | |
| 690 | T | * | C | * | * | C | C | C | C | C | C | ts | S | | | | | |
| 692 | T | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | NS | | 231 | I-T | NC | NP-PSC |
| 725 | A | * | C | C | C | C | C | C | C | C | C | tv | NS | FNSm | 242 | K-T | NC | P-PSC |
| 739 | G | A | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | NS | | 247 | D-N | NC | N-PSC |
| 747 | G | * | * | * | * | A | * | A | A | A | * | ts | S | | | | | |
| 748 | A | * | G | G | G | G | G | G | G | G | G | ts | NS | FNSm | 250 | T-A | NC | PSC-NP |
| 756 | G | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | ts | S | | | | | |
| 777 | T | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | S | | | | | |

| Hexones | | 1987 | 1990 | 1992 | | 1998 | 1999 | | | | Mut | Sust | Nat | Reemplazo | | | | |
|---------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|------|-----------|-----|--------|------|--------|
| nt | Gomen | av7H | 55 | 22 | 23 | 3 | 1 | 4 | 496 | 1325 | 3187 | Ts/Tv | S/NS | fijado | AA | cambio | C/NC | carga |
| 779 | T | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | NS | | | | | |
| 780 | T | C | * | * | * | C | * | C | C | C | C | ts | S | | 260 | F-S | NC | NP-PSC |
| 828 | C | * | * | * | * | * | * | * | T | * | * | ts | S | | | | | |
| 846 | A | G | * | G | * | G | * | G | * | G | G | ts | S | | | | | |
| 867 | A | G | * | G | * | G | * | G | * | G | G | ts | S | | | | | |
| 870 | T | A | * | A | A | A | * | A | * | A | A | tv | S | | | | | |
| 893 | A | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | ts | NS | FNS | 298 | D-G | NC | N-PSC |
| 972 | C | T | * | T | * | T | * | T | * | T | T | ts | S | | | | | |
| 975 | A | T | * | T | * | T | * | T | * | T | T | tv | S | | | | | |
| 1014 | T | C | * | C | C | C | * | C | * | C | C | ts | S | | | | | |
| 1109 | C | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | tv | NS | FNS | 370 | T-S | C | PSC |
| 1122 | T | C | * | C | C | C | C | C | * | C | C | ts | S | | | | | |
| 1131 | C | T | * | T | T | T | T | T | * | T | T | ts | S | | | | | |
| 1146 | T | C | * | C | C | C | C | C | * | C | C | ts | S | | | | | |
| 1164 | C | T | * | T | T | T | T | T | * | T | * | ts | S | | | | | |
| 1166 | T | * | * | * | * | * | * | * | * | A | * | tv | NS | | 389 | I-N | NC | NP-PSC |
| 1179 | C | T | * | T | T | T | T | T | * | * | T | ts | S | | | | | |
| 1183 | A | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | ts | NS | | 395 | I-V | C | NP |
| 1235 | C | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | tv | NS | FNS | 412 | A-G | NC | NP-PSC |
| 1239 | A | * | C | C | C | C | C | C | T | C | C | tv | NS | FNSm | 413 | K-N | NC | P-PSC |
| 1241 | C | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | tv | NS | FNS | 414 | T-K | NC | PSC-P |
| 1258 | T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | tv | NS | FNS | 420 | S-P | NC | PSC-NP |
| 1262 | A | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | ts | NS | FNS | 421 | K-R | C | P |
| 1268 | A | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | tv | NS | FNS | 423 | N-T | C | PSC |
| 1271 | G | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | tv | NS | FNS | 424 | G-A | NC | PSC-NP |
| 1285 | G | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | ts | NS | FNS | 429 | D-T | NC | N-PSC |
| 1286 | A | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | tv | NS | FNS | 429 | | | |
| 1290 | T | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | tv | NS | FNS | 430 | N-K | NC | PSC-P |
| 1298 | A | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | tv | NS | FNS | 433 | K-T | NC | P-PSC |
| 1300 | T | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | tv | NS | FNS | 434 | S-A | NC | PSC-NP |
| 1320 | C | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | tv | S | | | | | |
| 1326 | C | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | ts | S | FS | | | | |
| 1328 | A | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | tv | NS | FNS | 443 | Q-L | NC | PSC-NP |
| 1356 | C | T | T | T | T | * | T | T | T | T | T | ts | S | | | | | |
| 1358 | T | * | * | * | * | * | * | * | * | C | * | ts | NS | | 453 | L-P | C | NP |
| 1418 | C | * | * | * | * | * | * | * | * | G | * | tv | NS | | 473 | T-R | NC | PSC-P |
| 1419 | G | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | tv | S | | | | | |
| 1422 | A | * | * | * | * | * | * | * | C | * | * | tv | S | | | | | |
| 1435 | C | * | * | * | T | * | * | * | * | * | * | ts | S | | | | | |
| 1436 | T | * | * | * | G | * | * | * | * | * | * | tv | NS | | 479 | L-W | C | NP |
| 1443 | C | T | T | T | T | * | T | T | * | T | T | ts | S | | | | | |
| 1482 | A | T | T | T | * | * | T | T | * | T | T | tv | S | | | | | |
| 1497 | T | C | * | C | C | * | C | C | * | C | C | ts | S | | | | | |
| 1538 | C | * | A | * | * | * | * | * | * | * | * | tv | NS | | 513 | P-Q | NC | NP-PSC |
| 1558 | T | * | * | * | * | * | * | * | * | G | * | tv | NS | | 520 | F-V | C | NP |
| 1560 | C | T | T | T | * | * | T | T | * | T | T | ts | S | | | | | |
| 1561 | A | G | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | NS | | 521 | N-D | NC | PSC-N |
| 1569 | C | * | * | A | * | * | * | * | * | * | * | tv | NS | | 523 | H-Q | NC | P-PSC |
| 1572 | C | * | * | A | * | * | * | * | * | * | * | tv | S | | | | | |
| 1573 | A | G | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | NS | | 525 | N-D | NC | PSC-N |
| 1574 | A | * | * | T | * | * | * | * | * | * | * | tv | NS | | 525 | N-I | NC | PSC-NP |
| 1581 | T | C | C | A | * | * | C | G | * | G | C | ts | S | | | | | |
| 1584 | G | A | A | A | * | * | A | A | * | A | A | ts | S | | | | | |
| 1614 | T | C | C | C | * | * | C | C | * | G | C | ts | S | | | | | |
| 1649 | A | * | C | * | * | * | * | * | * | * | * | tv | NS | | 550 | K-T | NC | P-PSC |
| 1681 | C | * | * | * | * | * | * | * | * | A | * | tv | NS | | | | | |
| 1686 | C | * | * | * | * | * | * | * | * | G | * | tv | S | | | | | |
| 1715 | A | * | C | * | * | * | * | * | * | * | C | tv | NS | | 572 | K-T | NC | P-PSC |
| 1724 | A | * | * | C | * | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 575 | N-T | C | PSC |
| 1735 | C | * | * | * | * | * | * | G | * | * | nd | tv | NS | | 579 | Q-E | NC | PSC-N |
| 1762 | A | * | nd | C | * | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 588 | T-P | NC | PSC-NP |
| 1772 | C | * | nd | * | * | * | * | G | * | * | nd | tv | NS | | 591 | A-G | NC | NP-PSC |
| 1791 | C | * | nd | G | G | G | G | G | G | G | nd | tv | NS | FNSm | 597 | S-R | NC | PSC-P |
| 1797 | T | C | nd | * | * | * | * | * | * | C | nd | ts | S | | | | | |

Tabla 14 (cont): Mutaciones en hexones 1990-1999. Nd: no disponible, Ts: transición, Tv: transversión, S: sinónimo, NS: no sinónimo, C: conservativo, NC: no conservativo, P: positivo, N: negativo, PSC: polar sin carga, NP: no polar, Negrita: fijaciones, FS: fijación sinónima, NS: fijación no sinónima, Itálica: Fijaciones en muestras, FSm: fijación sinónima en muestras, FNSm: fijación no sinónima en muestras, In: inserción, Del: deleción, (*) base sin cambio

| Hexones | | 1987 | 1990 | 1992 | | 1998 | 1999 | | | | | Mut | Sust | Nat | Reemplazo | | | |
|---------|-------|------|------|------|----|------|------|----|-----|------|------|-------|------|--------|-----------|--------|------|--------|
| nt | Gomen | av7H | 55 | 22 | 23 | 3 | 1 | 4 | 496 | 1325 | 3187 | Ts/Tv | S/NS | fijado | AA | cambio | C/NC | carga |
| 1799 | T | * | nd | C | C | C | C | C | C | C | nd | ts | NS | FNSm | 600 | L-P | C | NP |
| 1800 | G | C | nd | A | A | A | A | A | A | A | nd | ts | NS | FSm | | | | |
| 1812 | C | * | nd | A | * | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 604 | F-L | C | NP |
| 1815 | C | * | nd | * | * | * | * | * | * | T | nd | ts | S | | | | | |
| 1823 | C | * | nd | G | G | G | G | G | G | G | nd | tv | NS | FNSm | 608 | A-G | NC | NP-PSC |
| 1833 | A | C | nd | * | * | * | C | * | * | G | nd | tv | S | | | | | |
| 1835 | C | * | nd | G | G | G | G | G | G | G | nd | tv | NS | FNSm | 612 | A-G | NC | NP-PSC |
| 1839 | C | A | nd | A | * | * | A | A | * | A | nd | tv | S | | | | | |
| 1842 | C | T | nd | * | * | * | T | T | * | T | nd | ts | S | | | | | |
| 1858 | C | G | nd | * | * | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 620 | R-G | NC | P-PSC |
| 1887 | C | A | nd | * | * | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 629 | N-K | NC | PSC-P |
| 1899 | T | * | nd | G | * | * | * | * | * | * | nd | tv | S | | | | | |
| 1912 | C | * | nd | G | * | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 638 | L-V | C | NP |
| 1950 | T | C | nd | * | * | * | * | * | * | * | nd | ts | S | | | | | |
| 1968 | C | * | nd | * | * | * | * | * | * | T | nd | tv | S | | | | | |
| 1972 | G | C | nd | * | * | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 658 | A-P | C | NP |
| 1975 | G | C | nd | * | * | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 659 | A-P | C | NP |
| 1986 | C | * | nd | * | * | * | * | * | T | * | nd | ts | S | | | | | |
| 1992 | C | * | nd | * | * | T | * | * | * | * | nd | ts | S | | | | | |
| 1998 | T | * | nd | * | * | C | * | C | C | C | nd | ts | S | | | | | |
| 2001 | G | A | nd | * | * | A | * | A | * | A | nd | ts | S | | | | | |
| 2004 | C | * | nd | * | * | * | * | * | A | * | nd | tv | S | | | | | |
| 2014 | G | * | nd | A | A | A | A | A | A | A | nd | ts | NS | FNSm | 672 | E-K | NC | N-P |
| 2040 | C | * | nd | * | * | * | * | * | T | * | nd | ts | S | | | | | |
| 2053 | G | C | nd | * | * | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 685 | V-R | NC | NP-P |
| 2054 | T | G | nd | * | * | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 685 | | | |
| 2055 | A | T | nd | * | * | T | * | T | * | T | nd | tv | S | | | | | |
| 2088 | C | * | nd | * | * | T | * | T | * | T | nd | ts | S | | | | | |
| 2093 | A | * | nd | * | * | * | * | T | * | * | nd | tv | NS | | 698 | Y-F | NC | PSC-NP |
| 2121 | C | * | nd | A | * | * | A | * | * | * | nd | tv | S | | | | | |
| 2170 | A | T | nd | T | * | T | T | T | * | T | nd | tv | S | | | | | |
| 2171 | G | C | nd | C | * | C | C | C | * | C | nd | tv | S | | | | | |
| 2172 | C | T | nd | T | * | T | T | T | * | T | nd | ts | S | | | | | |
| 2201 | T | * | nd | C | * | * | * | * | * | * | nd | ts | NS | | 734 | V-A | C | NP |
| 2205 | T | C | nd | T | * | T | T | T | * | T | nd | ts | S | | | | | |
| 2214 | G | A | nd | A | A | A | A | A | A | A | nd | ts | S | FS | | | | |
| 2220 | T | * | nd | * | * | * | * | * | C | * | nd | ts | S | | | | | |
| 2226 | C | * | nd | * | * | * | * | * | A | * | nd | tv | S | | | | | |
| 2232 | T | C | nd | C | C | C | C | C | C | C | nd | ts | S | FS | | | | |
| 2233 | A | * | nd | C | * | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 745 | N-H | NC | PSC-P |
| 2256 | G | * | nd | * | * | * | * | * | A | * | nd | ts | S | | | | | |
| 2308 | G | * | nd | * | * | * | T | * | * | * | nd | tv | NS | | 770 | E-W | NC | N-NP |
| 2309 | A | * | nd | * | * | * | G | * | * | * | nd | ts | NS | | 770 | | | |
| 2312 | G | * | nd | * | * | * | A | * | * | * | nd | ts | NS | | 771 | G-E | NC | PSC-N |
| 2334 | C | * | nd | * | * | * | * | * | T | * | nd | ts | S | | | | | |
| 2360 | G | * | nd | * | * | * | C | * | * | * | nd | tv | NS | | 787 | S-T | C | PSC |
| 2418 | C | T | nd | T | T | T | T | T | * | T | nd | ts | S | | | | | |
| 2444 | G | * | nd | * | * | * | A | * | * | * | nd | tv | NS | | 815 | G-E | NC | PSC-N |
| 2445 | G | A | nd | A | A | A | A | A | * | A | nd | tv | S | | | | | |
| 2448 | T | C | nd | C | C | C | C | C | C | C | nd | ts | S | FS | | | | |
| 2454 | A | G | nd | G | G | G | G | G | * | G | nd | ts | S | | | | | |
| 2463 | G | * | nd | * | * | A | * | * | * | * | nd | ts | NS | | 821 | M-I | C | NP |
| 2526 | G | A | nd | A | A | A | A | A | * | A | nd | ts | S | | | | | |
| 2532 | C | T | nd | T | T | T | T | T | T | T | nd | ts | S | FS | | | | |
| 2538 | G | A | nd | A | A | A | A | A | * | A | nd | ts | S | | | | | |
| 2553 | T | C | nd | C | C | C | C | C | C | C | nd | ts | S | FS | | | | |
| 2559 | G | * | nd | * | * | * | * | A | * | * | nd | ts | S | | | | | |
| 2574 | T | A | nd | A | A | A | A | A | * | A | nd | tv | S | | | | | |
| 2577 | C | G | nd | G | G | G | G | G | * | G | nd | tv | S | | | | | |
| 2604 | G | A | nd | A | A | A | A | A | * | A | nd | ts | S | | | | | |
| 2613 | C | G | nd | G | G | G | G | G | * | G | nd | tv | S | | | | | |
| 2629 | A | C | nd | C | C | C | C | C | C | C | nd | tv | NS | FNS | 877 | M-L | C | NP |
| 2646 | A | G | nd | G | G | G | G | G | * | G | nd | ts | S | | | | | |
| 2728 | G | * | nd | * | A | * | * | * | * | * | nd | ts | NS | | 910 | V-K | NC | PSC-P |
| 2729 | T | * | nd | * | A | * | * | * | * | * | nd | tv | NS | | 910 | | | |
| 2760 | C | * | nd | * | A | * | * | nd | nd | * | nd | tv | S | | | | | |

Tabla 14 (cont): Mutaciones en hexones 1990-1999. Nd: no disponible, Ts: transición, Tv: transversión, S: sinónimo, NS: no sinónimo, C: conservativo, NC: no conservativo, P: positivo, N: negativo, PSC: polar sin carga, NP: no polar, Negrita: fijaciones: , FS: fijación sinónima, NS: fijación no sinónima, Itálica: Fijaciones en muestras, FSm: fijación sinónima en muestras, FNSm: fijación no sinónima en muestras, In: inserción, Del: deleción, (*) base sin cambio

Las muestras pertenecieron al GTC2 y presentaron la delección típica de este *cluster*. Las transiciones y transversiones resultaron equivalentes, con 3 sitios donde los polimorfismos fueron mayores a 2, es decir que se produjo más de una sustitución en la misma posición. Se registraron 193 sustituciones siendo 110 sinónimas y 83 no sinónimas. En los cambios de reemplazo aminoacídico no se conservó la carga en 53 mutaciones. En siete sitios el cambio de aminoácido es provocado por la sustitución de más de un nucleótido por codón. Se encontraron fijados, presentes desde 1987 hasta 1999 diez (10) cambios no sinónimos más uno encontrado sólo en muestras. El número de sitios no sinónimos fijados fue mayor (20) sumándole 8 sustituciones presentes sólo en muestras (ausentes en la cepa patrón AV7h). Cabe destacar que se encontraron cambios aminoacídicos fijados desde 1990 hasta 1999 en las cepas de AV7h de evolución fatal (Tabla 15). Estos cambios se encuentran fuera de las HVR y permiten separar casos leves y moderados de los fatales en el análisis filogenético (ver sección *ad hoc*).

Tabla 15: Reemplazos de aminoácidos en muestras fatales AV7 1990-1999.

| <i>Aa.</i> | <i>7h</i> | <i>Muestras fatales</i> | <i>Región antigénica afectada</i> | <i>Región Hexón</i> |
|------------|-----------------------|-------------------------|--|---------------------|
| 597 | Ser (polar sin carga) | Arg (carga positiva) | Epitope B 596-601 Epitope T 588-592 | P1 |
| 608 | Ala (hidrofóbico) | Gly (polar sin carga) | Epitope B 606-615 | PC |
| 612 | Ala (hidrofóbico) | Gly (polar si carga) | Epitope B 606-615 | PC |
| 672 | Asp (carga negativa) | Lys (carga positiva) | Regiones hidrofílicas en superficie | L3 |
| 877 | Met (hidrofóbico) | Leu (hidrofóbico) | Epitope B 876-883 | P2 |

Polimorfismos en las regiones hipervariables del hexón 1990-2002

Adicionalmente se analizaron para 23 muestras AV7 las regiones hipervariables comprendidas entre los nucleótidos 403 a 1356 y los aminoácidos 136 a 452 (numerados de acuerdo a cepa Gomen). En este caso se agregaron 14 mutaciones, de las cuales 8 fueron no sinónimas y 5 de éstas no conservativas. Se adicionaron 5 sitios sinónimos fijados más 1 presente sólo en muestras y dos sitios fijados no sinónimos. Se analizaron todos los fragmentos disponibles independientemente de su longitud final.

Los cambios obtenidos se detallan en la Tabla 16.

Podemos resumir los polimorfismos hallados diciendo que se encontraron en total 207 sitios polimórficos, siendo 91 no sinónimos y 58 de éstos no conservativos. Las transiciones y transversiones fueron parejas dando un índice $\kappa = T_s/T_v = 1.02$, indicando que los sitios explorados están saturados (se probaron al azar todas las sustituciones posibles). Se fijaron en el período 1987-2002 sitios nuevos en 37 posiciones de las cuales 22 se expresaron como aminoácidos diferentes a la cepa prototipo del serotipo 7 (Gomen) La tabla 17 resume lo visto hasta el momento.

| Hexon HVRs | | 1997 | 1997 | 1999 | | | | | | 2000 | | | | | | 2001 | | | | | | 2002 | | | | | | | | | | | | Mut | Sust | Nat | Reemplazo | | | |
|------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|---------|---------|-----|--------|--------|--------|--|-----|------|-----|-----------|--|--|--|
| nt | Gomen | av7H | 10 | 991 | 1390 | 2972 | 3108 | 3150 | 3434 | 3017 | 6800 | 148 | 1924 | 2026 | 2169 | 2268 | 2687 | 2688 | 2966 | 3029 | 3037 | 3270 | 3282 | 3387 | 3478 | Ts/Tv | S/NS | fijado | AA | cambio | C/NC | carga | | | | | | | | |
| 339 | T | C | nd | C | nd | * | nd | nd | nd | C | C | nd | C | C | nd | C | C | nd | nd | C | C | nd | C | nd | nd | ts | S | no more | | | | | | | | | | | | |
| 351 | T | C | nd | C | nd | * | nd | nd | nd | C | * | nd | C | C | nd | C | C | nd | nd | C | C | nd | C | nd | nd | ts | S | no more | | | | | | | | | | | | |
| 390 | C | T | nd | * | nd | T | nd | nd | nd | T | T | nd | T | T | T | T | * | nd | nd | * | T | nd | T | * | nd | ts | S | | | | | | | | | | | | | |
| 393 | T | C | nd | C | nd | C | nd | nd | nd | C | C | nd | C | C | C | C | C | nd | nd | C | C | nd | C | * | nd | ts | S | | | | | | | | | | | | | |
| 415 | G | A | nd | A | nd | A | nd | nd | nd | A | A | nd | A | A | A | A | A | nd | nd | A | A | nd | A | A | nd | ts | NS | FNS | 139 | A-T | NC | NP-PSC | | | | | | | | |
| 417 | A | G | nd | G | nd | G | nd | nd | nd | G | G | nd | G | G | G | G | G | nd | nd | G | G | nd | G | G | nd | ts | S | FS | | | | | | | | | | | | |
| 426 | A | C | nd | C | nd | C | nd | nd | nd | C | C | nd | C | C | C | C | C | nd | nd | C | C | nd | C | C | nd | ts | NS | FNS | 143 | E-D | C | N | | | | | | | | |
| 428 | G | A | nd | A | nd | A | nd | nd | nd | A | A | nd | A | A | A | A | A | nd | nd | A | A | nd | A | A | nd | ts | NS | FNS | 143 | | | | | | | | | | | |
| 429 | A | T | nd | G | nd | G | nd | nd | nd | G | G | nd | G | G | G | G | G | nd | nd | G | G | nd | G | G | nd | tv | NS | FNS | 144 | R-N | NC | P-PSC | | | | | | | | |
| 430-438 | in | del | nd | del | nd | del | nd | nd | nd | del | del | nd | del | del | del | del | del | nd | nd | del | del | nd | del | del | nd | ts | NS | 147 | T-A | NC | PSC-NP | | | | | | | | | |
| 448 | A | T | nd | T | nd | T | nd | nd | nd | T | T | T | T | T | T | T | T | nd | nd | T | T | nd | T | T | nd | tv | NS | FNSH | 150 | N-Y | C | PSC | | | | | | | | |
| 465 | T | * | nd | * | nd | * | nd | nd | nd | * | * | * | * | * | * | * | * | C | nd | * | * | * | * | * | nd | ts | S* | | | | | | | | | | | | | |
| 470 | T | C | nd | C | nd | C | nd | nd | nd | C | C | C | C | C | C | C | C | C | nd | C | C | nd | C | C | nd | ts | NS | FNSH | 157 | M-T | NC | NP-PSC | | | | | | | | |
| 492 | A | G | nd | G | nd | G | nd | nd | nd | G | G | * | G | G | G | G | * | * | nd | G | G | nd | G | G | nd | ts | S | | | | | | | | | | | | | |
| 522 | T | * | nd | * | nd | * | nd | nd | nd | * | * | * | * | * | * | * | * | * | nd | * | * | * | G | * | nd | tv | S | con 496 | | | | | | | | | | | | |
| 525 | A | * | nd | * | nd | * | nd | nd | nd | * | * | * | * | * | * | * | * | T | nd | * | * | nd | * | * | nd | ts | S* | | | | | | | | | | | | | |
| 529 | A | * | nd | T | nd | * | nd | nd | nd | * | * | * | * | * | * | * | * | T | nd | * | * | nd | * | * | nd | tv | NS* | 177 | N-Y | C | PSC | | | | | | | | | |
| 537 | C | * | nd | * | nd | * | nd | nd | nd | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | nd | A | nd | tv | S* | | | | | | | | | | | | | | |
| 599 | C | T | nd | T | T | T | nd | nd | nd | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | nd | ts | NS | FNS | 200 | T-I | NC | PSC-NP | | | | | | | | |
| 614 | A | * | nd | * | * | * | nd | nd | nd | * | G | * | G | * | * | * | * | * | * | * | * | nd | * | * | nd | ts | NS* | 205 | E-G | NC | N-PSC | | | | | | | | | |
| 618 | G | A | nd | A | A | A | nd | nd | nd | A | A | A | A | A | A | A | A | * | A | A | A | nd | A | A | nd | ts | S | | | | | | | | | | | | | |
| 648 | C | T | nd | * | T | T | nd | nd | nd | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | nd | ts | S | | | | | | | | | | | | | |
| 649 | A | * | nd | * | * | * | nd | nd | nd | G | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | nd | * | * | nd | ts | NS* | 217 | K-E | NC | P-N | | | | | | | | | |
| 690 | T | * | nd | C | * | * | nd | nd | nd | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | nd | ts | S | | | | | | | | | | | | | | |
| 725 | A | * | nd | C | C | nd | nd | nd | nd | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | nd | tv | NS | FNSm | 242 | K-T | NC | P-PSC | | | | | | | | | |
| 747 | G | * | nd | A | A | nd | nd | nd | nd | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | ts | S | FSHm | | | | | | | | | | | | | |
| 748 | A | * | nd | G | G | nd | nd | nd | nd | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | nd | ts | NS | FNSm | 250 | T-A | NC | PSC-NP | | | | | | | | | |
| 780 | T | C | nd | C | C | nd | nd | C | * | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | ts | S | | | | | | | | | | | | | | |
| 822 | G | * | nd | * | * | nd | nd | * | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | C | nd | * | ts | S* | | | | | | | | | | | | | | |
| 846 | A | G | nd | G | G | nd | nd | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | nd | ts | S | FSH | | | | | | | | | | | | | |
| 867 | A | G | nd | G | G | nd | nd | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | ts | S | FSH | | | | | | | | | | | | | |
| 870 | T | A | nd | A | A | nd | nd | A | * | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | nd | ts | S | | | | | | | | | | | | | | |
| 893 | A | G | nd | G | G | nd | nd | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | ts | NS | FNS | 298 | D-G | NC | N-PSC | | | | | | | | | |
| 972 | C | T | * | T | T | nd | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | ts | S | | | | | | | | | | | | | | |
| 975 | A | T | * | T | T | nd | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | ts | S | | | | | | | | | | | | | | |
| 986 | A | * | * | C | * | nd | * | * | * | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | NS* | 329 | N-T | C | PSC | | | | | | | | | | |
| 1014 | T | C | C | C | * | nd | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | ts | S | | | | | | | | | | | | | | |
| 1028 | A | * | * | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | NS* | 343 | Q-L | NC | PSC-NP | | | | | | | | | | |
| 1029 | A | * | G | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | S* | | | | | | | | | | | | | | |
| 1033 | A | * | * | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | NS* | 345 | N-Y | C | PSC | | | | | | | | | | |
| 1049 | T | * | * | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | NS* | 350 | L-S | NS | NP-PSC | | | | | | | | | | |
| 1084 | T | * | * | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | ts | S* | | | | | | | | | | | | | | |
| 1109 | C | G | G | G | G | nd | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | nd | ts | NS | FNS | 370 | T-S | C | PSC | | | | | | | | | |
| 1122 | T | C | C | C | nd | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | ts | S | FSH | | | | | | | | | | | | | |
| 1131 | C | T | T | T | T | nd | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | ts | S | FSH | | | | | | | | | | | | | |
| 1135 | G | * | * | A | * | nd | nd | * | * | * | * | A | * | * | * | * | * | * | * | nd | A | nd | * | * | ts | NS* | 379 | A-T | NC | NP-PSC | | | | | | | | | | |
| 1146 | T | C | C | * | C | nd | nd | * | C | C | C | * | C | C | nd | * | C | nd | * | nd | C | C | C | ts | S | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1164 | C | T | T | T | nd | nd | T | nd | T | * | nd | T | nd | nd | nd | T | T | nd | nd | nd | T | T | nd | nd | ts | S | | | | | | | | | | | | | | |
| 1166 | T | * | * | A | A | nd | nd | nd | nd | * | * | * | nd | nd | nd | nd | * | * | nd | nd | nd | nd | * | * | ts | NS | con 496 | 389 | I-N | NC | NP-PSC | | | | | | | | | |
| 1179 | C | T | T | T | nd | nd | nd | nd | nd | T | T | nd | nd | nd | nd | nd | nd | T | T | nd | nd | nd | nd | nd | ts | S | FSH | | | | | | | | | | | | | |
| 1183 | A | G | G | G | nd | nd | nd | nd | nd | G | G | nd | nd | nd | nd | nd | nd | G | G | nd | nd | nd | nd | nd | ts | NS | FNS | 395 | I-V | C | NP | | | | | | | | | |

Tabla 16: Mutaciones en HVRs hexones 1991-2002
Nd: no disponible, Ts: transición, Tv: transversión, S: sinónimo, NS: no sinónimo, C: conservativo, NC: no conservativo, P: positivo, N: negativo, PSC: polar sin carga, NP: no polar, Negrita: fijaciones, FS: fijación sinónima, FNS: fijación no sinónima, Itálica: Fijaciones en muestras, FSm: fijación sinónima en muestras, FNSm: fijación no sinónima en muestras, In: inserción, Del: delección. Se marcaron un (*) las sustituciones nuevas y las bases sin cambio según corresponda.

Tabla 17 Resumen polimorfismos hexones 1987-2002

a-Análisis de mutaciones

| | HEXON | HVR | Totales |
|---------------------|-------|-----|------------|
| Sinónimas | 110 | 6 | 116 |
| No Sinónimas | 83 | 8 | 91 |
| Conservativas | 21 | 3 | |
| No Conservativas | 53 | 5 | |
| | | | 207 |

b-Análisis de sustituciones

| | HEXON | HVR | SubTotales | Totales |
|-----------------------|-------|-----|------------|-------------|
| Transiciones | 97 | 8 | 105 | |
| polim>2 | 1 | 0 | 1 | 106 |
| Transversiones | 95 | 6 | 101 | |
| polim>2 | 2 | 1 | 3 | 104 |
| Totales | 195 | 15 | | 210 |
| | | | Ts/Tv= | 1,02 |

c-Análisis de sitios fijados

| | HEXON | HVR | Totales |
|---------------------|-------|-----|-----------|
| Sinónimos | 10 | 5 | |
| en muestras | 1 | 1 | 17 |
| No Sinónimos | 20 | 2 | |
| en muestras | 8 | 0 | 30 |
| Totales | 39 | 8 | 47 |

Si tenemos en cuenta la longitud del fragmento (L) y los sitios polimórficos o segregantes (S) podemos calcular la diversidad encontrada en el período como S/L y expresarla como porcentaje. Esta relación se calculó para todas las muestras analizadas desde 1990 hasta 2002 y dio una mediana de 3.49% (rango 1.83-4.65), aunque si se calcula tomando en cuenta todos los polimorfismos hallados desde la descripción del AV7h en 1987 se eleva notoriamente a 7.36%. Para tener en cuenta los errores introducidos por el uso de DNA polimerasas en el proceso de PCR y secuenciación se normaliza este cociente dividiéndolo por el número total de ciclos aplicados. En las muestras este parámetro da mayor que lo esperado indicando que los cambios no son artefactos de la técnica aplicada, teniendo en cuenta que el error de un Taq DNA polimerasa ronda $4-9 \times 10^{-6}$ (Smith *et al.*, 1997).

Se calculó también para todas las muestras el índice ω que relaciona las sustituciones no sinónimas y sinónimas. Este cociente es indicador del tipo de selección que está operando sobre el gen analizado. En las muestras 1990-2002 dio una mediana de 0.46 (rango 0.2-1.16) y tomando en cuenta los polimorfismos desde el hallazgo de la cepa patrón del AV7h en 1987 da 0.78. En ambos casos es menor que 1 indicando que es un mecanismo de selección purificadora el que se está observando.

Todas las muestras analizadas conservan las mutaciones típicas de genotipo 7h entre los aa127-310, aa383-538 y aa757-852. Se detallan en la Tabla 18 los datos y cálculos obtenidos.

Tabla 18: Datos y cálculos sobre mutaciones hexones 1987-2002. L: longitud del fragmento, S: sustitución sinónima, NS: sustitución no sinónima, ω =NS/S, Diversidad media (%)= (sitios polimórficos/L)*100, diversidad por ciclo PCR= Diversidad media/60 (30 de PCR+ 30 secuenciación).

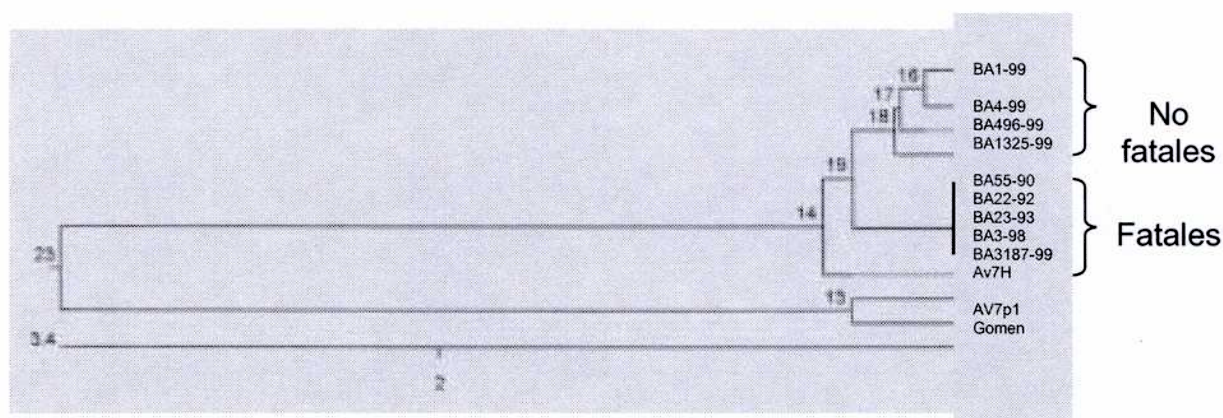
| Hexones | | | Sitios | | Mutaciones | | ω | Diversidad | |
|--------------|---------|--------|--------------|--------------|------------|------|----------|-----------------------|-----------------------|
| Año | Muestra | L (pb) | monomórficos | polimórficos | S | NS | | media (%) | por ciclo PCR |
| 1987 | av7h | 2808 | 2703 | 105 | 70 | 35 | 0,50 | 3,74 | $6,23 \times 10^{-4}$ |
| 1990 | 55 | 1748 | 1689 | 59 | 30 | 29 | 0,97 | 3,38 | $5,63 \times 10^{-4}$ |
| 1991 | 10 | 436 | 428 | 8 | 6 | 2 | 0,33 | 1,83 | $3,06 \times 10^{-2}$ |
| 1992 | 22 | 2802 | 2700 | 102 | 63 | 39 | 0,62 | 3,64 | $6,07 \times 10^{-4}$ |
| | 23 | 2748 | 2664 | 84 | 48 | 36 | 0,75 | 3,06 | $5,09 \times 10^{-4}$ |
| 1998 | 3 | 2727 | 2636 | 91 | 59 | 32 | 0,54 | 3,34 | $5,56 \times 10^{-4}$ |
| 1999 | 1 | 2727 | 2628 | 99 | 59 | 40 | 0,68 | 3,63 | $6,05 \times 10^{-4}$ |
| | 4 | 2414 | 2322 | 92 | 58 | 34 | 0,59 | 3,81 | $6,35 \times 10^{-4}$ |
| | 496 | 2679 | 2610 | 69 | 36 | 33 | 0,92 | 2,58 | $4,29 \times 10^{-4}$ |
| | 991 | 774 | 741 | 33 | 20 | 13 | 0,65 | 4,26 | $7,11 \times 10^{-2}$ |
| | 1325 | 2484 | 2387 | 97 | 61 | 36 | 0,59 | 3,90 | $6,51 \times 10^{-4}$ |
| | 1390 | 602 | 587 | 15 | 12 | 3 | 0,25 | 2,49 | $4,15 \times 10^{-2}$ |
| | 2972 | 279 | 266 | 13 | 6 | 7 | 1,17 | 4,66 | $7,77 \times 10^{-2}$ |
| | 3106 | 190 | 185 | 5 | 4 | 1 | 0,25 | 2,63 | $4,39 \times 10^{-2}$ |
| | 3150 | 423 | 411 | 12 | 10 | 2 | 0,20 | 2,84 | $4,73 \times 10^{-2}$ |
| | 3187 | 1665 | 1600 | 65 | 39 | 26 | 0,67 | 3,90 | $6,51 \times 10^{-4}$ |
| 3434 | 381 | 370 | 11 | 9 | 2 | 0,22 | 2,89 | $4,81 \times 10^{-2}$ | |
| 2000 | 3017 | 780 | 749 | 31 | 21 | 10 | 0,48 | 3,97 | $6,62 \times 10^{-2}$ |
| 2001 | 6800 | 775 | 744 | 31 | 19 | 12 | 0,63 | 4,00 | $6,67 \times 10^{-2}$ |
| 2002 | 148 | 739 | 721 | 18 | 12 | 6 | 0,5 | 2,44 | $4,06 \times 10^{-2}$ |
| | 1924 | 746 | 718 | 28 | 18 | 10 | 0,56 | 3,75 | $6,26 \times 10^{-2}$ |
| | 2026 | 766 | 737 | 29 | 20 | 9 | 0,45 | 3,79 | $6,31 \times 10^{-2}$ |
| | 2169 | 744 | 718 | 26 | 16 | 10 | 0,63 | 3,49 | $5,82 \times 10^{-2}$ |
| | 2268 | 727 | 701 | 26 | 17 | 9 | 0,53 | 3,58 | $5,96 \times 10^{-2}$ |
| | 2687 | 749 | 724 | 25 | 16 | 9 | 0,56 | 3,34 | $5,56 \times 10^{-2}$ |
| | 2688 | 747 | 726 | 21 | 15 | 6 | 0,4 | 2,81 | $4,69 \times 10^{-2}$ |
| | 2966 | 668 | 649 | 19 | 15 | 4 | 0,27 | 2,84 | $4,74 \times 10^{-2}$ |
| | 3029 | 715 | 690 | 25 | 16 | 9 | 0,56 | 3,50 | $5,83 \times 10^{-2}$ |
| | 3037 | 747 | 719 | 28 | 18 | 10 | 0,56 | 3,75 | $6,25 \times 10^{-2}$ |
| | 3270 | 156 | 153 | 3 | 3 | 0 | 0 | 1,92 | $3,21 \times 10^{-2}$ |
| | 3282 | 751 | 722 | 29 | 20 | 9 | 0,45 | 3,86 | $6,44 \times 10^{-2}$ |
| | 3387 | 766 | 741 | 25 | 16 | 9 | 0,56 | 3,26 | $5,44 \times 10^{-2}$ |
| 3478 | 438 | 423 | 15 | 12 | 3 | 0,25 | 3,42 | $5,71 \times 10^{-2}$ | |
| Total | | 2808 | 2601 | 207 | 116 | 91 | 0,78 | 7,37 | 0,12 |

El total de la Tabla 18 se refiere a la suma de todos los polimorfismos (S) hallados sobre una longitud óptima de 2808 bases y trata de integrar, de manera grosera lo que pudo haber sucedido en el período desde la caracterización de la cepa AV7h hasta el año 2002.

Inferencia filogenética

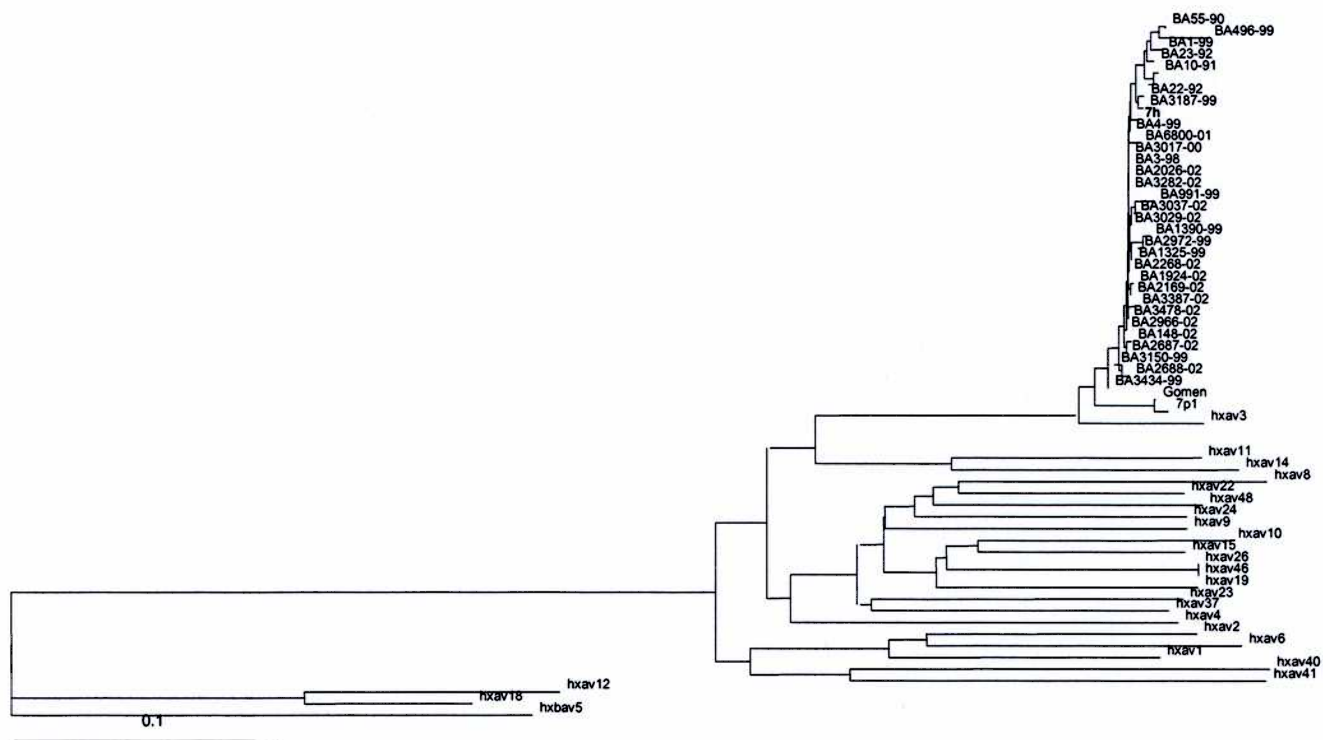
El análisis filogenético del hexón completo permitió agrupar las muestras fatales y las separó de las graves y leves como se puede ver en el siguiente árbol (Figura 37).

Figura 37: Inferencia filogenético hexones completos 1990-1999: La escala indica en el árbol los % de distancia y los números las sustituciones. Se utilizo la tabla de residuos PAM250.



Si analizamos las regiones hipervariables obtenemos la Figura 38. Allí se constata la asociación del genotipo y la relación con los serotipos de Adenovirus que tienen secuencia de hexón descritas. No se pudieron analizar las muestras BA3106-99 y BA3270-99 por datos insuficientes para este análisis. Se separan claramente las especies de Adenovirus humanos A (AV12 y 18), C (AV1, 2 y 6), D (AV8, 9, 10, 15, 19, 22, 24, 26, 37, 46 y 48), E (AV4). Dentro de la especie B se separa la subespecie B2 (AV11 y 14) de la B1 (AV3 y 7). Dentro de la subespecie B1, podemos separar los *clusters* genómicos GTC1 (AV7p1 y Gomen) del GTC2 (AV7h y todas las muestras analizadas 1990-2002).

Figura 38: Inferencia filogenética de las regiones hipervariables de los hexones 1990-2002.



Resultados secuenciación genoma AV7h

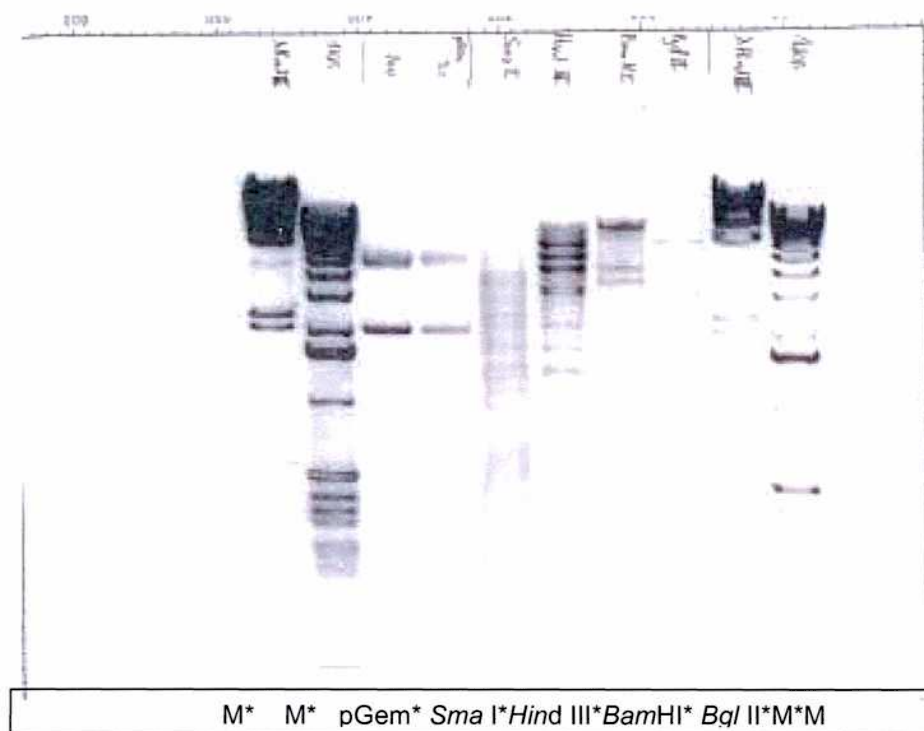
Clonado

Se digirió el DNA del AV7h con enzimas de restricción *BamH* I, *Bg* III, *Hind* III y *Sma* I. Los fragmentos coincidieron con Niel *et al.*, 1991 (Figura 39).

Los insertos se purificaron, se cuantificaron y se hicieron 2 ligaciones L1 y L2, en cada caso ligando vector a los productos de digestión *BamH* I, *Bg* III, *Hind* III. Se descartaron los fragmentos generados por corte con *Sma* I por no tener cantidad suficiente de inserto para ligar. Se hicieron 2 transformaciones T1 (con L1) y T2 (con L2). De la ligación L1-*Hind* III, obtuvimos diez colonias blancas (positivas).

Las colonias se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio y resultaron positivas 6 colonias que tenían insertos cuyo peso molecular correspondería al fragmento grande de *Hind* III de 7000 pb.

Figura 39: Corte de restricción para DNA genómico AV7h



Secuenciación de clones

Se secuenciaron 2 μ L (200ng) del producto de amplificación isotérmica del *rolling cycling*. Se realizó una búsqueda en la base de datos pública para comprobar los fragmentos obtenidos (Altschul *et al.*, 1997).

1. Clon H53 T7 homología con AV7 Gomen nucleótidos 22360-23050
2. Clon H22 T7 homología con AV7 Gomen nucleótidos 27550-28271.
3. Clon H12 Sp6 homología con AV7 Gomen nucleótidos 1893-2642.
4. Clon 254 Sp6 homología con AV7 Gomen nucleótidos 2506-2800.
5. Clon 254 T7 homología con AV7 Gomen nucleótidos 5351-6140.

Esta estrategia no resultó muy productiva, teniendo poco rendimiento tanto en las ligaciones como en la secuenciación. Estos datos fueron integrados en el esquema general de trabajo pero la estrategia se descartó y se continuó con la estrategia de PCR.

Diseño de *primers* específicos y amplificación

Se diseñaron 155 *primers* específicos con el programa Primer Select del paquete de software Lasergene (DNASTar Inc., Madison WI) para la secuenciación completa del AV7h a partir de los dos moldes disponibles en GenBank. (Tabla 19)

Tabla 19: Moldes para el diseño de *primers* para secuenciación genomaAV7h

| <i>Molde</i> | <i>Región (pb)</i> | <i>Longitud</i> | <i>Primers</i> |
|--------------|--------------------|-----------------|----------------|
| AV7 Gomen | 0-10704 | 10704 | 44 |
| AV11p | 10600-13750 | 3150 | 16 |
| AV7 Gomen | 13684-15367 | 1683 | 7 |
| AV11p | 15100-18700 | 3600 | 15 |
| AV7 Gomen | 18115-21387 | 3272 | 14(*) |
| AV11p | 21000-27200 | 6200 | 26 |
| AV7 Gomen | 26578-31899 | 5321 | 18(*) |
| AV11p | 31300-34794 | 3494 | 15 |

En las celdas marcadas con asteriscos adicionalmente se hizo uso de *primers* de PCR de tipificación disponibles para familia, especie, subespecie y cluster (Hierholzer *et al.*, 1993; Kidd *et al.*, 1996, Xu *et al.*, 2000y Xu & Erdman, 2001)

Se obtuvieron templados de PCR por duplicado de 400 a 1200 pb., se corrieron en geles de agarosa al 2% en buffer TAE teñidos con bromuro de etidio, se purificaron por columnas comerciales y se cuantificaron por densitometría comparativa.

Secuenciación de productos de PCR

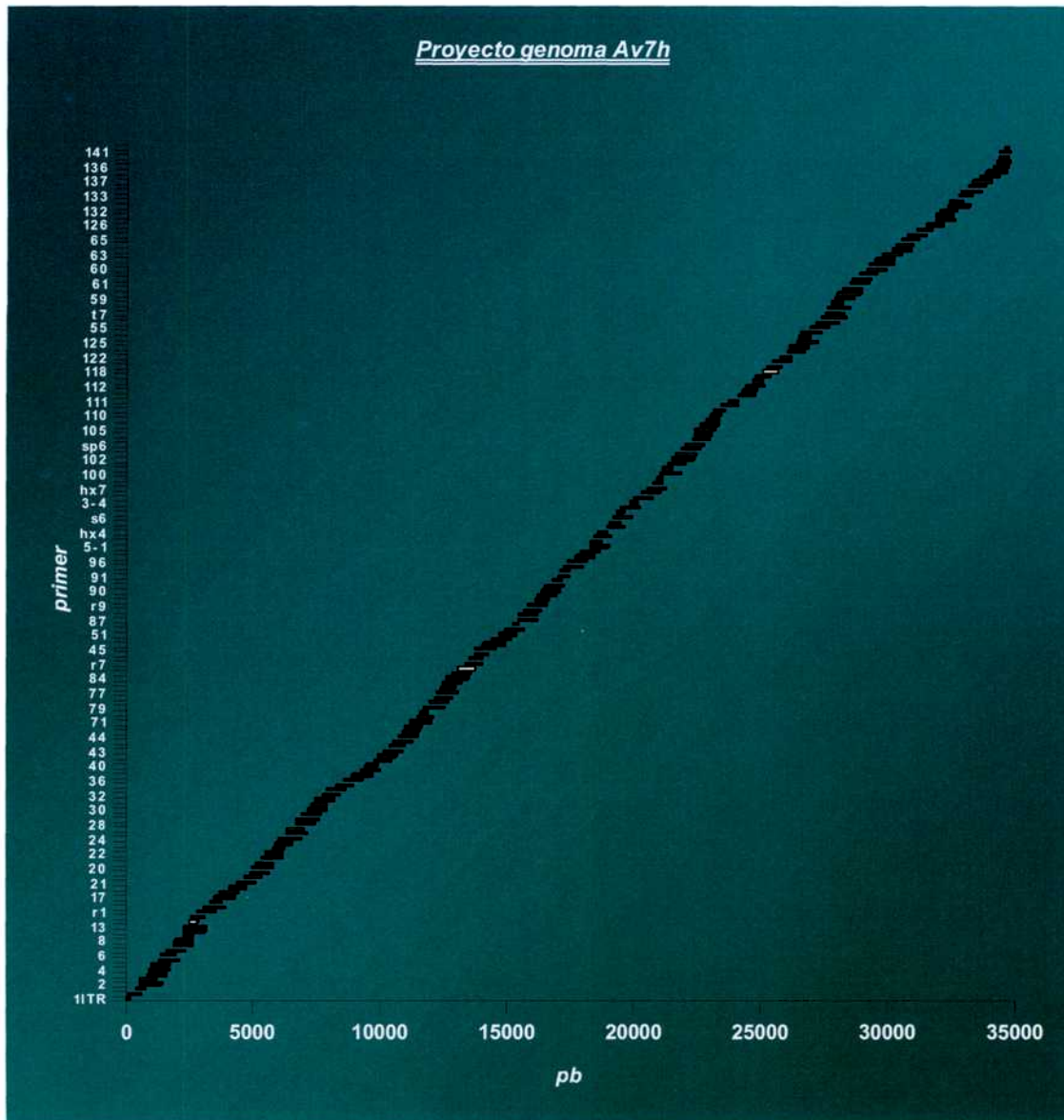
Se secuenciaron 80-150 ng de producto de PCR de acuerdo al peso molecular bajo las condiciones estándar en equipo automático capilar. Los electroferogramas obtenidos se visualizaron con el programa Chromas v 1.45 y se alinearon con el programa ClustalX v1.83.

Los resultados de secuenciación pueden verse en la Figura 40. Se tomó para cada *primer* (eje y) su punto de origen putativo (referido a la cepa AV11p) y la longitud del fragmento leído (eje x). Se puede apreciar que la redundancia es alta y la cobertura es total.

Obtención de la secuencia consenso para el genoma AV7h

Se alinearon primero las secuencias realizadas con el mismo *primer* para el mismo templado amplificado en dos reacciones de PCR independientes (duplicados). Se obtuvo una secuencia consenso para ese *primer*. Luego se integró esta secuencia en un alineamiento general ordenado en base al molde. Se realizó el mismo proceso para el *primer* complementario de ese par y así sucesivamente con los 155 *primers* diseñados. De esta manera se trabajó con una estrategia de *contigs* apilando pares de amplicones solapados hasta obtener una redundancia mínima de 4 (la misma base leída en dos amplificaciones independientes por dos *primers* 5'3' y dos *primers* 3'5'). A cada *contig* se lo designó de acuerdo a su punto de origen en nucleótidos basado en la secuencia completa del AV11p. Para cada *contig* se obtuvo una secuencia consenso.

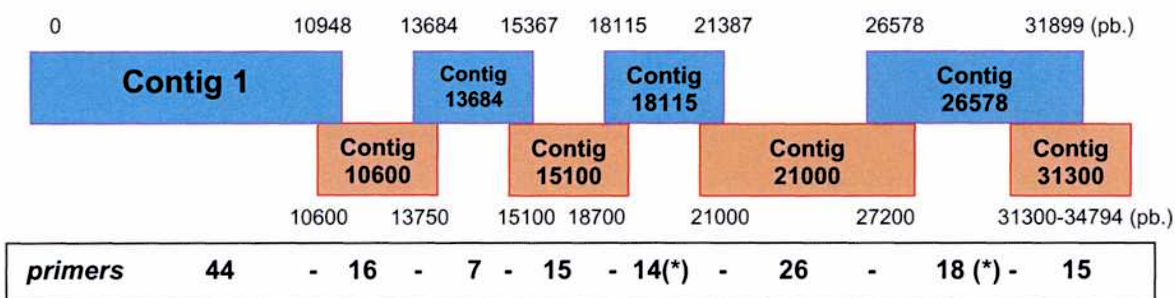
Figura 40: Cobertura de genoma AV7h



A su vez los *contigs* se solaparon entre sí en un alineamiento donde sus extremos aparecían en el *contig* continuo. Se obtuvo así una secuencia consenso final.

Se señalan en la Figura 41 en celeste los *contigs* cuyos *primers* fueron diseñados en base a secuencias de AV7 Gomen y en naranja los que fueron diseñados en base a AV11p. Se muestra el alcance de cada uno de ellos (en pb), cómo se solapan y se recuerda el número de *primers* utilizado para armar cada *contig*.

Figura 41: Esquema de los contigs del armado del genoma AV7h



Análisis de la secuencia completa del genoma de AV7h

La secuencia completa del AV7h consta de 35263 nucleótidos. La composición en bases se ve en la Tabla 20

Tabla 20: Composición de bases del genoma AV7h

| Base | Cantidad | Porcentaje |
|-------------|-----------------|-------------------|
| G | 8891 | 25 |
| A | 8961 | 25 |
| T | 8361 | 24 |
| C | 9046 | 26 |

El contenido de G+C es 51%. Se comparó la secuencia completa obtenida con los genomas de la especie B disponibles en bases de datos públicas (Tabla 21).

Tabla 21: Comparación con secuencias de especie B del genoma AV7h

| Genoma | GenBank | Longitud | Homología |
|-------------------|-----------|----------|-----------|
| HAdV-B | NC_004001 | 35524 | 84% |
| AV11p | AY163756 | 34794 | 84% |
| AV7vacunal | AY495969 | 35514 | 96% |

Las diferencias en la homología están dadas porque la cepa Av11p y HAdV-B (Adenovirus de simio 21, o humano especie B) pertenecen a la subespecie B:2 mientras que la cepa AV7 vacunal pertenece a la misma subespecie que el AV7h (subespecie B:1).

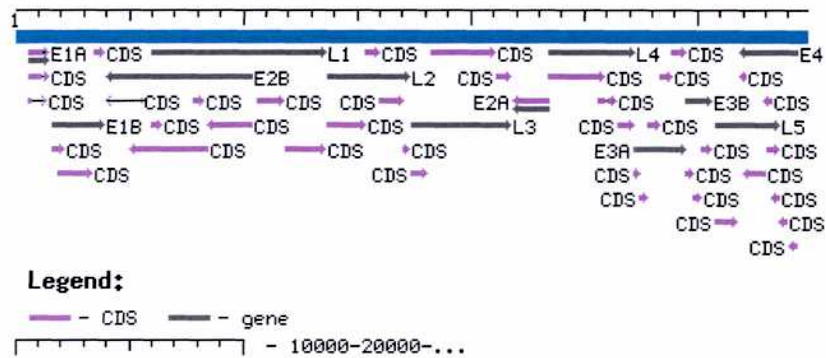


Figura 44: Mapa de transcripción de AV/h (genes en gris y proteínas en rosa).

Como hemos visto gráficamente, la organización genómica corresponde a la descrita para Adenovirus humanos. Se constata la presencia de todos los genes tempranos, intermedios y tardíos en las ubicaciones previstas.

Los ITRs se ubicaron en ambos extremos con una longitud de 136 pb., conservando el motivo ATAATATACC de unión a la proteína terminal (TP) y a la DNA polimerasa durante la replicación.

La señal de ensamblado (*packaging*) descrita para los nucleótidos 247-387 para AV11p se encuentra conservada, manteniendo una homología de 83.6% con éste y 100% con la cepa reportada de AV7 vacunal.

Se encontró también la secuencia de VA RNA_I y VA RNA_{II}. Se localizan desde los nucleótidos 10306 hasta 10890.

Expresión génica

Genes tempranos

Para el gen E1, se encontraron dos unidades de transcripción: E1A y E1B. E1A presentó dos proteínas de 24K y 28K y E1B dos proteínas de 21K y 55K. La proteína de 21K es el precursor de la de 19K.

E2 presenta dos regiones, E2A y E2B separadas físicamente en la cadena negativa. E2A codifica la DBP (*DNA binding protein*) proteína de unión al DNA viral y E2B codifica la DNA polimerasa y la proteína IVa2. Estas proteínas son esenciales para la replicación.

E3 codifica 8 proteínas (12.1K, 16.1K, 18.5K, 20.1K, 20.5K, 10.3K, 14.9K y 15.3K).

E4 presenta 7 marcos de lectura diferentes en la cadena negativa.

Genes intermedios

Los genes intermedios producen dos proteínas pIX y pIVa2. La proteína pIVa2 comparte el extremo N-terminal con la DNA polimerasa.

Genes tardíos

Se hallaron las 5 familias de genes tardíos (L1-L5) en la región central del genoma.

L1 codifica las proteínas de 52/55K y pIIIa como productos principales.

L2 codifica las proteínas III (base del pentón), V, VI, pVII y X (μ).

L3 codifica el hexón (II) y la proteasa viral de 23K.

L4 presenta 4 ORFs, con proteínas 100K, 33K y pVIII.

L5 codifica la proteína IV (fibra).

Se detallan en la Tabla 22 la localización de los genes, de sus ORFs y las proteínas que codifican.

Tabla 22: Localización física y propiedades de los ORFs de AV/h

| Gen | Cadena | Principio | Fin | Longitud | ORF | Proteína | aa |
|------------|--------|-----------|-------|----------|-----|-------------------|---------|
| E1A | + | 576 | 1169 | 594 | 3 | 28K+24K | 197 |
| | + | 1212 | 1454 | 243 | 3 | 28K+24K | 80 |
| E1B | + | 1602 | 2138 | 537 | 3 | 21K(19K) | 178/173 |
| | + | 1907 | 3184 | 1278 | 2 | 55k | 425 |
| INTERMEDIO | + | 3405 | 3896 | 492 | 3 | IX | 163 |
| E2B | (-) | 3949 | 5160 | 1212 | -1 | IVa2 | 448 |
| | (-) | 5052 | 8420 | 3369 | -2 | DNA polim | 1122 |
| L1 | + | 6145 | 6465 | 321 | 1 | 11,5K | 106 |
| | + | 7830 | 8585 | 756 | 3 | 15,3 agnoproteína | 251 |
| E2B | (-) | 8423 | 10345 | 1923 | -3 | pTP | 640 |
| L1 | + | 10834 | 11412 | 579 | 1 | 52/55k | 192 |
| | + | 11366 | 11752 | 387 | 2 | 55K | 128 |
| | + | 11694 | 11993 | 300 | 3 | 52/55K | 99 |
| | + | 12019 | 12378 | 360 | 1 | pIIIa(43K) | 119 |
| | + | 12372 | 13787 | 1416 | 3 | pIIIa | 471 |
| L2 | + | 13867 | 15498 | 1632 | 1 | Base penton(III) | 543 |
| | + | 15510 | 16088 | 579 | 3 | pVII | 192 |
| | + | 16641 | 17090 | 450 | 1 | V (39K) | 149 |
| | + | 17264 | 17491 | 228 | 3 | Px(μ) | 75 |
| L3 | + | 17565 | 18317 | 753 | 1 | pVI | 250 |
| | + | 18430 | 21234 | 2805 | 2 | Hexón (II) | 934 |
| | + | 21271 | 21882 | 612 | 3 | 23K Pr | 203 |
| E2A | (-) | 21990 | 23543 | 1554 | -1 | DBP | 143 |
| L4 | + | 23704 | 25509 | 1806 | 1 | 100k | 590 |
| | + | 25272 | 25505 | 234 | 3 | 7,3K(Asoc Hx) | 77 |
| | + | 25771 | 26337 | 567 | 3 | 22K | 188 |
| | + | 26700 | 27383 | 684 | 2 | VIII (33K) | 227 |
| E3 | + | 27383 | 27703 | 321 | 1 | 12,1K | 106 |
| | + | 27657 | 28097 | 441 | 2 | 16,1K | 146 |
| | + | 28082 | 28600 | 519 | 1 | gp19k(18,5K) | 172 |
| | + | 28630 | 28974 | 345 | 3 | 20,1K | 114 |
| | + | 29182 | 29751 | 570 | 3 | gp20,5k | 189 |
| | + | 29983 | 30258 | 276 | 3 | 10,3K | 91 |
| | + | 30230 | 30667 | 438 | 1 | 14,9K(p) | 146 |
| | + | 30660 | 31070 | 411 | 2 | 15,3K-p14K | 136 |
| U | (-) | 31115 | 31276 | 162 | -1 | U exon | 53 |
| L5 | + | 31291 | 32250 | 960 | 3 | Fibra(IV) | 319 |
| E4 | (-) | 32291 | 32542 | 252 | -1 | ORF6/7 | 83 |
| | (-) | 32539 | 33438 | 900 | -2 | ORF6 | 299 |
| | (-) | 33341 | 33709 | 369 | -1 | ORF4(13,6K) | 122 |
| L5 | + | 33564 | 34073 | 510 | 2 | IV agnoproteína | 169 |
| E4 | (-) | 33718 | 34071 | 354 | -2 | ORF3(13K) | 117 |
| | (-) | 34068 | 34502 | 435 | -3 | ORF2(14,3K) | 144 |
| | (-) | 34499 | 34876 | 378 | -1 | ORF1(13,9K) | 125 |

Análisis de recombinación

Se utilizaron dos métodos para medir si existía recombinación entre los genomas secuenciados de Adenovirus. Se analizaron las secuencias de un genoma de cada especie humana disponible en las bases de datos públicas (A-E) junto con los del AV11p y AV7 vacunal. Los resultados fueron negativos por ambos métodos. Esto no es sorprendente ya que un ancestro no muy lejano como el AV11p se postula como derivativo del AV35 (D) con la sustitución de la fibra por AV7 (Stone *et al.*, 2003). La probabilidad que cambios tan abruptos ocurran en un lapso de tiempo corto en virus DNA no debería ser alta, a diferencia de lo que sucede en virus RNA (Domingo & Holland, 1997).

Inferencia filogenética

Para reflejar las relaciones filogenéticas entre los genomas disponibles en las bases de datos públicas se testearon los 56 modelos de sustituciones posibles para develar cuál de ellos estaba operando en Adenovirus mediante el programa Modeltest v3.06 (Posada & Crandall, 1998). La composición estimada de bases fue

freqA = 0.4043

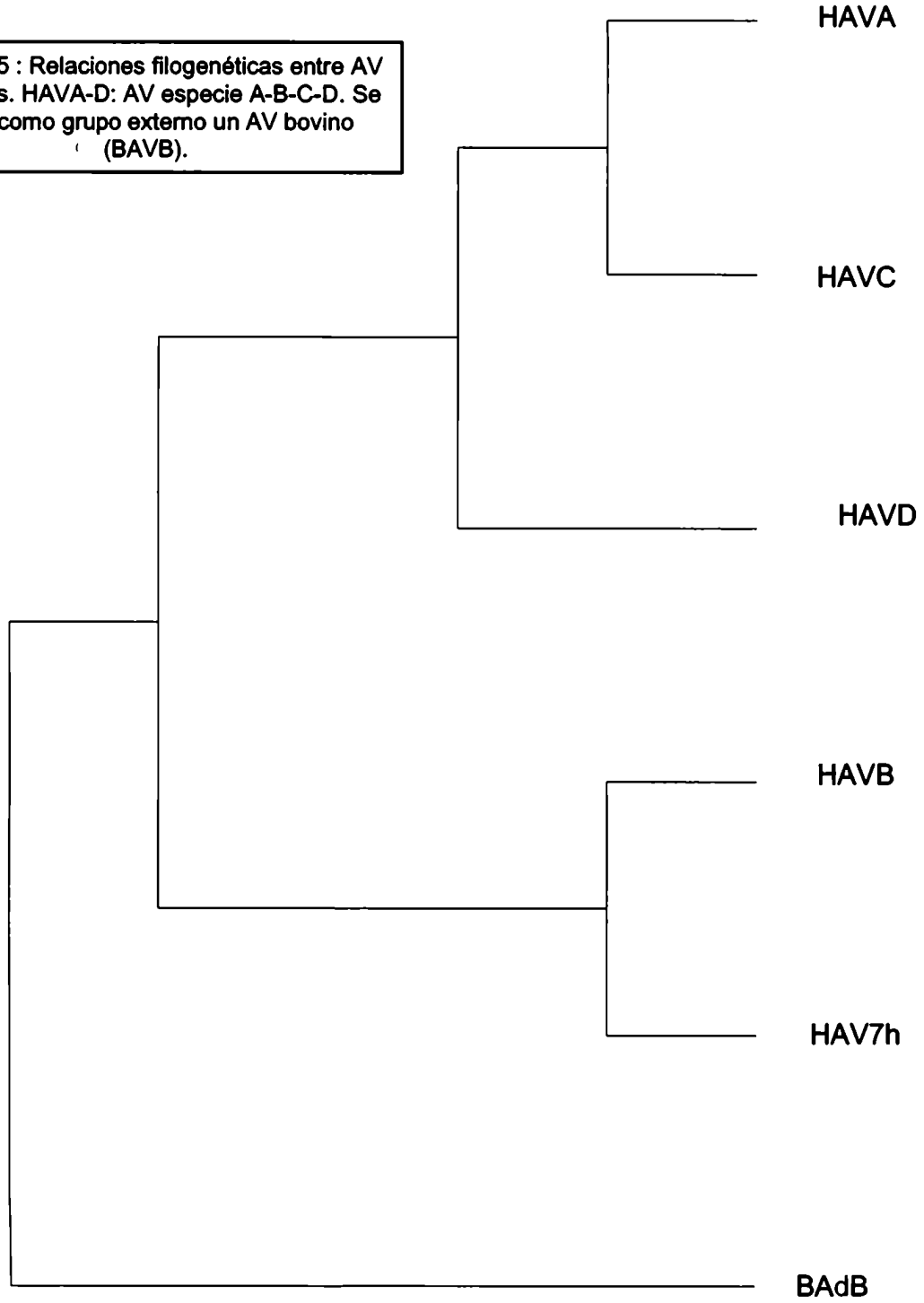
freqC = 0.1639

freqG = 0.1654

freqT = 0.2665

El modelo más probable resultó F81+G, que toma todas las tasas de sustituciones como equiprobables. Estos parámetros se utilizaron para construir un árbol por el método de *Maximum Likelihood* que genera la filogenia más probable de acuerdo al modelo evolutivo que esté operando (Figura 45).

Figura 45 : Relaciones filogenéticas entre AV humanos. HAVA-D: AV especie A-B-C-D. Se tomó como grupo externo un AV bovino (BAVB).



Regiones antigénicas

Se analizaron las regiones antigénicas de las proteínas fibra, base del pentón y E1A con el programa Protean. Este programa permite analizar la probabilidad de un péptido de ser presentado en un contexto T o B. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 23.

Tabla 23: Regiones antigénicas en las proteínas E1A, Fibra, Penton y Hexón

| E1A (197aa) | | Fibra (319aa) | | Pentón (543aa) | | Hexón (934aa) | |
|--------------------|--|--|--|--|--|---|---|
| B | T | B | T | B | T | B | T |
| | 5-8, 10-13,19-26 47-50, 62-70, 87-90 93-97, 109-112 137-141, 145-152 190-194 | 5-10 31-34 37-40 44-47 54-59 69-74 84-89 156-161 167-172 207-212 216-221 267-272 303-311 | 117-121 165-168 178-181 194-205 228-231 295-302 | 144-149 238-243 312-317 421-426 458-463 513-518 524-534 537-542 | 3-7, 64-67 77-80 123-127 135-139 145-149 155-163 167-170 172-175 190-193 208-211 242-245 257-260 280-284 306-310 330-334 345-345 415-418 466-469 528-531 | 12-17 21-26 33-38 57-62 83-88 121-126 178-183 427-432 456-461 526-531 589-594 750-755 833-841 876-883 921-929 | 15-18 23-26 28-31 34-41 56-60 64-68 93-99 106-109 119-123 151-154, 170-174 182-185 208-211, 225-228, 262-268 286-290, 333-337, 369-372 386-389, 420-424 434-438 466-469, 485-488, 490-493 588-592 614-618 628-631, 699-702, 719-722 730-733 773-776, 810-813 851-854, 866-870 882-889 904-910 917-920 |

En algunos casos los epitopes B y T predichos colocalizan o se solapan como se muestra en la tabla. Es importante notar que la región E1A no presenta epitopes B, probablemente por ser un antígeno inmediatamente temprano. Las regiones antigénicas se sometieron a una búsqueda en la base de datos pública.

Mimetismo molecular

Los péptidos hallados se cotejaron contra la base de datos pública de proteínas para comprobar si alguno de ellos presentaba homología con proteínas pulmonares. Los resultados fueron negativos.

Cabe destacar que cuando se realizó el análisis de los ORFs probables para el genoma completo descrito en una sección anterior, 2 de ellos presentaban homología con proteínas pulmonares (Tabla 24)

Tabla 24: Péptidos de AV7h homólogos con proteínas de mamíferos

| Gen | Cadena | Principio | Fin | Longitud | ORF | Proteína | aa |
|------------|---------------|------------------|------------|-----------------|------------|-----------------|-----------|
| HUMANO | (-) | 18095 | 18271 | 177 | -2 | ELASTINA | 58 |
| MURINO | (-) | 22564 | 22740 | 177 | -1 | MIOSINA | 58 |

Es importante destacar que estos péptidos no se encuentran dentro de ninguna proteína viral, ni forman parte del virión. Sólo se postula que podrían traducirse preferencialmente dentro del ciclo replicativo viral, aprovechando el *shutoff* de la traducción proteica celular. Estos péptidos al ser presentados dentro de un contexto infeccioso, ante un sistema inmune alerta podrían burlar la barrera de tolerancia y generar una primera respuesta de alerta contra ellos, que una vez desaparecida la infección productiva permanezca y se instale en el epitelio respiratorio. Así, los anticuerpos contra esos péptidos, por ejemplo, podrían actuar como autoanticuerpos y reconocer proteínas como la elastina y la miosina presentes en músculo y matriz del epitelio pulmonar llevando un deterioro irreversible del órgano, y una hiperreactividad generalizada. Este pulmón, si no lograra deshacerse

prontamente de la infección podría sufrir secuelas que permanezcan de por vida, disminuyendo su capacidad y generando daño pulmonar crónico postviral.

Conclusiones

Los Adenovirus circularon en el período 1999-2002 durante todo el año, registrándose un mayor número de casos en el período invernal de baja temperatura y primaveral con cambios de temperatura frecuentes.

El diagnóstico virológico se realizó tempranamente luego de la internación siendo la bronquiolitis el diagnóstico clínico al ingreso más frecuente. Se registró un mayor número de casos en menores de 12 meses y la evolución en general fue favorable registrándose 9 casos fatales en un total de 362 muestras analizadas.

Se encontró una correlación negativa de grado medio con respecto a la temperatura, indicando un aumento en el número de casos cuando el registro térmico desciende. En cuanto a la humedad relativa y el índice UVB, la relación no es tan clara aunque es siempre de grado menor. Este parece ser un parámetro no necesariamente asociado a la aparición de casos de Adenovirus.

El análisis filogenético del hexón completo permitió agrupar las muestras fatales y las separó de las graves y leves en el período 1990-1999. El análisis de las regiones hipervariables en el período 1990-2002 posicionó a las muestras analizadas en el *cluster* GTC2 junto al AV7h.

La secuencia completa del AV7h se llevó a cabo por una estrategia de ensamblado de 8 contigs que permitieron elaborar una secuencia consenso de 35259 pb. con un porcentaje G+C del 51%. Se conservaron intactos los genes para las regiones tempranas, intermedias y tardías. El análisis filogenético ubicó al genoma AV7h junto con el AVB con el que tiene una homología del 84%. Se hallaron ORFs relacionados con proteínas pulmonares que podrían inducir autoanticuerpos o daño pulmonar crónico postviral.

Bibliografía

- Athappilly FK, et al. (1994). *J Mol Biol* 242:430-455.
- Benkő M, Harrach B (2003). *Curr Top Microbiol Immunol* 272:3-35.
- Berget SM, Moore C, Sharp PA (1977). *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3171-3175.
- Boulanger P. (1999). *J Soc Biol* 193:77-84.
- Borodovsky M y McIninch J (1993). *Computers & Chemistry* 17:123-133.
- Büchen-Osmond C. (2003). *Computing in Science and Engineering* 5:16-25.
- Cann AJ (1997). *Principles of molecular virology*. Academic Press, 2nd Edition
- Crawford-Miksza L y Schnurr DP (1996). *J Virol* 70:1836-44.
- Chiocca S, Kurzbauer R, Schaffner G et al. (1996). *J Virol* 70:2939-2949
- Chroboczek J, Bieber F, y Jacrot B(1992). *Virology* 186:280-285.
- Davison AJ, Wright KM, Harrach B. (2000). *J Gen Virol*. 81:2431-9.
- Davison AJ, Benkő M, Harrach B. *J Gen Virol*. 2003 84:2895-908.
- Dix BR, Edwards SJ y Braithwaite AW (2001). *J. Virol* 75: 5443-5447.
- Domingo E y Holland JJ (1997). *Ann Rev Microbio*. 51, 151-178.
- Erdman DD, Xu W, Gerber SI, Gray GC, Schnurr D, Kajon AE y Anderson LJ (2002). *Emerg Infect Dis* 8: 269-277.
- Felsestein J (1989). *Cladistics* 5, 164-166.
- Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A (2003). *Nat Med*. 9:1408-12.
- Gingeras TR, Sciaky D, Gelinas RE, et al. *J Biol Chem* (1982) 257: 13475-13491
- Ginsberg HS, Moldawer LL, Sehgal PB et al. (1991). *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:1651-1655
- Goodbourn S, Didcock L y Randall RE (2000). *J Gen Virol* 81:2341-2364.
- Harrach B y Benkő M (1998). *Methods Mol Med* 21:309-339.

- Howitt J, Anderson CW, Freimuth P (2003). *Curr Top Microbiol Immunol* 272:331-64.
- Hashido M, Mukouyama A, Sakae K, Tsuzuki H, Yamashita T, Inada T y Inouye S. (1999). *Epidemiol Infect.* 122:281-6.
- Hierholzer JC, et al.. *J Clin Microbiol.* (1993) 31:1886-91.
- Hogg JC, Irving WL, Porter H. et al (1989). *Am. Rev. Respir. Dis.* 139:1531-35.
- Hogg JC (2001). *Am J Respir Crit Care Med* 164:S71–S75.
- Kajon AE, Wadell G (1992). *Intervirology* 33:86-90.
- Kajon A, et al(1994). *J Clin Microb* 32 :2321-2323.
- Kidd AH, et al..*J Clin Microbiol* (1996) 34:622-7.
- Ladenheim HS, Mistchenko AS, Drut R (1995).*Pediatr. Pathol. y Lab. Med.* 15:291-298.
- Li QG, Lindman K, Wadell G (1997). *Arch Virol*;142:1307-22.
- Li QG y Waddell G (1999). *Arch Virol* 144:1739-1749.
- Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC (1999). *J Virol* 73:152–160.
- Lukashok SA, Horwitz MS (1998). *Curr Clin Top Infect Dis* 18:286–305.
- Ma Y y Mathews MB (1996). *J Virol* 70:5083–5099.
- Macek V, Sorli J, Kopriva S, Marin (1994). *J Am J Respir Crit Care Med* 150:7-10.
- Martin D y Rybicki E (2000). *Bioinformatics* 16, 562-563.
- Mistchenko AS, Lenzi HL, Mota EM, et al. (1992). *Acta Pediatr* 81:993-98.
- Mistchenko AS, Diez RA, Mariani AL, et al (1994). *J Pediatr* 124:714
- Mistchenko AS, Robaldo JF, Rosman FC, Koch ER, Kajon AE (1998). *J Med Virol* 54:233-6.
- Morrison MD, Onions DE, Nicolson L (1997)..*J Gen Virol* 78: 873-878.

- Nemerow GR y Stewart PL (1999). *Microbiol Mol Biol Rev* 63:725–734.
- Nemerow GR (2000). *Virology* 274:1–4.
- Niel C, Moraes MTB, Mistchenko AS, Leite JP, Gomes S (1991). *J Med Virol* 33:123–27.
- Page RDM (1996). *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357–358. 589.
- Pickles RJ, McCarty D, Matsui H, Hart PJ, Randell SH y Boucher RC (1998). *J Virol* 72:6014–6023.
- Posada D y Crandall KA (1998). *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Prince GA, Porter DD, Jenson AB et al. (1993). *Virology* 67:101–111.
- Pring-Akerblom P, et al. (1995). *Res Virol* 146:383–388.
- Roberts RJ, O'Neill KE y Yen CT (1984). *J Biol Chem.* 259:13968–13975.
- Roberts MM, et al (1986). *Science* 232:1148–1151.
- Rosman FC, Mistchenko AS y Ladenheim HS (1996). *Pediatr Pathol Lab Med* 16:521–541.
- Rozas, J., Rozas, R., (1999). DNASP version 3: *Bioinformatics* 15, 174–175.
- Russell WC (2000). *J Gen Virol* 81:2573–604.
- Sambrook J y Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury NY, USA.
- Sanger F et al. (1977) *Proc Nat Acad Sc* 74 :5463–5467.
- San Martin C y Burnett RM (2003). *Curr Top Microbiol Immunol* 272, 57–94.
- Segerman A, Arnberg N, Erikson A, Lindman K, Wadell G (2003). *J Virol* 77:1157–62.
- Shenk T (2001). *Adenoviridae: the viruses y their replication*. In *Fields Virology*, 4th edn, vol. 2: Cap67. Editado por D. M. Knipe y P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins.

- Smith CA, Woodruff LS, Rooney C y Kitchingman GR (1998). *Hum Gene Ther* 9:1419–1427.
- Stewart PL, et al. (1991). *Cell* 67:145-154.
- Stone D, Furthmann A, Sandig V y Lieber A (2003). *Virology* 309:152-165.
- Takeuchi S et al. (1999) *J Clin Microbiol* 37:1839–1845.
- Tanaka K, Itoh N, Saitoh-Inagawa W et al. (2000) *J Med Virol* 61:143-149.
- Thibeault DW, Ekekezie MSM y Truog WE (2000). *Pediatrics* 106:1452-59.
- Thompson, JD, et al. (1997). *Nucleic Acids Res* 24:4876–4882.
- Tollefson AE, Hermiston TW y Wold WSM (1998). Preparation and titration of CsCL-Banded Adenovirus Stock in *Methods in Molecular Medicine Series vol21: Adenovirus Methods and Protocols*, edited by WSM Wold, Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Valentine RC, Pereira HG (2003). Reprinted from *J. Mol. Biol.* 196513: 13-20. *Rev Med Virol* 13:71-82.
- Viegas M, Barrero PR, Maffey AF y Mistchenko AS. (2003) *Journal of Infection en prensa*.
- Wadell G (1984). *Curr Top Microbiol Immunol* 110:191-220.
- Wadell G, Cooney MK, da Costa Linhares A, et al. (1985). *J Clin Microbiol.* 21:403-408.
- Wenman WM (1982). *Chest* 81:606-9
- Wohlfart C, et al. (1988) *J Virol* 62:2321-2328.
- Xu W, et al.. *J Clin Microbiol* (2000) 38:4114-20
- Xu W y Erdman DD. *J Med Virol* (2001) 64:537–42.
- Zhang H y Phan SH (1999). *Cell Mol Biol* 21:658-665.

Zhang L, Peebles M, Boucher RC, Collins PL y. Pickles RJ (2002). *J Virol* 76:5654-5666.

Zhou MY, Clark SE y Gomez-Sanchez CE (1995). *BioTechniques* 19, 34–35.

Addendum

>AV7h cepa 87-922, secuencia completa

1 CTCTCTATAT AATATACCTT ATAGATGGAA TGGTGCCAAC ATGTAAATGA GGTAATTTAA
 61 AAAAGTGC GC GCTGTGTGGT GATTGGCTGT GGGGTGAACG GCTAAAATGG GCGGGGCGGC
 121 CGTGGGAAAA TGACGTGACT TATGTGGGAG GAGCTATGTT GCGAATTATT GCGGTAATG
 181 TGACGTAAAA CGAGGTGTGG TTTGAACACG GAAGTAGACA GTTTCCAC GCTTACTGAC
 241 AGGATATGAG GTAGTTTTGG GCGGATGCAA GTAAAAATTC TCCATTTTCG CGCGAAAACT
 301 GAATGAGGAA GTGAATTTCT GAGTCATTTT GCGGTTATGA CAGGGTGGAG TATTTGCCGA
 361 GGGCCGAGTA GACTTTGACC GTTTACGTGG AGGTTTCGAT TACCGTGGTT TTTCCCTAAA
 421 TTTCCGCGTA CGGTGTCAAA GTCCTGTGTT TTTACGTAGG TGTCAAATGA TCGCTAGGGT
 481 ATTTAAACCT GACGAGTTCC ATCAAGAGGC CACTCTTGAG TGCCAGCGAG AAGAGTTTTT
 541 TCCTCCGCGC CGCAAGTCAG TTCTGCGCTT TGAAAATGAG ACACCTGCGT TTCCTGCCAC
 601 AGGAGATTAT TCCCAGTGAA ACCGGGATTG AAATACTGGA GTTTGTGGTA AATACCTTAA
 661 TGGGAGACGA CCCGGAACCG CCAGTGCAGC CTTTTGATCC ACCTACGCTG CACGATCTGT
 721 ATTTAAACCT GACGAGTTCC ATCAAGAGGC CCGGAGGATC CCAATGAGGA AGCTGTGAAT GGGTTTTTTA
 781 CTGATTCTAT GCTGCTAGCT GCCGATGAAG GATTGGACAT ATACCCTCCT CCTGAGACCC
 841 TTGATACCCC AGGGGTGGTT GTGGAAAACG GCAGAGGTGG GAAAAAATTTG CCTGATCTGG
 901 GAGCAGCTGA AATGGACTTG CGTTGTTATG AAGAGGGTTT TCCTCCGAGT GATGATGAAG
 961 ATTTGGGAAAT TGACGAGTCC ATCCATACCG CAGTGAATAA GGGAGTAAAA GCTGCCAGCG
 1021 ATGTTTTTTAA GTTGGACTGT CCGGAGCTGC CTGGACATGG CTGTAAGTCT TGTGAATTTT
 1081 ACAGGAATAA CACTGGAATG AAAGAACTAT TGTGCTCGCT TTGCTATATG AGAATGCACT
 1141 GCCACTTTAT TTACAGTAAG TGTATTTAAG TGAATTTAA AGGAATAGTG TAGCTGTTTA
 1201 ATAACTTTTG AATGGTAGAT TTATATTTTT ACTTGCATTT TTTGTAGGT CCTGTGCTG
 1261 ATGATGAGTC ACCTTCTCCT GATTCAACTA CTTCACTTCC TGAAATTCAG GCGCCCGCAC
 1321 CTGCAACCGT ATGCAAGCCC ATTCTGTGTA AGCCTAAGCC TGGGAAACGC CCTGTGTGG
 1381 ATAAGCTTGA GGACTTGTG GAGGGTGGGG ATGGACCTTT GGACCTTAGT ACCCGGAAAC
 1441 TCCCAAGGCA ATGAGTGCCT TGCACTGTG TTTATTTAAT GTGACGTCAT GTAATAAAAT
 1501 TATGTCAGCT GCTGAGTGT TTATTACTTG TTGGGTGGGG ACTTGGATAT ATAAGTAGGA
 1561 GCAGATCTGT GTGGTTAGCT CACAGCAACC TGCTGCCATC CATGGAGGTT TGGGTATCT
 1621 TGGAAAGACT CAGACAGACT AGGCTACTGC TAGAAAACGC CTCGGACGGA GTCTCTGGCC
 1681 TTTGGAGATT CTGGTTCGGT GGTGATCTAG CTAGGCTAGT GTTTAGGATA AAACAGGACT
 1741 ACAGGGAAGA ATTTGAAAAG TTATTGGACG ACAGTCCAGG ACTTTTTGAA GCTCTTAACT
 1801 TGGGTATCA GGCTCATTTT AAGGAGAAGG TTTTATCAGT TTTAGATTTT TCTACTCCTG
 1861 GTAGAAGTGC TGCTGCTGTA GCTTTTCTTA CTTTTATATT GGATAAATGG ATCCGCCAAA
 1921 ATCCACTCAG CAAGGATAC GTTTTGGATT TCATAGCAGC AGCTTTGTGG AGAACATGGA
 1981 GTCCTCGCAG GATGAGGACA ATCTTAGATT ACTGGCCAGT GCAGCCTCTG GGAGTAGCAG
 2041 GGATACTGAG ACACCCACCG ACCATGCCAG CGGTTCTGCA GGAGGAGCAG CAGGAGGACA
 2101 ATCCGAGAGC CGGCCCTGGAC CCTCCGGTGG AGGAGTAGCT GACCTGTTTC CTGAAGTGGC
 2161 ACCGGTGTCT ACTAGGTCTA CGACCAGTGG ACAGAACAGG GGCATTAAGA GGGAGAGGAA
 2221 TCCTAGTGGG AACAAATCAA GAACCGAGTT GGCTTTAAGT TTAATGAGCC GCAGGCGTCC
 2281 TGAAGCTGTT TGGTGGCATG AGGTTCAAGC CGAAGGCAGG GATGAAGTTT CAATATTGCA
 2341 GGAGAAATAT TCACTAGAAC AACTTAAGAC CTGTTGGTTG GAACCTGAGG ATGATTGGGA
 2401 GGTGGCCATT AGGAATTATG CTAAGATATC TCTGAGGCC TATAAACAAT ATAGAATTAC
 2461 TAAGAAGATT AATATTAGAA ATGCATGCTA CATATCAGGG AATGGGGCAG AGGTTATAAT
 2521 AGATACACAA GATAAAGCAG CTTTTAGATG TTGTATGATG GGTATGTGGC CAGGGGTGTG
 2581 CGGCATGGAA GCAGTAACAC TTATGAATAT TAGGTTTAGA GGGGATGGGT ATAATGGCAT
 2641 TGTATTTATG GCTAACACTA AGCTGATTCT ACATGGTTGT AGCTTTTTTG GGTTTAATAA
 2701 TACGTGTGTA GAAGCTTGGG GGCAGGTTAG TGTGAGGGGT TGTAGTTTTT ATGCATGCTG
 2761 GATTGCAACA TCAGGTAGGG TGAAGAGTCA GTTGTCTGTA AAGAAATGCA TGTTTGAGAG
 2821 ATGTAATCTT GGCATACTGA ATGAAGGTGA AGCAAGGGTC CGCCACTGCG CGGCTACACA
 2881 AACTGGCTGC TTCATTCTAA TAAAGGGAAA TGCCAGTGTG AAGCATAATA TGATCTGTGG
 2941 ACATTCGGAT GAGAGGCCTT ATCAGATGCT GACCTGCGCT GGTGGACATT GCAATATTCT
 3001 TGCTACCGTG CATATCGTTT CACATGCACG CAAGAAATGG CCTGTATTTG AACATAATGT
 3061 GATTACCAAG TGCACCATGC ACATAGGTGG TCGCAGGGGA ATGTTTATGC CTTACCAGTG
 3121 TAACATGAAT CATGTGAAGG TAATGTTGGA ACCAGATGCC TTTCCAGAG TGAGCGTACA
 3181 ATGAATCTTT GATATGAATG TTCAACTATG GAAGATCCTG AGATATGATG AACTAAACC
 3241 AAGGGTGC GC CATGCGAAT GCGGAGGCTA GCATGCTAGA TTCCAGCCGG TGTGCGTGGA
 3301 TGTGACTGAA GACCTGAGAC CCGATCATT GGTGCTTGCC TGCACTGGAG CGGAGTTTGG
 3361 TTCTAGTGGT GAAGAACTG ACTAAAGTGA GTAGTGGGGG CAAGATGTGG ATGGGGACTT
 3421 TCAGGTTGGT AAGGTGGACA AATTGGGTAA ATTTGTATAA TTTCTGTCTT GCAGCTGCCA
 3481 TGAGTGAAG TGCTTCTTTT GAGGGGGGAG TATTTAGCCC TTATCTGACG GGCAGACTCC
 3541 CACCATGGGC AGGAGTTTCGT CAGAATGTCA TGGGATCTAC TGTGGATGGG AGACCCGTCC
 3601 AGCCCGCCAA TTCCCTCAACG CTGACCTATG CCACTTTGAG TTCGTACCA TTTGGATGCG
 3661 CTGCAGCAGC GCGCCGCA ACACCATCCT TGGAATGGGC TATTACGGAA
 3721 GCATCGTTGC CAATCCAGT TCCTCTAATA ACCCTTCAAC CCTGGCTGAG GACAAGCTAC
 3781 TTGTTCTCTT GGCTCAGCTC GAAGCCTTAA CCAACCGCTT AGGCGAAGCT TCTAAGCAGG
 3841 TGGCCAGTT GCGTGAGCAA ACTGAGTCTG CTGTTGCCAC AGCAAAGTCT AAATAAAGAT
 3901 CTCAAAATCAA TAAATAAAGA AATACTGATT ATGAAACCAA ATGAATGTTT ATTTGATTTT
 3961 TCGCGCGCGG TATGCCCTGG ACCATCGGTC TCGATCATTG AGAACTCGGT GGATCTTTTC
 4021 CAGTACCCGT TAAAGGTGGG ATTTGAATGTT TAGATACATG GGCATTAGTC CGTCTCGGGG
 4081 GTGGAGATAG CTCCTATTGAA GAGCCTCTTG CTCGGGGTA GTGTTATAAA TCACCCAGTC
 4141 ATAGCAAGGT CCGAGTGCAT GGTGTTGCAC AATATCTTTT AGGAGCAGAC TAATTGCAAC
 4201 GGGGAGGCC TTAGTGTAGG TGTTTACAAA TCTGTTAAGC TGGGACGGGT GCATTCGGGG

4261 TGAAATTATA TGCATTTTGG ACTGGATCTT AAGGTTGGCA ATGTTGCCGC CTAGATCCCG
 4321 TCTCGGGTTC ATATTGTGCA GGACCACCAA GACAGTGAT CTGTGCACT TGGGAAATTT
 4381 ATCATGCAGC TTAGAGGGAA AAGCATGAAA AAATTTGGAG ACGCCTTTGT GACCCCCAG
 4441 ATTCTCCATG CACTCATCCA TAATGATAGC GATGGGGCCG TGGGCAGCGG CACGGGCGAA
 4501 CACGTTGCCG GGGTCTGAAA CATCATAGTT ATGCTCCTGA GTCAGGTCAT CATAAGCCAT
 4561 TTTAATAAAC TTTGGGCGGA GGGTGCCAGA TTGGGAAATG AAAGTTCCTC CTGGCCCGGG
 4621 AGCATAGTTT CCCTCACATA TTTGCATTTT CCAGGCTTTC AGTTCAGAGG GGGGGATCAT
 4681 GTCCACCTGC GGGGCTATAA AAAATACCGT TTCTGGAGCC GGGGTGATTA ACTGGGATGA
 4741 GAGCAAATTC CTAAGCAGCT GAGACTTGCC GCACCCAGTG GGACCGTAAA TGACCCCAAT
 4801 TACGGGTTTC AGATGGTAGT TTAGGGAGCG ACAGCTGCCG TCCTCCCGGA GCAGGGGGCG
 4861 CACTTCGTTT ATCATTGGCC TTACATGGAT ATTTCCCGC ACCAAGTCCG TTAGGAGCG
 4921 CTCTCCCCCA AGGGATAGAA GCTCCTGGAG CGAGGAGAAG TTTTTCAGCG GCTTTAGCCC
 4981 GTCAGCCATG GGCATTTTGG AAAGAGTCTG TTGCAAAGC TCGAGCCGGT CCCAGAGCTC
 5041 GGCAGTGTGC TCTATGGCAT CTCGATCCAG CAGACCTCCT CGTTTCGCGG GTTGGGACGG
 5101 TGCCTTTGGT AGGGAATCAG ACGATGGGCG TCCAGCGCTG CCAGGGTCCG ATCCTTCCAT
 5161 GGTGCGCAGC TCCGAGTTAG GGTGTGTTCC GTCACGGTGA AGGGGTGCGC GCCTGGTTGG
 5221 GCGCTTGCGA GGGTGCGCTT CAGACTCATC CTGCTGGTCG AGAACCCTG AGAACCCTG
 5281 CCCTGCATGT CGGCCAGGTA GCAGTTTACC ATAAGTTCGT AGTTAAGCGC CTCGGCCCGC
 5341 TGCATTTGGT GGGTGACAAA ACCTTTGGAA GTTTTATGGC AGGCGGGGCA GTAGATACAT
 5401 TTGAGGGCAT ACAGCTGGG CGCGAGGAAA ATGGATTCGG GGGAGTATGC ATCCGCACCG
 5461 CAGGAGGCGC AGACGGTTTC GCACTCTACG AGCCAGGTCA GATCCGGCTC ATCCGGGTCA
 5521 AAAACAAGTT TTCCGCCATG TTTTTGATG CGTTTCTTAC CTTTGGTTTC CATGAGTTCC
 5581 TGCCCCGCTT GGGTGACAAA GAGGCTGTCC GTGTCCCGT AGACCGACTT TATGGTCTG
 5641 TCCTCGAGCG GAGTGCCTCG GTCCTCTTCG TAGAGGAACC CAGCCCACTC TGATACAAA
 5701 GCGCGTGTCC AGGCCAGCAC AAAGGAGGCC ACGTGGGAGG GGTAGCGGTC GTTGTCAACC
 5761 AGGGGGTCCA CCTTCTCTAC GGTATGTAAA CACATGTCCC CCTCCTCCAC ATCCAAGAAT
 5821 TGCAATTGGT TTTAAGTGTG GGCACGTGA CCAGGGTCC CCGCCGGGGG GGTATAAAAG
 5881 GGGGCGGGCC TCTGTTCGTC CTCACTGTCT TCCGATCGC TGTCCAGGAG CGCCAGCTGT
 5941 TGGGGTAGGT ATTCCCTCTC GAAGGCGGGC ATGACCTCTG CACTCAGGTT GTCAGTTTCT
 6001 AGGAACGAGG AGGATTTGAT ATTGACAGTA CCAGCAGAGA TGCCTTTCAT AAGACTCTCG
 6061 TGCTTTGGT CAGAAAACAC AATCTTCTTG TTGTCCAGCT TGGTAGCAAA TGATCCATAG
 6121 AGGGCATTGG ATAGAAGCTT GCGGATGGAG CGCATGGTTT GGTCTTTTTC CTTGTCCCG
 6181 CGCTCCTTGG CGGCGATGTT AAGCTGGAGC TACTCGCGCG CCACACATTT CCATTAGGG
 6241 AAGATGGTTC TCACTTTCAT CGGAACTATT CTGACTCGCC ATCCCCTATT GTGCAGGTT
 6301 ATCAGATCCA CACTGTGGC CACTCGCCT CGGAGGGGCT CATTGGTCCA GCAGAGTCCA
 6361 CCTCCTTTTC TTGAACAGAA AGGGGGGAGG GGGTCTAGCA TGAGCTCATC AGGGGGGTCC
 6421 GCATCTATGG TAAATATTCC CGGTAACAAA TCTTTGTCAA AATAGCTAAT GGTGGTGGGA
 6481 TCATCCAAGG TCATCTGCCA TTCTCGAACT GCCAGCGCGC GCTCATAGGG GTTAAGAGGG
 6541 GTGCCCGAGT GCATGGGGTG GGTGAGCGCG GAGGCATACA TGCCACAGAT ATCGTATACA
 6601 TAGAGGGGCT CTTGAGGAT GCCGATGTAA GTGGATAAC AGCGCCCCC TCTGATGCTT
 6661 GCTCGCATAT AGTCATAGAG TTCATGTGAG GGGGCGAGAA GACCCGGGCC CAGATTGGTG
 6721 CGGTTGGGTT TTTCCGCCCT GTAACGATC TGCGGAAAGA TGGCATGGGA ATTTGAAGAG
 6781 ATAGTAGGTC TCTGGAATAT GTTAAAATGG GCATGAGGTA GGCCTACAGA GTCCTTATG
 6841 AAGTGGGATC ATGACTCTTG CAGCTTGGCT ACCAGCTCGG CGGTGACGAG TACATCCAGG
 6901 GCACAGTAGT CGAGAGTTTC CTGGATGATG TCATAACCGG GTTGGCTTTT CTTTTCCAC
 6961 AGCTCGCGGT TGAGAAGGTA TTCTTCGCGA TCCTTCCAGT ACTCTTCGAG GGGAAACCCG
 7021 TCTTTTCTG CACGGTAAGA GCCCAACATG TAGAACTGAT TGACTGCCTT GTAGGGACAG
 7081 CATCCCTTCT CCCTGGGAG AGAGTATGCT TGGGCTGCAT TGCGCAGCGA GGTATGAGTG
 7141 AGGGCAAAG TGTCCTGAC CATGACTTTG AGGAATTGAT ACTTGAAGTC CATGTCATCA
 7201 CAGGCCCCCT GTTCCAGAG TTGGAAGTCC ACCCGTCTT TGTAGGCGGG GTTGGGCAAA
 7261 GCGAAAGTAA CATCATGAA GAGGATCTTG CCGGCCCTGG GCATGAAATT TCGGGTGATT
 7321 CTGAAAGGCT GAGGACCTC TGCTCGGTTA TTGATAACCT GAGCGGCCAA GACGATCTCA
 7381 TCAAAGCCAT TGATGTTGTG CCCCACTATG TACAGTTCTA AGAATCGAGG GGTGCCCTG
 7441 ACATGAGGCA GCTTCTTGTG TTCTTCAAAA GTGAGATCTG TAGGGTCAGT GAGAGCATAG
 7501 TGTTGAGGG CCCATTCTG CACGTGAGGG TTCGTTTGA GGAAGGAGGA CCAGAGTCC
 7561 ACTGCGAGT CTGTTGTAA TGTGTCGCG TATTGACGAA AATGCTGCCC GACTGCCATT
 7621 TTTTCTGGG TGACGCAATA GAAGGTTTGG GGGTCTGCC GCCAGCGATC CCACTAAGT
 7681 TTCATGGCGA GGTCAATAGG GATGTTGAG AGCCGCTGGT CTCAGAGAG TTTATGACC
 7741 AGCATGAAGG GGATTAGCTG CTTGCCAAG GACCCATCC AGGTGTAGGT TTCCACATCC
 7801 TAGGTGAGGA AGAGCCTTTC TGTGCGAGGA TGAGAGCCAA TCGGGAAGAA CTGGATCTCC
 7861 TGCCACCAGT TGGAGGAATG GCTGTTGATG TGATGGAAGT AGAACTCCCT GCGACGCGCC
 7921 GAGCATTCAT GCTTGTGCTT GTACAAAACG CCGCAGTACT CGCAGCGATT CACGGGATGC
 7981 ACCTCATGAA TGAGTTGTAC CTGACTTCTT TTGACGAGAA ATTTAGTGG AAAATTGAGG
 8041 CTTGGCGTTT GTACCTGGCG CTCTACTATG TTGTCTGCAT CGGCATGACC ATCTTCTGTC
 8101 TCGATGGTGG TCATGCTGAC GAGCCCTCGC GGGAGGCAAG TCCAGACCTC GCGCGCGCAG
 8161 GGGCGGAGCT CGAGGACGAG AGCGCGCAGG CCGGAGCTGT CCAGGGTCCCT GAGACGCTGC
 8221 GGAGTCAGGT TAGTAGGCAG TGTCAGGAGA TTGACTTGCA TGATCTTTTG GAGGGCGTGA
 8281 GGGAGGTTCA GATGGTACTT GATCTCCACG GGTCCGTTGG TGGAGATGTC AATGGCTTGC
 8341 AGGGTCCGTT GCCCTTGGG CGCTACCACC GTGCCCTTGT TTTTCTTTT GGGCGGCGGT
 8401 GGCTCTGTTG CTTCTTGCAT GTTTACGAGC GGTGTCGAGG GCGCGCACCG GCGCGTGGG
 8461 GCGGCTCGG ACCCGCGCG ATGGCTGGCA GTGGTACGTC GGCACCGCGC GCGGGTAGGT
 8521 TCTGGTACTG CGCCCTGAGA AGACTCGCAT GTGCGACGAC GCGCGCGTTG ACATCTGGA
 8581 TCTGACGCTT CTGGGTGAAA GCTACCGGCC CCGTGAGCTT GAACCTGAAA GAGAGTTCAA
 8641 CAGAATCAAT CTCGGTATCG TTGACGGCGG CTTGCCTAAG GATTTCTTGC ACGTCGCCAG
 8701 AGTTATCCCT GTAGGCGATC TCGACCATGA ACTGTGGAT CTCTTCTCT TGAAGATCTC
 8761 GCGGCGCCG TCTCTCGACG GTGCGCGCGA GGTGTTGGA GATGCGCCCA ATGAGTTGAG
 8821 AGAATGCATT CATGCCCGCC TCGTTCAGAA CGCGCTGTA GACCACAGCC CCCACGGGAT

8881 CTCTCGCGCG CATAACCACC TGGGCGAGGT TAAGCTCTAC GTGGCGGGTG AAGACCGCAT
 8941 AGTTGCATAG GCGCTGGAAA AGGTAGTTGA GTGTGGTGGC GATGTGCTCG GTGACGAAGA
 9001 AATACATGAT CCATCGTCTC AGCGGCATCT CGCTGACATC GCCCAGCGCT TCCAAGCGCT
 9061 CCATGGCCTC GTAGAAAGTCC ACGGCAAAGT TGAAAACTG GGAGTTACGC GCGGACACGG
 9121 TCAACTCCCTG TTCCAGAAGA CGGATGAGTT CGGCAATGGT GGTGCGCACC TCGCGCTCGA
 9181 AACCCCGCGG GATTTCTTCC TCAATCTCTT CTCTCTCCAC TAACATCTCT TCCTCTTCAG
 9241 GTGGGGCTGC AGGAGGAGGG GGAACCGCGC GACGCGCGCG GCGCACGGGC AGACGGTCTGA
 9301 TGAATCTTTC AATGACCTCT CCGCGCGCGC GCGCATGGT CTCGGTGACG GCACGACCGT
 9361 TCTCCCTGGG TCTCAGAGTG AAGACACCTC CCGCATCTC CCTGAAGTGG TGACTGGGAG
 9421 GCTCTCGGTT GGGCAGGGAC ACCGCGTGA TTATGCATT TATCAATFGC CCCGTAGGTA
 9481 CTCCGCGCAA GGACCTGATC GTTCAAGAT CCACGGGATC TGAAAACCTT TCGACGAAAG
 9541 CGTCTAACCA GTCGCAATCG CAAGGTAGGC TGAGCACTGT ATCTTGCGGG CGGGGGCGGC
 9601 TAGACGCTCG GTCGGGGTTC TCTCTTCTT TTCTTCTCTC CTCTTGGGAG GATGAGACGA
 9661 TGCTGCTGGT GATGAAATTA AAATAGGCAG TTTTGAGACC GCGGATGGT GCGAGGAGCA
 9721 CCAAGTCTTT GGGTCCGGCT TGTGGATGC GCAGGCGATG GCCCATCCCC CAAGCATTAT
 9781 CCTGACATCT GGCCAGATCT TTATAGTAGT CTGTCATGAG TCGTTCACG GGCACCTCTT
 9841 CTTGCGCCGC CCTGCCATGC ATGCGAGTGA TCCCGAACCC GCGCATGGGC TGGACAAGTG
 9901 CCAGGTCCGC TACAACCCTT TCGGCGAGGA TGGCTTGCTG CACCTGGGTG AGGGTGGCTT
 9961 GGAAGTGCCT AAAGTCTACA AAGCGGTGGT AGGCCCGGT GTTGATTGTG TAGGAGCAGT
 10021 TGGCCATGAC TGACCAGTTG ACTGTCTGGT GCCCAGGGCG CACGAGCTCG GTGTACTTGA
 10081 GCGCGGAGTA TGCGCGGGTG TCAAAGATGT AATCGTTGCA GGTGCGCACC AGGTACTGGT
 10141 AGCCGATGAG AAAGTGTGGC GGTGGCTGGC GGTACAGGGG CCATCGCTCT GTAGCCGGGG
 10201 CTCCGGGGTG AAGTTCTTCC AGCATGAGGC GGTGGTAACC GTAGATGTAC CTGACATCC
 10261 AGGTGATACC GGAGGCGGTG GTGGATGCC CCGGAACTC GCGTACGCGG TTCCAGATGT
 10321 TGCGCAGCGG CATGAAGTAG TTCATGGTAG GCACGGTTG GCCCGTGAGA CGTGCACAGT
 10381 CGTTGATGCT CTAGACATAC GGGCAAACG AAAGCGGTCA GCGGCTCGTC TCCGTGGCCT
 10441 GAGGCTTAAG CGAACGGGTT GGGTCCGCG TGTACCCCGG TTCGAATCTC GGATCAGGCT
 10501 GGAGCCCGAG CTAACGTGGT ACTGGCACTC CCGTCTCGAC CCAGGCCTGC ACAAACCTC
 10561 CAGGATACGG AGGCGGGTCG TTTTCTTGT TTTTCTTGG ATGGGAGCCA GTGTGTCAAG
 10621 CTTTAGAACA CTCAGTTCTC GCGCCCGTAG TCTGGAGAAT TAATCGCCA GGTGCGTGG
 10681 GGTGTGCGTA CGTTGATAA AGCGCGCAT CGCGTCCCA CGGTTTCCGC GACAAGCGAG
 10741 GGTGTCGAG CCCAGTCATT TCCAAGACCC CGCCAGCCGA CTCTCCAGT TTACGGGAGC
 10801 GAGCCCTTTT TTTTTTTTGT TTTTGTGCGC CAGATGCATC CAGTGTGCGG ACAGATGCGC
 10861 CCCAGCAAC AGGCCCTTC TCAGCAACAG CAGCAGCAAT CACAAAAGGC TGTCCCTGCA
 10921 ACTACTGCAA CTGCGCCGTG GAGCGGTGCG GGACAGCCCG CCTATGATCT GGACTTGGAA
 10981 GAGGCGAAG GACTGCGACG TCTAGGTGCG CTTACCCCG AGCGGCATCC GCGAGTTCAA
 11041 CTGAAAAAAG ATTCTCGCGA GCGTATGTG CCCCAACAGA ACCTATTAG AGACAGAAGC
 11101 GGCGAGGAGC CGGAGGAGAT GCGAGCTTCC CGCTTAAACG CCGGTCTGTA GCTGCGTCA
 11161 GGTGTTGACC GAAGACGAGT GTTGCGGGAC GAGGATTCG AAGTTGATGA AATGACAGGG
 11221 ATCAGTCTCG CCAGGCGACA CTTGGCTGCA GCCAACCTTG TATCGGCTTA CGAGCAGACA
 11281 GTAAAGGAAG AGCGTAACTT CCAAAGTCT TTTAATAATC ATGTGCGAAC CCTGATTGCC
 11341 CGCGAAGAAG TTACCCTTGG GTCTGATGCA TCTGTGGGAC CTGATGGAGG CTATCACCCA
 11401 GAACCCACT AGCAAAACCC TGACAGCTCA GCTGTTCTG GTGGTTCAAC ATAGCAGGGA
 11461 CAACGAGGCA TTCAGGGAGG CGTTGTTGAA CATCACCGAG CCTGATGGGA GATGGCTGTA
 11521 TGATCTGATC AACATCCTGC AAAGTATTAT AGTGCAGGAA CGTAGCCTGG TTTGGCTGAG
 11581 AAGTGGCAGC TATCAACTAC TCGTCTTGA GCCTGGGCAA ATACTACGCT CGCAAGATCT
 11641 ACAAGACCCC CTACGTACCC ATAGACAAGG AGGTAAGAT AGATGGGTTT TACATGCGCA
 11701 TGACTCTCAA GGTGCTGACT TTGAGCGACG ATCTGGGGGT GTATCGCAAT GACAGGATGC
 11761 ACCGTGCGGT GAGCGCCAGC AGGAGGCGCG AGCTGAGCGA CAGAGAACTT ATGCACAGCT
 11821 TGCAAAGAGC TCTAACGGGG GCTGGGACCG ATGGGGAGAA CTACTTTGAC ATGGGAGCGG
 11881 ACTTGCAATG GCAACCCAGT CCGAGGGCCA TGAGGGCTG AGGGTGTGAG CTTCTTACA
 11941 TAGAAGAGGT GATGAAGTC GAGACAGAGG AGGCGAGTA CTTGGAAGAC TGATGGCGCG
 12001 ACCCGTATT TTTGCTAGAT GGAACAGCAG CAGGCACCGG ACCCCGCAAT GCGGGCGGGC
 12061 CTGCAGAGCC AGCCGTCCGG CATTAACTCC TCGGACGATT GGACCCAGGC CATGCAACGC
 12121 ATAATGGCGC TGACGACCCG CAACCCCGAA GCCTTTAGAC AGCAACCCCA GGCCAACCCG
 12181 CTTTCCGCTA TCTGGGAGG CGTAGTGCCC TCCCGCTCCA ACCCAACCCA CGAGAAGGTC
 12241 CTGGCTATCG TGAACGCTGC TGGTTGGAGA ACAAGGCCAT CCGTCCCGAT GAGGCCGGGC
 12301 TGGTATACAA TGCTCTCTTG GAGCGCGTGG CCCGTTACAA CAGCAGCAAC GTGCAGACCA
 12361 ACCTGGACCG GATGGTGACC GATGTGCGCG AGGCCGTGTC TCAGCGCGAG CGGTTCCAGC
 12421 GCGAGGCCAA CTTGGGATCG CTGGTAGCGC TAAACGTTT CCTCAGCACC CAGCCCGCTA
 12481 ACGTGCCCCG TGGTCAGCAA GACTATACAA ACTTTTTGAG TGCATTGAGA CTCATGGTAG
 12541 CTGAGGTGCC TCAGAGCGAG GTGTACCACT CCGGGCCAGA TTACTTCTC CAGACCAGCA
 12601 GACAGGGCTT CGACACAGTG AACCTGACTC AGGCTTTCAA GAACCTGAAG GGTCTCTGGG
 12661 GAGTGCACGC CGCAGTAGGG GATCGCGCGA CCGTGTCTAG CTTGCTGACT CCCAACTCCC
 12721 GCCTGCTGCT GCTGCTGGTA TCCCCCTTTA CTGACAGCGG TAGCATCGAC CGCAACTCGT
 12781 ACTTGGGCTA CCTGCTTAA CTTGATCGCG AGGCCATAGG GCAGAGCCAG GTGGACGAGC
 12841 AGACCTATCA AGAAATCACC CAAGTGAGCC GCGCCCTGGG TCAGGAAGAC ACGGGCAGTT
 12901 TGGAAAGCAC CTTGAACTTC TTGTAACCA ACCGGTCCGA GAAGATCCCT CCTCAGTATG
 12961 CGCTTACCGC TGAGGAGGAG CGGATCCTCA GATACGTGCA ACAGAGCGTT GGAAGTTTC
 13021 TGATGCAGGA GGGGGCGACA CCTACCGCGC CGCTGGACAT GACAGCTCGA AACATGGAGC
 13081 CCAGCATGTA TGCTAGTAAC AGGCCTTTCA TTAACAACT GCTGGACTAC CTGCACAGGG
 13141 GCGCCGCGAT GAATCTGAT TATTACCA ATGCTATCCT GAACCCACAC TGGCTGCCCC
 13201 CACCTGGTTT CTACACTGGC GAGTACGACA TGCCCGACCC CAATGACGGG TTCCTGTGGG
 13261 ACGATGTGGA CAGCAGCATA TTCTCCCCG CTCCCGGTTA TACAGTTTGG AAGAAGGAAG
 13321 GGGCCGATAG AAGACACTCT TCCGTGTCG TGTCCAGAAC GGCTGGTGCT GCCGCCACCG
 13381 TGCCCGAAGC TGCAGTCTCT TCCCTAGCT TGCCCTTTTC ACTAAACAGG GTTCCGAGCA
 13441 GTGAAGTGGG GAGAATAACC CGCCCGCGCT TGATGGGCGA GGATGAGTAC TTGAATGACT

13501 CTTTGTGGAG GCCAGAGAGG GAAAAGAACT TCCCAACAA TGGAAATAGAG AGCCTGGTGG
13561 ATAAAAAGAG TAGGTGGAAG ACTTATGCTC AGGATCACAG AGACGAGCCT GGGATCATGG
13621 GGATTACAAG TAGAGCGAGC CGTAGACGCC AGCGCCATGA CAGACAGAGG GGTCTTGTGT
13681 GGGACGATGA GGATTCGGCC GATGATAGCA GCGTGCTGGA CTGGGGTGGG AGAGGAAGGG
13741 GCAACCCGTT TGCTCATTG CGCCCTCGCT TGGGTGGTAT GTTGTAAAAA AAAATAAAAA
13801 AAAAACTCAT CAAGCCATG GCGAGCAGCG TAGCTTCGTT CTCTTTATT ATCTGTGCTCT
13861 AGTATAATGA GCGAGTCGT GCTAGGCGGA GCGGTGGTGT ATCCGGAGGG TCCTCCTCCT
13921 TCTTACGAGA GCGTGATGCA GCAACAGGGG GCGATGCTAC AGCCCCACT GGAGGCTCCC
13981 TTCGTACCCC CGCGGTACCT GCGCCTACG GAAGGGAGAA ACAGCATTCG TTA CTGGAG
14041 CTGTCCGCTC TGTACGATAC CACCAAGTTG TATCTGGTGG ACAACAAGTC GCGGACATT
14101 GGCTCCCTGA ACTATCAGAA CGACCACAGC AACTTCCTGA CCACGGTGGT GCAGAACAA
14161 GACTTTACCC CCACGGAGGC TAGCACCCAG ACCATCAACT TTGACGAGCG GTCGCGATGG
14221 GGCGGTGAGC TGAAGACCAT CATGCACACC AACATGCCCA ACGTGAACGA GTACATGTTT
14281 AGCAACAAGT TCAAGGCGAG GGTGATGGTG TCCAGAAAAG CTCTGAAGG TGTTATAGTA
14341 AATGACACCT ATGATCATAA AGAGGATATC TTAAGTATG AGTGGTTGA GTTCACTTTA
14401 CCAGAAGGCA ACTTCTCAGC CACCATGACC ATTGACCTGA TGAACAATGC CATCATTGAC
14461 AACTACTGG AAATGGCAG ACAAAATGGA GTGCTGGAAA GTGACATTGG TGTTAAGTTT
14521 GACTACTAGAA ACTTTAGGCT CCGGTGGGAC CCCGAACTA AGTTGATTAT GCCAGGAGTC
14581 TACACTTAG AGGCATTCCA TCCTGACATT GTATTGCTGC CTGTTGCGG GGTAGACTTT
14641 ACTGAAAGCC GACTTAGCAA CTTGCTTGGC ATCAGGAAAA GACATCCATT CCAGGAGGGT
14701 TTCAAAATCA TGATGAAGA TCTTGAAGGG GGTAAATATC CTGCCCTTTT GGATGTCACT
14761 GCCTATGAG AAAGCAAAA GGATACCACT ACTGAAACAA CCACACTGGC TGTTGCGAGG
14821 GAACACTAGT AAGATGATAA TATAACTAGA GGAGATACCT ATATAAGTGA AAAACA AAAA
14881 CGTGAAGCTG CAGCTGCTGA AGTTACAAAA GAGTTAAAGA TCCAACCTCT AGAAAAAGAC
14941 AGCAAGAGTA GAAGCTACAA TGCTTGGAA GACAAAATCA ACACGGCCTA CCGCAGCTGG
15001 TACCTGTCTT ACAATTACGG TAACCCCGAG AAAGGACTAA GGTCTTGGAC ACTGCTTACC
15061 ACTTCAGATG TCACCTGTGG GCGAGAGCAG GTCTACTGGT CGCTCCCTGA CATGATGCAT
15121 GACCCAGTCA CCTTCCGCTC CACAAGACAA GTCAACAAC ACCCAGTGGT GGGTGCAGAG
15181 CTTATGCCCC TCTTCTCAA GAGTTTCTAC AATGAGCAAG CCGTGACTC TCAGCAGCTC
15241 CGACAGGCCA CTTCCGCTCAC GCACGTCTTC AACCGCTTCC CTGAGAAAACA GATCCTCATC
15301 CGCCCGCCGG CGCCCAAT TACCACCGTC AGTAAAAACG TTCCTGCTCT CACAGATCAC
15361 GGGCCCTGCG GCTTACCGAG CAGTATCCGG GGAGTCCAGC GCGTGACCGT TACTGACGCC
15421 AGACGCGCA CCTGTCCCTA CGTTTACAAG GCCCTTGGCA TTGTCGCGCC GTGCGTCTT
15481 TCAAGCCGCA CTTTCTAAAA AAAAAA AAAA TGCCATTCT TATCTCGCCC AGTAATAATA
15541 CGCGTTGGGG TCTCGCGCT CCAAGCAAGA GTACGGAGG CGCCCGCATA CGCTGTACCC
15601 AGCACCTCTG GCGCCTTCCG GGTCAATTCC GCGCTCCATG GCGCGCACTC AAGGGTCCGA
15661 CCCGCACTCG GACCACGGTC GATGATGTGA TCGACCAGGT GGTCCCGCAT GCTCGTAATT
15721 ATACTCCTAC TGCGCCTACA TCTACTGTGG ATGCAGTTAT TGACAGTGTG GTGGCAGACG
15781 CCCCGCCTA TGCTCGCCGG AAGAGCCGAA GGAGGCGCAT TGCCAGGCGC CACAGGGCTA
15841 CTACCCGGCG CCGAGCTGCA AAAGCTATTG TGCGGAGGGC CAAACGTGTG GGGCGAAGAG
15901 CCATGCTTAG AGCGGCCAGA CCGCGGCTT TAGGTGCCAG CAGCGGCAGG TCCCAGGCG
15961 GCGCGGCCAC GCGCGCAGCA GCGGCCATTG CCAACATGGC CCAACCGCGA AGAGGCAATG
16021 TGTACTGGGT GCGTGATGCC ACTACCGGCC AGCGCGTGCC TGTGCGCACC CGCCCCCTC
16081 GCACTTAGAA GATACTGAGC AGTCTCCGAT GTTGTGTCCC AGCGGCAAGT ATGTCCAAGC
16141 GCAAATACAA GGAAGAGATG CTCCAGGTCA TCGCGCCTGA AATCTACGGT CCACCGGTGA
16201 AGGATGAAAA AAAGCCCCG AAAATCAAGC GGGTCAAAAA GGACAAAAAA TAAGAGGACT
16261 ATGACGATGA TGGGTGGTG GAGTTTGTGC GCGAGTTGCG CCAAGACGGC CGCGTGCAGT
16321 GGCGCGGGCG CAAAGTGCAT CAAGTGCTCA GACCCGGAAC ACGTGTGGT TTTACACCCG
16381 GCGAGCGTTC AAGCACTACT TTTAAACGGT CCTATGATGA GGTGTACGGG GATGATGATA
16441 TTCTTAGACA GCGCGCAGAC CGCCTTGATG AGTTTGCTTA TGGCAAGCGC ACTAGATCCA
16501 GTCCCAAAGA GAGGCTGTG TCCATTCCCT TAAATCATGG AAATCCCACC CCCAGCCTCA
16561 AACCGTCACT CTTGCAACAA GTGCTGCGCG TGCTTGGCGG GAGAGGCGTA AAGCGGAGG
16621 GTGAGGACCT ATATCTTACC ATGCAGCTAA TGGTGCCCAA GCGCCAGAGG CTAGAAGACG
16681 FACTGAGAA AATGAAAGTG GATCCCGATA TCCAGCCTGA GGTCAAAGTA AGACCTATCA
16741 AGGAAGTGGC CCGAGGTTTG GGAGTACAAA CCTTCGACAT CAAGCCGAGT CCATGGAAGT
16801 GCATACCGAA CCTGCAAAAC CTACACTCAC TTGAGGTGCA AACGGAACCC TGGACGCCCG
16861 CGCCCGTGTG TCGCCCCAG CACCCTCGA AGATGCAAAC GGAACCCCTG ACGCCCGCGC
16921 CCGTTGTTG CCCCAGCAC CACTCGAAGA TCACGACGAA AGTACGGCCC AGCAAGTCTT
16981 CTAATGCCCA ATACTGCTCT GCACCCATCC ATCATTCCCA CTCCCAGGTA CAGAGGCACT
17041 CGATACTATC GAAAACGAAA CAGTACCTGG TCCGATGGA TCCATCCTAG TCAGCAGCTT
17101 CTCACTAGCT GACGTCCGCA ACATTGCCAG CAAACTGACT CCGAGCCAGC CCTGGTGCAG
17161 GAAGAGTGAA CCGGATGTCG TCGGGAACCT TTGACACTGC CCGCGCGCGG CTACCATCCA
17221 AGCATCACCA CTTAATGACT GTTGACGCTG CCTCCTTGA GATATGGCCC TCACTTGGCG
17281 CCTTCGCGTC CCCATTA CTACTACGAG AAGAAACTCG CGCCGTAGAA GGTATGTTGG
17341 GCGAGGGATG CGCCGCCACA GACGAAGGCG CGCTATCAGC AGACGATTAG GGGGTGGCTT
17401 TTGCGCAGCT CTTATACCCA TCATCGCCGC AGCGATCGGG GCGATACCAG GCATAGCTTC
17461 CGTGGCGGTT CAGGCTCGC AGCGCCACTA ACATTGGAAA AAAACTTATA AATAACACTA
17521 GAATGGACTG TTAGCTCTG GTCCTGTGAC TATGTTTTGT AGAGATGGAA GACATCAATT
17581 TTTATCCTT GGCTCCGCGA CACGGCACGA AGCCGTACAT GGGCACCTGG AGCGACATCG
17641 GCACGAGCCA ACTGAACGGG GCGCCTTCA ATTGGAGCAG TATCTGGAGC GGGCTTAAAA
17701 ATTTTGGCTC AACCATAAAA ACATACGGGA ACAAGCTTG GAACAGCAGT ACAGGACAGG
17761 CGCTTAGAAA TAAACTTAAA GACCAGAACT TCCAACAAAA AGTAGTCGAT GGGATAGCTT
17821 CCGGCATCAA TGGAGTGGTA GATTTGGCTA ACCAGGCTGT GCAGAAAAAG ATAAACAGCG
17881 CTTTGGACCC GCGCCAGCA ACCCTGGTG AAATGGAAGT GGAGGAAGAA CTTCTCCGCG
17941 TGGAAAAGCG GCGGCAAG CGTCCGCGAC CCGAGCTGGA GCAGACACTG GTGACGCGCG
18001 CAGACGAGCC CCTTCATAC GAGGAGGCG TAAAGCTCG AATGCCCACT ACCAGGCTG
18061 TAGCTCACAT GGCTACCGGG GTAATGAAAC CTTCTCAGAC ACATCGACCC GCCACCTTGG

18121 ACTTGCCTCC TCCCCTGCT TCTGCGGCAC CTGTTCCCAA ACCTGTGCT ACCAGAAAGC
18181 CCACCGCCGT ACAGCCCGTC GCCGTAGCCA GACCGCGTCC TGGGGGCACA CCGCGCCCGA
18241 AAGCAAAGTGC GCAAAGTACT CTGAACAGCA TCGTGGGTCT GGGCGTGCAG AGTGTAAAGC
18301 GCCGTGCTCA CTATTAATTA AATATGGAGT AGCGCTTAAC TTGCTTGTCT GTGTGTATGT
18361 ATCATCAGCA CGCCGCGCA GCAGAGGAGA AAGGAAGAGG TCGCGCGCCG AGGCTGAGTT
18421 GCTTTCAAGA TGGCCACCCC ATCGATGATG CCCCAATGGG CATACATGCA CATCGCCGGA
18481 CAGGATGCTT CGGAGTACCT GAGTCCGGGT CTGGTGCAGT TCGCCCGTGC AACAGACACC
18541 TACTTCAGTA TGGGGAACAA GTTTAGAAAC CCCACAGTGG CGCCCAACCA CGATGTGACC
18601 ACCGACCGTA GCCAGCGACT GATGCTGCGC TTCGTGCCCC TTGACCGGGA GGACAATACA
18661 TACTCTTACA AAGTGGCGTA CACCCTCGCC GTGGGCGACA ACAGAGTGTG TGACATGGCC
18721 AGCACATTCT TTGACATTAG GGGGGTGTCT GATAGAGGTC CTAGCTTCAA GCCATATTCC
18781 GGCACAGCTT ACAATTCACT GGCTCCTAAG GCGCGCCTA ACACATCTCA GTGGATAGTT
18841 ACAACGGGAG AAGACAATGC CACCACATAC ACATTTGGCA TTGCTTCCAC GAAGGGAGAC
18901 AATATTACTA AGGAAGGTTT AGAAATTGGG AAAGACATTA CTGCAGACA CAAGCCATT
18961 TATGCCGATA AAACATATCA GCCAGAGCCT CAAGTTGGAG AAGAATCATG GACTGATATT
19021 GATGGAACAA ATGAAAAATT TGGAGGTAGA GCTCTTAAAC CAGCTACTAA AATGAAGCCA
19081 TGCTACGGGT CTTTTCGCAAG AACTACAAT ACAAAGGGG GCCAAGCTAA AAACAGAAAA
19141 GTAACACCAA CCGAAGGAAA TGTGAGACT GAGGAGCCAG ATATTGATAT GGAATTCTCC
19201 GATGGTAGAG AAGCTGCTGA CGCTTTTCG CCTGAAATTG TGCTTTACAC GGAAATGTC
19261 AATTTGGAAA CTCCAGACAG CCATGTGGTA TACAAGCCAG GAACCTCTGA TGGAATCTCT
19321 CATGCAAAAT TGGGTCAACA AGCCATGCCT AACAGACCCA ATTACATTGG CTTACAGGAT
19381 AACCTTGTAG GTCCTATGTA CTACAACAGT ACTGGAATA TGGGAGTTT TGCCCGCCAA
19441 GCATCACAAC TGAATGCAGT GGTGACTTG CAGGACAGAA ACACCTGAACT GTCATATCAG
19501 CTTTTGCTTG ATTTCTGTTG AGACAGAAGC AGATACTTCA GCATGTGGAA TCAGGCTGTG
19561 GACAGCTATG ATCCCGATGT TCGTATTATT GAAAATCATG GCGTCGAGGA TGAATGCCT
19621 AATTACTGTT TTCCTCTGGA TGGCATAGGA CCAGGAAAAA AATATCAAGG CATTAAACCT
19681 AGAGACAGTA CATGGGAAAA AGATACTAAA GTTTCTACAG CTAATGAAAT AGCCATAGGC
19741 AACAACTGCG CTATGGAAT TAATATCCAA GCTAATCTT GGAGAAGTTT TCTGTACTCC
19801 AATGTGGCTT TGTACCTTCC AGATGTTTAC AAGTACACGC CAACTAACAT TACTCTGCCC
19861 GCTAACACCA ACACCTATGA GTACATGAAC GGGCGAGTGG TTTCCCATC TCTGGTCGAT
19921 TACATACATA ACATTTGGCG CAGGTGGTCT CTTGACCCAA TGGACAATGT GAATCCATT
19981 GACCACCACC GCGATGCTGG CCTACGCTAC CGGTCCATGC TTCTGGGCAA TGGCCGTTAT
20041 GTGCCTTTCC ACATACAAGT GCCTCAAAAA TTCTTTGCTG TCAAGAACCT ACTTCTTCTA
20101 CCTGGCTCCT ACACCTATGA GTGGAACCTC AGAAAGGATG TGAACATGGT CCTGCAAAGT
20161 TCCCTTGGAA ATGACCTCAG AACAGATGGT GCTACCATAA GTTTCACCG CATCAACCTC
20221 TATGCCACCT TCTTCCCAT GGCTCACAA ACCGCTTCAA CTCTTGAAGC CATGTGGGC
20281 AACGATACCA ATGATCAGTC ATTCAAAGAC TACCTCTCTG CAGCTAACAT GCTTTACCCC
20341 ATCCCTGCCA CTGCAACCAA CATTCCAATC TCCATCCCAT CTCGCAACTG GCCACCCTTC
20401 AGGGCTGGT CTTCACTAG ACTCAAAACC AAGGAGACTC CATCTCTTGG ATCAGGGTTT
20461 GATCCCTACT TCCGTTATTC TGGATCTATT CCTACCTGG ATGGCACCTT TTACCTAAC
20521 CACACTTTCA AGAAGGTCTC CATCATGTTT GACTCCTCAG TCAGCTGGCC TGGCAATGAC
20581 AGGCTGTTGT TCCCAAATGA GTTTGAAATC AAGCGCACTG TGGATGGGGA AGGATACAAT
20641 GTGGCCCAAT GCAACATGAC CAAAGACTGG TTCTGGTTC AGATGTTTGC CAACTACAAC
20701 ATTGGCTACC AGGGCTTTTA CATCCCTGAG GGATACAAGG ATCGCATGTA CTCCTTTTTC
20761 AGAACTTCC AGCCTATGAG CAGGCAGGTG GTTGATGAGG TTAATTACAC TGACTACAAA
20821 GCCGTCACTT TACCATATCA ACACAACAAC TCTGGCTTG TAGGATACCT TGGCCTACT
20881 ATGAGACAAG GGGAACTTA CCCAGCCAAT TATCCATACC CGTCTATCG AACTACTGCC
20941 GTTAAAAGTG TTACCCAAAA AAAGTTCTCTG TGCAGACGGA CCATGTGGCG CATAACGTTT
21001 TCCAGCAACT TCATGTCCAT GGGAGCCCTT ACGGACCTGG GACAGAACCT GCTCTATGCC
21061 AACTCGGCC ATGCGCTGGA CATGACTTTT GAGGTGGATC CCATGGATGA GCCCACCTG
21121 CTTTATCTTC TTTTCGAAGT CTTGACGCTG GTCAGAGTGC ACCAGCCACA CCGCGCGCTC
21181 ATCGAGGCA TCTACCTGGC CACACCCTTC TCGGCCGGA ACGCCACCAC ATAAGAAGCC
21241 TCTTGCTTCT TGCAAGCAGC AGCTGCAGCC ATGTCAATGG GGTCCGAAA CCGCTCCAGC
21301 GAGCAAGAGC TCAAAGCCAT CGTCCGAGAC CTGGGTTGCG GACCCTATTT CCTGGGAACC
21361 TTTGACAAGC GTTTCGCGGG GTTCATGGCC CCCGACAAGC TCGCCTGCGC CATAGTCAAC
21421 ATTGCGGCAC CGGAGACGGG GGGAGAGCAG TGCTGCTT TTGGTTGGAA CCCGCGCTCC
21481 AACACCTGCT ACCTTTTGA TCCTTTTGGG TTCTCGGATG AGCGACTCAA ACAGATTTAC
21541 CAGTTTGAGT ACGAGGGGCT CCTGCGCCGC AGTGCCCTTG CTACCAAAAAG ACCGCTGCAT
21601 CACCCTGGAA AAGTCCACCC AGAGCGTGCA GGGCCCACGC TCAGCCGCTT GTGACTTTT
21661 TTGCTGTATG TTCCTTCATG CCTTTGTGCA CTGGCCCGAC CGCCCCATGA ACGGAAACCC
21721 CACCATGAAG TTGCTGACTG GGGTGCCCAA CAGCATGCTC CAATCTCCCC AAGTGCAGCC
21781 CACCCTGCGC CGCAACCAGG AGGCGCTATA TCGCTTCTTA AACACCCTACT CATCTTACTT
21841 TCGTTCTCAC CGCGCACGCA TCGAAAGGGC CACCGCTTT GACCGTATGG ATATGCAATA
21901 AGTCATGTAA AACCGTGTTC AATAAAAAGC ACTTTATTTT TACATGCACT AAGGCTCTCG
21961 TTTTTTACTC ATTCGTTTTT ATTATTCACT CAGAAATCAA ATGGGTCTG GCGGGAGTCA
22021 AAGTGACCCG CGGGCAGGGA TACGTTGCGG AACTGTAACC TGTTCTGCCA CTTGAACTCG
22081 GGGATCACCA ACTTGGGAAC TGGAACTCTG GGAAGGTGT CTTGCCAAA CTTTCTGCTC
22141 AGTCCGACGG CGCCAAAGTAG GTCAGGAGCA GAGATCTTGA AATCACAGTT GGGACCGGCA
22201 TTCTGGACAC GGGAGTTGCG GTACACTGGG TTGCAACT GGAACACCAT CAAGGCTGGG
22261 TGTCTCAGC TTGCCAGCAC GGTGCGGTC CTGATGGTAG TCACATCCAA GTCTTCAGCA
22321 TTGGCCATCC CAAAGGGGCT CATCTTACAG GTCTGCTGTC CCAACACGGG AGCGCAGCCT
22381 GGCTTGTGGT TGCAATCGCA ATGAATGGGG ATCAGCATCA TCCTGGCTTG GTCGGGGGTT
22441 ATCCCTGGGT ACACGGCCTT CATGAAGGCT TCGTACTGCT TGAAGCTTC CTGAGCCTTA
22501 CTTCCCTCGG TATAGAACAT CCCACAGGAC TTGCTGAAA ATTGATTAGT AGCACAGTTG
22561 CGATCATTTA CACAGCAGCG GGCATCGTTG TTGGCCAACT GGACCACATT TCTGCCCCAG
22621 GGTCTCTGGG TGATCTTGGC TCTGTCTGGG TTCTCCTTCA TAGCGCGCTG TCCGTTCTCG
22681 CTCGCCACAT CCATCTCGAT AATGTGGTCC TTCTGAATCA TGATAGTGCC ATGCAGGCAT

22741 TTCACCTTGC CTTTCATAATC GGTGCATCCA TGAGCCACCA GAGCGCACCC GGTGCACTCC
 22801 CAACTATTGT GGGCGATCTC AGAATAAGAA TGTACCAATC CCTGCATGAA TCTTCCCATC
 22861 ATCGCTGTCA GGGTCTTCAT GCTACTAAAT GTCAGCGGGA TGCCACGGTG CTCCTCGTTC
 22921 ACATACTGGT GGCAGATACG CTTGTACTGC TCGTGTCTGCT CTGGCATCAG CTTGAAAGAG
 22981 GTTCTCAGGT CATTATCCAG CCTGTACCTC TCATTAGCA CAGCCATCAC TTCCATGCCC
 23041 TCTCCAGG CAGATACCAG GGGCAAGCTC AAAGGATTCC TAACAGCAAT AGAAGTAGCT
 23101 CCTTTAGCTA TAGGGTCATT CTTGTGATC TTCTCAACAC TTCTCTTGCC ATCCTTCTCA
 23161 ATGATGCGCA CCGGGGGTA GCTGAAGCCC ACGGCCACCA ACTGAGCCTG TTCTCTTTCT
 23221 TCTTCGCTGT CGTGGCCGAT GTCTTGCAGA GGGACATGCT TGGTCTTTCT GGGCTTCTTC
 23281 TTGGGAGG TCGGGGGAGG ACTGTTGCTC CGTTCGGAG ACAGGGATGA CCGCGAAGTT
 23341 TCGGTACCA GTACCACCTG GCTCTCGATA GAAGAATCGG ACCCCACGCG ACGGTAGGTG
 23401 TTCCTCTTCG GGGGACAGG TGGAGGCGAC TGAGATGGC TGGGCTCTGG CCTTGAAGC
 23461 GGATGGCTGA CAGAGCCCAT TCCGCGTTCG GGGGTGTGCT CCCGTTGGCG GTCGCTTGAA
 23521 TGATTTCTC CGCGGGTGGC CATTGTGTTC TCCTAGGCAG AGAAACAACA GACATGGAAA
 23581 CTCAGCCATC ACTGCCAACA TCGCTGCAAG CGCCATCACA CCTCGGCCCC CAAGAAGCGA
 23641 CGAAGGAGGA GAGCTTAACC ACCCCACCA CCCAGTCCAG CTACCACCA CCTCTACCCC
 23701 TCGATGATGA AGGAGGAGGA GGTGACGCA GCCCAGGAGA TGCAGGCGCA GGATAATGTG
 23761 AAAGCGAAG AGATTGAGG AGATGTCGAG CAAGACCCGG GCTATGTGAC ACCGGCGGAG
 23821 CACGAGGAGG AGCTGAAACG TTTTCTAGAC AGAGAGGATG ACGACCGCCC AGAGCATCAA
 23881 GCAGATGGCG ATCACCAGGA GGCTGGCATC GGGGATCAAG TTGCCGACTA CCTCACCGGG
 23941 CTTGGGGGGG AAGACGTGCT CCTCAAACAT CTAGCAAGGC AGTCGAACAT AGTTAAAGAC
 24001 GCACTAGTCG ACTCAACCGA AGTGCCCATC AGTGTGGAAG AGCTTAGCCG CGCCTACGAG
 24061 CTGAACTCT TTTGCGCTCA CATACCCCCC AAGCGGCAC CAAACGCGAC CTGCGAGGCC
 24121 AACCTCTGC TGAACCTCTA TCCAGCTTTT ACTGTCCCCG AAGTGTGGA CACATACCAC
 24181 ATCTTTTTTA AGAAGCCAAA AATTCCAGTC TCCTGCCGCG CTAATCGCAC CCGCGCCGAT
 24241 GCCCTACTCA ATCTGGGACC TGGTTCACGC TTACTGATA TAGCTTCTTT GGAAGAGGTT
 24301 CCAAAAATCT TTGAGGGTCT GGGAAAGTAT GAGACTCGGG CCGCAAATGC TCTGCAACAG
 24361 GGAGAGAATG GCATGGATGA ACATCACAGC GCTTTAGTGG AACTGGAGGG TGACAATGCC
 24421 CGGCTTGCAG TGCTCAAGCG CAGTATCGTG GTACCCATT TTGCCTACCC CGCTGTTAAC
 24481 CTGCCCCCA AAGTTATGAG CGCTGTTATG GACCATCTGC TCATCAAACG AGCAAGACCC
 24541 ATTTACAGAA ACCGAACAT GCAGGATCCA GACGCTCGG ACGAGGGCAA GCCGTAGTC
 24601 GTGACGAGC AGCTATCTCG CTGGCTGGGT ACCAACTCCC CCCGAGATT GGAAGAGAGG
 24661 CGCAAGCTTA TGATGGCTGT AGTGCTAGTA ACTGTGGAG TGGAGTGTCT GCGCCGCTTT
 24721 TTCACCGACC CTGAGACCCT GCGCAAGCTA GAGGAGAACC TGCCTACAC CTTTAGACAT
 24781 GGCTTCGTC GCGAGGCATG CAAGATCTCC AACGTGGAGC TTACCAACCT GGTTCCTTAC
 24841 ATGGGCAATT TGCAATGAG CCGCTAGGG CAGAGCGTCC TGCACACCAC CCTTAAAGGG
 24901 GAGGCCCGCC GTGACTACAT CCGAGACTGT GTCTACCTTT ACCTCTGCCA TACCTGGCAG
 24961 ACTGGCATGG GTGTATGGCA ACAGTGTTTG GAAGAGCAGA ACCTTAAAGA GCTGGACAAG
 25021 CTCTTGCAA GATCCCTCAA AGCCCTGTGG ACAGGTTTTG ATGAGCGCAC CGTCGCTCG
 25081 AACCTGGCAG ACATCATCTT CCCCAGCGGT CTCAGGGTTA CTCTGCGAAA CCGCTAGCCA
 25141 GACTTTATGA GCCAGAGCAT GCTTAAACAAC TTTGCTCTT TCATCCTGGA ACGCTCCGGT
 25201 ATCCTGCCTG CCACCTGCTG TGGCTGCCCC TCCGACTTTG TGCCTCTCAC CTACCGCGAG
 25261 TGCCACCCG CGCTATGGAG CCACTGCTAC CTGTTCCGCC TGGCCAATA CCTCTCTAC
 25321 CACTCGGATG TTATAGAGGA TGTGAGCGGA GACGGTCTGC TGGAAATGCCA CTGCGCTGC
 25381 AATCTTTGCA CACCCACCG CTCCTTGCC TGCAACCCCC AGTTGCTGAG CGAGACCCAG
 25441 ATCATCGGCA CCTTCGAGTT GCAGGGTCCA GCAGTGAAGG CGAGGGGTCT TCTCCGGGGC
 25501 AGAGTCTAAA ACTGACACCG GGGCTGTGGA CCTCCGCTA CCTGCGCAAG TTTTATCCCG
 25561 AGGATTACCA CCCCTATGAG ATCAGGTTCT ATGAGGACCA GTCACATCTT CCCAAGTCG
 25621 AGCTCTCAGC CTGCGTATC ACCCAGGGAG CAATTCTGGC CCAATTGCAA GCCATCCAAA
 25681 AATCCCGCCA AGAATTTCTA CTGAAAAAGG GAAGCGGGT CTACCTTGAC CCCAGACCG
 25741 GTGAGGAGCT CAACACAAGG TTCCCCAGG ATGTCCCATC GCCGAGGAAG CAAGAAGCTG
 25801 AAGTGCAGC TGACGCCCC AGAGGATATG GAGGAAGACT GGGACAGCCA GGCAGAGGAG
 25861 GAGATGGAAG ATTTGGACAG CCAGGCAGAG GAGGAAGACA GTTTGGAGGA GGAAGACGAG
 25921 GAGGCAGAGG AGGTGGAAGA AGCAACCGCC GCCAAACAGT TGTCTCGGC GCGGAGACA
 25981 AGCAAGTCCC CAGACAGCAG CACGGCTACC ATCTCCGCTC CGGGTCCGGG GGTCCAGCGG
 26041 CGGCCCAACA GTAGATTGGA CGAGACCGGG CGATTCCCAA ACCCGACCAC CGGTTCCAAG
 26101 ACCGTTAAGA AGGAGCGACA GGGATACAAG TCCTGGCGTG GACACAAAAA CGCTATCATC
 26161 TCCTGCTTGC ATGAATGCGG GGGCAACATA TCCTTACCC GCGGATACCT GCTCTCCAC
 26221 CACGGTGTGA ACTTCCCCG CAATATCTTG CATTACTACC GTCAACTCCA CAGCCCTAC
 26281 TGCACTCAGC AAGTCCCGG AACCCCGACA GAAAAAGACA GCAGCGACAA CCGGTGACCA
 26341 GAAACCAGCA GTTAGAAAAT CTACTACAAG TGCAGCAGGA GGAGGACTGA GGATCACAGG
 26401 CGAACGAGCC AGCGCAGACC AGAGAGCTGA GGAACCGGAT CTTTCCAACC CTCTATGCCA
 26461 TCTTCCAGCA GAGTCCGGGG CAAGAGCAGG AACTGAAAGT AAAAAACCGA TCTCTGCGCT
 26521 CGTCAACAG AAGTTGTTT TATACAAGA GCGAAGACCA ACTTCAGCGC ACTCTCGAGG
 26581 ACGCCGAGGC TCTCTTCAAC AAGTACTGCG CGCTGACTCT TAAAGAGTAG CCCTTGCCCG
 26641 CGTTTATTG AAAACGGCGG GAATCACGTC ACCATTGGCA CCTGTCTTTT GCCCTAGTCA
 26701 TGAGTAAAGA GATTCCACG CCTTACATGT GGAGCTATCA GCCCCAAATG GGGTTGGCAG
 26761 CAGCCGCTC CCAGGACTAC TCCACCCGCA TGAATTGGCT TAGCCCGGGG CCTCAATGA
 26821 TATCACGGGT TAATGATATA CGAGCTTATC GAAACCAGT ACTCCTAGAA CAGTCAGCTC
 26881 TCACCACCAC ACCCCGCCAA CACCTTAATC CCCGAAATG GCCCGCGCC CTGGTGTACC
 26941 AGGAACTCC CGCTCCACC ACCGTACTAC TTCTCGAGA CGCCAGGCC GAAGTTCAGA
 27001 TGACTAACGC AGGTGTACAG CTGCGGGCG GTTCCGCCCT ATGTCGTCAC CGACTCAAC
 27061 AGAGTATAAA ACGCCTGGTG ATCAGAGGCC GAGGTATCCA GCTCAACGAC GAGTCGGTTA
 27121 GCTCTCGCT TGGTCTGCGA CCAGACGAG TCTTCCAGAT CGCCGGCTGT GGGAGATCTT
 27181 CCTTACCACC TCCTCAGGCT GTACTGACTT TGGAGAGTTC GTCCTCGCAG CCACGCTCGG
 27241 GCGGCATCGG AACTCTCCAG TTCGTGGAGG AGTTACTTCC CTCTGTCTAC TTCAACCCCT
 27301 TCTCCGGCTC TCCTGGCCAG TACCCAGACG AGTTCATACC GAACTTCGAC GCAATCAGCG

27361 AGTCAGTGGG TGGCTATGAT TGATGTCTAA TGGTGGCGCG GCTGAGCTAG CTCGACTGCG
 27421 ACACCTAGAC CACTGCCGCC GCTTTCGCTG CTTCCGCCGG GAACTCACCG AGTTCATCTA
 27481 CTTGGAAGTC CCCGAGGAGC ACCCTCAGGG TCCGGCCAC GGAGTGCAGG TTACCATCGA
 27541 AGGGGGAAATA GACTCTCGCC TGCATCGAAT CTCTCCAG CGACCCGTGC TGATTGAGCG
 27601 CGACCAGGAA AATAACAACA TCTCCATTTA CTGCATCTGT AACCACCCCG GATTGCATGA
 27661 AAGCCTTTGG TGTCTTGT TTGCTGAGTT TAATAAAAAC TGAGTTAAGA CCCTCCTACG
 27721 GACTACCCTCT TCTTCAATCA GGACTTTACA ACACCAACA GATCTTCCAG AAGACCCAGA
 27781 CCCTTCCTCC TCTGATCCAG GACTCTAACC CTACCTTACC AGCACCATCC ACTACTAACC
 27841 TTCCCGAAAC TAACAAGCTT GGATCTCATC TGCAACACCG CCTTTCACGA AGCCTTCTTT
 27901 CTGCCAATAC TACCCTCCC AAAACCGGAG GTGAGCTCCG CGGTCTCCCT ACTGACGACC
 27961 CCTGGGTGGT AGCGGTTTT GTAACGTTAG GAGTAGTTGC GGGTGGGCTT GTGCTAATCC
 28021 TTTGCTACCT ATACATACCT TGCTGTGCAT ATTTAGTCAT ATTGCGCTGT TGGTTTAAAA
 28081 AATGGGGGCC ATATTAGTCG TGCTTGTCTT ACTTTCGCTT TGGGTCTGG GCTCTGCTAA
 28141 TCTCAATCCT CTTGATCAGC ATCCATGTCT AGACTTCGAC CCAGAAAAT GCACACTTAC
 28201 TTTTGCACCC GACACAAGCC GTCTCTGTGG AGTTCCTATT AAGTGCGGAT AAGTGCAGCAG
 28261 GTCCGTTGAA ATTACACATA ATAACAAAAC ATGGAACAAT ACCTTATCCA CCACATGGGA
 28321 GCCAGGAGTT CCCGAGTGGT ATACTGTCTC TGCCGAGGT CCTGACGGTT CCATCCGCAT
 28381 TAGTAACAAC ACTTTCATTT TTTCTGAAAT GTGCGATCTG GCCATGTTCA TGAGCAGACA
 28441 GTATGACCTA TGGCTCCCA GCAAAGAGAA CATTTGGGCA TTTTCCATTG TTTATGTCTA
 28501 GGTAACATGC ATCATCACTG CTATCATTTG TGTGTGCATA CACTTGCTTA TAGTTATTCCG
 28561 CCCTAGACAA AGCAATGAGG AAAAAGAGAA AATGCCTTAA CCTTTTCCCT CATACTTTT
 28621 CTTTACAGCA TGGCTTCTGT TACAGCTCTA ATTTATTGCCA GCATTGTCCAC TGTCGTTCCAC
 28681 GGGCAAACAA TTGTCCATAT TACCTTAGGA CATAATCACA CTCTGTAGG GCCCCCAATT
 28741 ACTTCAGAGG TTATTTGGAC CAACTTGGGA AGTGTGATT ATTTTGATAT AATTTGCAAC
 28801 AAACTAAAC CAATATTTGT AATCTGTAAC AGACAAAATC TCACGTTAAT TAATGTTAGC
 28861 AAAATTTATA ACGGTTACTA TTATGGTTAT GACAGATCCA GTAGTCAATA TAAAAATTAC
 28921 TTAGTTCCCA TAACCTAGCC CAAATTAACA GTGCCAACTA TGACAATAAT TTAATGGCT
 28981 AATAAAGCAT TTGAAAATTT TACATCACCA ACAACGCCCA ATGAAAAAAA CATTCCAAAT
 29041 TCAATGATTG CAATATTGCG GCGCGTGGCA TTGGGAATGG CACTAATAAT AATATGCATG
 29101 TTCCTATATG CTTGTTGCTA TAAAAAGTTT CAACATAAAC AGGATCCACT ACTAAATTTT
 29161 AACATTTAAT TTTTATACCA GATGATTTCC ACTACAATTT TTATCATTAT TAGCCTTGCA
 29221 CCGTAACTT ATGGCCGTTT ACACCTAACC GTACCTGTTG GCTCAACATG TACACTACAA
 29281 GGACCCCAAG AAGGCTATGT CACTTGGTGG AGAATATATG ATAATGGAGG GTTCGCTAGA
 29341 CCATGTGATC AGCCTGGTAT AAAATTTTCA TGCAACGGAA GAGACTTGAC CATTATTAAC
 29401 ATAACATCAA ATGAGCAAGG CTTCTATTAT GGAACCACT ATAAAGATAG TTTAGATTAC
 29461 AACATTATTG TTTTGCAGC TACCACTCTC GCTCCCGCA AATCCACTTT CTCTAGCAGC
 29521 AGTGCCAAAG CAAGCACAAT TCCTAAAACA GCTTCTGCTA TTTTAAAGCT TCCAAAATC
 29581 GCTTTAAGTA ATTCACAGC CGTCCCAAT ACAATTCCTA AATCAACAAT TGGCATCATT
 29641 ACTGCCGTGG TAGTGGGATT AATGATTATA TTTTGTGCA TAATGTACTA CGCCTGCTGC
 29701 TATGAGAAAC ATGAAACAAA AGGTGATGCA TTAATAAATT TTGATGTTA ATTTTATATA
 29761 GAATTATTAT ATTGTTTCAA TCAAATACCA CTAACACTAT CAATGTGCAG ACTACTTTAA
 29821 ATCATGACAT GGAAAAACCA CACTACCTCC TATGCATACC CAATGTTTCA AGAAATTTCTA
 29881 AAAGACGTCC CATCTATTCT TCTATGATTA GTCGTCCCA TATGGCTCTG AATGAAATCT
 29941 AAGATCTTTT TTTTCTCT TACAGTATGG TGAACATCAA TCATGATCCC TAGAAATTTT
 30001 TTCTTACCA TACTCATCTG TGCTTTCAAT GTCTGTGCTA CTTTACAGC AGTAGCCACT
 30061 GCAAGCCAG ACTGTATAGG ACCATTTGCT TCCTATGCAC TTTTGCCTT CGTTACTTGC
 30121 ATCTGCGTGT GTAGCATAGT CTGCTGGT ATTAATTTT TCCAACCTGGT AGACTGGATC
 30181 TTTGTGCGAA TTGTTTAAAC CCATGCAGGC TATGCTACCA GTCATTTTAA TTCTGCTACT
 30241 CTTCTTAGGC TTATTTAAAA CCATGCAGGC TATGCTACCA GTCATTTTAA TTCTGCTACT
 30301 ACCCTGCAAT GCCCTAGCTT CCACGCCAC TCGCGCTACA CCTGAACAAC TTAGAAAATG
 30361 CAAATTTCAA CAACCATGGT CATTCTTGA TTGCTACCAT GAAAAATCTG ATTTTCCCAC
 30421 ATACTGATA GTGATTGTTG GAATAATTAA CATACTTTCA TGTACCTTTT TCTCAATCAC
 30481 AATATACCCC ACATTTAATT TTGGGTGGAA TTCTCCCAAT GCACTGGGTT ACCCACAAGA
 30541 ACCAAATGAA CATATCCAC TACAACACGT ACAACAACA CTAGCACTGG TAGAGTATGA
 30601 AAATGAGCCA CAACCTTAC TGCCCCCTGC CATTAGTTAC TTCAACCTAA CCGCGGAGG
 30661 GAAGTACGAA AATCGCCACA TCATCCACCG CTGCCAAGGA GCTGCTGGAC ATGACCGGAC
 30721 GTGCCTCAGA ACAGCGACTC ATCCAACTAC GCATTCTGCA GCAGCAGGAA CGAGCAGTAA
 30781 AAGAGCTAAG GGATGCCATT GGGATTACC AGTGCAAAAA AGGCATATTC TGCTTAGTAA
 30841 AACAAATCAA AATCTCTAC GAGATCACCG CTAAGTACCA TCGTCTCTCA TACGAGCTCG
 30901 GTCCGACGCG ACAAATAATC ACCTGCATGG TGGGAATCAA CCCCATAGTT ATCACCCAGC
 30961 AGTCTGGAGA TACTAAGGGT TGCATCCACT GTTCTGTGA TTCCACCAGG TGCATCTACA
 31021 CACTGCTGAA GACCCTCTGC GGCCTTCGAG ACCTCCTACC CATGAACATA TCATTGCCCC
 31081 CTCCCTTACC CAATCCAAAT ATTAATAAAG AACTTACTT GAAATCAGCA ATACAGTCTT
 31141 TGTCAAAAC TTTCTACAGC AGCACCTCAC CCTCTCCCA ACTCTGGTAC TCTAAACGTC
 31201 GGAGGGTGGC ATACTTTCTC CACACTTTGA AAGGGATGTC AAATTTTATT TCCTCTTCTT
 31261 TGCCCAAT CTTTCTTCT TTATCCCGAG ATGGCCAAGC GAGCTCGGCT AAGCACTTCC
 31321 TTCAACCCGG TGTACCCTTA TGAAGATGAA AGCAACTTAC AACACCATT TATAAATCTT
 31381 GGTTTCAATTT CCCAGCAGG GTTACACAAA AGTCCAAACG GGGTTTTAAG TCTTAAATGT
 31441 GTTAATCCAC TTACCACTGC AAGCGGCTCC CTCCAACCTA AAGTGGGAAG TGGTCTTACA
 31501 GTAGACACTA CTGATGGATC CTTAGAAGAA AACATCAAAG TTAACACCCC CCTAACAAAG
 31561 TCAAACCAAT CTATAAATTT ACCAATAGGA AACGGTTTGC AAATAGAACA AAACAAACTT
 31621 TGCAATGAG TCGGAAATGG TCTTACATTT GACTCTTCCA ATTCTATTGC ACTCAAAAAT
 31681 AACACTTTAT GGACAGGTCC AAAACCGAGAA GCCAACTGCA TAATTGAATA CGGAAAAGAA
 31741 AACCCAGATA GCAAACCTAAC TTTAATCCTT GTAAAAATG GAGGAATTGT TAATGGATAT
 31801 GTAACGCTAA TGGGAGCCTC AGACTATGTT AACACCTTAT TAAAAACAA AAATGTCTCC
 31861 ATTAATGAG TATGCCCCTT TGATGCCACT GGTATATAT TACCAGACTT ATCTTCTCTT
 31921 AAAACAGATC TACAACATAA ATACAAGCAA ACCACTCACT TTAGTGCAAG AGGTTTTATG

31981 CCAAGTACTA CAGCGTATCC ATTTGTCCTT CCTAATGCGG GAACAGATAA TGAAAATTAT
32041 ATTTTGGTCT AATGCTACTA CAAAGCAAGC GATGGCGCCC TTTTCCGTT GGAAGTTACT
32101 GTTACGCTTA ATAAACGCCT GCCAGATAGT CGCACATCCT ATGTTATGAC TTTTATATGG
32161 TCCTTGAATG CTGCTCTAGC TCCAGAACT ACTCAGGCAA CCCTGATAAC CTCGCCATT
32221 ACCTTTTCCT ATATTACAGA GGATGACTGA CAACAAAAAT AAAGTTCAAC ATTTTATAT
32281 GAAATTCCTT TTACAGTATT CGAGTAGTTA TTTGCTCTCC CCCTTCCCAT TTAACAGAAT
32341 ACACCAATCT CTCCCCACGC ACAGCTTTAA ACATTTGGAT ACCATTAGAG ATAGACATAG
32401 TTTTAGATTC CACATTCCAA ACAGTTTCAG AGCGAGCCAA TCTGGGGTCA GTGATACATA
32461 AAAATGCATC GGGATAGTCT TTTAAAGCGC TTTCACAGTC CAACTGTTGC GGATGCGACT
32521 CCGGAGTCTG AATCACGGTC ATCTGGAAGA AGAACGATGG GAATCATAAT CCGAAAACGG
32581 AATCGGGCGA TTGTGTCTCA TCAACCCAC AAGCAGCCGC TGTCTGCGTC GCTCCGTGCG
32641 ACTGCTGTTT ATAGGATCGG GATCCACAGT GTCCTGAAGC ATGATTTTAA TAGCCCTTAA
32701 CATTAACTTT CTGGTGCGAT GCGCGCAGCA ACGCATTCTT ATTTCACTTA GATTACTACA
32761 GTAGGTACAG CACATTATCA CAATATTGTT TAATAACCA TAATTAAGAG CGTCCAGCC
32821 AAAACTCATA TCAGATATAA TCGCCCTGTC ATGACCATCA TACCAAATTT TAATATAAAT
32881 TAAATGTCGT TCCCTCAAAA ACACACTACC CACATACATA ATCTCTTTG GCATGTGCAT
32941 ATTAACAATC TGTCTGTACC ATGGACAACG TTGGTTAATC ATGCAACCCA ATATAACCTT
33001 CCGGAACCCAC AATGCCAACA CCGCTCCCCC AGCCATGCAT TGAAGTGAAC CCTGCTGATT
33061 ACAATGACAA TGAAGAACC AATTCTCTCG ACCATGAATC ACTTGAGACT GAAAAATATC
33121 TATAGTAGCA CAACAAAGAC ATAAATGCAT GCATCTTTT ATAATTTTAA ACTCTCTGG
33181 ATTTAAAAAC ATATCCCAAG GAATGGGAAA CTCTTGAGA ACAGTAAAGC TGGCAGAACA
33241 AGGAAGACCA CGAACACAAC TTACACTATG CATATCATA GTATCACAAT CTGGCAACAG
33301 CGGGTGGTCT TCAGTCATAG AAGCTCGGGT TTCATTTTCC TCACATCGTG GTAACGGGC
33361 TCTGGTGTA GGGTGTATG TGGCGCATGA TGTGGAGCGT GCGCGCAACC TTGTCATAAT
33421 GGAGTGTGCT CCTGACATTC TCGTATTTG TATAGCAAAA CGCGGCCCTG GCACAACACA
33481 CTCTTCTTCG TCTTCTATCC TGCCGCTTAG TGTGTTCCGT CTGATAATTC AAGTACAGCC
33541 ACATGTCTAA AATGGTCAAA AGAATGCTGG CTTGAGTTGT AATTAATACT CCATCATATT
33601 TAATGTCTT AAGGAAATCA TCCACGGTAG CATATGCAA TCCCAACCAA GCAATGCAAC
33661 TGGATTGCGT TTCAAGCAGC AGAGGAGAGG GAAGAGACGG AAGAATCATG TTAATTTTTA
33721 TTCCAACGTA TCTCGCAGTA CTTCAAATG TAGATCGCGC AGATGGCATC TATCGCCCCC
33781 ACTGTGTTGG TGA AAAAGCA CAGCTAAATC AAAAGAAATG CGATTTTCAA GGTGCTCAAC
33841 GGTGGCTTCC AACAAAGCCT CCACGCGCAC ATCCAAAAC AAAAGAATAC CAAAAGAAGG
33901 AGCATTTTCT AACTCTCTAA ACATCATATT ACATTCCTGC ACCATTCCCA GATAATTTT
33961 AGCTTTCCAG CCTTCAATTA TTCGTGTGAG TTCTTGTGGT AAATCCAAAC CACACATTAC
34021 AAACAGGTCC CCGAGGGGCG CCTCCACCAC CATTCTTAAA CACACCCTCA TAATGACAAA
34081 ATATCTGTCT CCTGTGTGTC CTGTAGCAAA TTAAGAATGG CATTATCAA TTGACATGCC
34141 CTGGCTCTAA GTTCTTCTCT AAGTTCTAGT TGTAGATACT CTCTCATATT ATCACCAAAC
34201 TGCTTAGCCA GAAGCCCCC GGGAAACAATA GCAGGGGACG CTACAGTGCA GTACAAGCGC
34261 AGACCTCCCC AATTGGCTCC AGCAAAAACA AGATTAGAAT AAGCATACTG GCAACCACCA
34321 GTAATATCAT CAAAGTTGCT GGAATATAA TCAGGCAGAG TTTCTTGTA GAATTGAATA
34381 AAAGAAAAAT TTTCAAAAA AACATTCAA ACCTCTGGGA TGCAAATGCA ATAGGTTACC
34441 GCGCTGCGCT CCAACATTGT TAGTTTTGAA TTAGTCTGCA AAATAAAGA AACAGCGTC
34501 ATATCATAGT AGCTGTGCGA ACAGGTGGAA AAATCAGTCT TTCCATCACA AGACAAGCCA
34561 CAGGTCTCC AGCTTACCCT TCGTAAAACC TGTATCGTG ATTAACAAC AGCACCGAAA
34621 GTTCTCGCG GTGGCCAGCA TGAATAATC TTGATGAAGC ATATAATCCA GACATGTTAG
34681 CATCAGTTAA AGAGAAAAA CAGCCAACAT AGCCTCTGGG TATAATTATG CTTAATCTTA
34741 AGTATAGCAA AGCCACCCCT CGGGATACA AAGTAAAGG CACAGGAGAA TAAAAATAT
34801 AATTATTTCT CTGCTGCTGT TCAGGCAACG TCGCCCCGG TCCCTCTAAA TACACATAA
34861 AAGCCTCATT AGCCATGGCT TACCAGGCAA AGTACAGCCA ACGCGCAAAG CACAAGCTCT
34921 AAAGAAGCTC TAAACACTC TCCAACCTCT CCACAATATA TACACAAGCC CTAACCTGAC
34981 GTAATGAGAG TAAAGTGTA AAAATCCCGC CAAACCAAAC ACACACCCCG AAACCTGCGT
35041 AGCAGGGAAA AGTACAGTTT CACTTCTCA ATCCAAACAA GCGTAACTTC CTCTTTCTCA
35101 CGATACGTCA CATCCGATTA ACTTACAACG TCATTTTCCC ACGGCCGCCC CGCCATTTT
35161 AGCCGTTTAC CCCACAGCCA ATCACCACAC AGCGCGCACT TTTTAAATT ACCTCATTTA
35221 CATATTGGCA CCATTCCATC TATAAGGTAT ATTATTGATG ATG

Polimorfismos y epidemiología molecular AV7

1990

>BA55-90

AAGATGGCCACTCCCTCGATGATGCCCGAATGGGCATACATGCACATCGCCGGACAGGATGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGG
 TGCAGTTCGCCCGTGCACAGACACCTACTTCACTATGGGGAACAAGTTTGAACACCCACAGTGGCGCCACCACGATGTGACCAC
 CGACCGTAGCCAGCGACTGATGCTGCGCTTCGTGCCGTTGACCGGGAGGACAATACATACTCTTACAAAGTCCGGTACACCCTCGCC
 GTGGCGACAACAGAGTGTGACATGGCCAGCACATTTTTCGACATTAGGGGGGTGCTTGATAGAGGTCCTAGCTTCAAGCCATATT
 CCGGCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCGCCTAACACATCTCAGTGGATAGTTACAACGGGAGAGACAAATGCCACCAC
 ATACACATTTGGCATTGCTTCCAGGAAGGGAGACAATTAAGGAAGGTTTGAAGAAATGGGAAAGACATTACTGCAGACAACAAG
 CCCATTTAAGCGATAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAATCAATGACTGATATTGATGGAACCAATAGGCAACTTTG
 GAGGTAGAGCTCTTAAACCAGTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGTCTTTTGAAGACCTACAACATAAAAGGGGGCCAAAGCTAA
 AACAGAAAAGTAAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAGACTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAATTTTTGATGGTAGAGAAGCTGCT
 GACGCTTTTTCGCCTGAAATTTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTAGAACTCCAGACAGCCATGTAGTTTACAAGCCAGGAACTT
 CTGATGATACTCTCATGCAAAATTTGGTCAACACAGCCCTTAAAGTCCATAACAGCCCAATTAATTGGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGCT
 AATGTACTACAACAGTACTGGAATATGGGAGTTTGGTGGCCAAGCATCACAACCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAAC
 ACTGAACTGTATATCAGCTTTTGGTGTGATTCTCTGGGAGACAGAACCAGATACTTCAAGTATGTGGAACAGGCTGTGGACAGTTATG
 ATCCCGATGTTGCAATTTGAAAATCAGGCATCGAGGATGAATCGCTAATTTACTGTTTTCTCTGGATGGCATAGGACCAGCGAA
 AACATATCAAGGCATTAACATAGAGACACTGCATGGGAAAAGATACTAAAGTTTCTACAGCTAATGAAATAGGCAACTAGGCAACT
 CTGGCTATGGAAATTAATATCCAAGCTAATCTTGGAGAAGTTTTCTGACTCCAATGTGGCTTTGTACTTCCAGATGTTTACAAGT
 ACACGCCAACTAACATTAATCTGCCCCTAACACCAACACCTATGATGATGAAACGGGCGAGTGGTTCCCCATCTCTGGTTGATTC
 ATACATCAACATTTGGCGCCAGGTGGTCTTTGACCAATGGACAATGTGAATCCATTTAACACCACCAGCAATGCTGGCCTACGCTAC
 CGGTCCATGCTTCTGGGCAATGGCCGTTATGTGCTTTCCACATACAAGTGCCTCAACATTTCTTGTCTCAAGAACCCTACTTCTTC
 TACTGGCTCTTACACCTATGAGTGGAACTTCAGAACGGATGTGAACATGGTCTGCAAAAGTTCCTTGGAAATGACCT

1991

>BA10-91

ACAGACCAATTACATTGGCTTCAGGGATACTGTTTAGTCTTAATGTACTACAACACTACTGGAATATGGGAGTTTTGGCCGGCCA
 AGCATCAACAGCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGTATATCAGCTTTTCTGATTCTCTGGGAGACAGA
 AGCAGATACTTCAAGTATGGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGATCCCGATGTTCTGATTTATGAAAATCATGGCGTCGAGGATGAAC
 TGCCTAATTAATGTTTTCTCTGGATGGCATAGGACCAGGGAACAATATCAAGGCATTAACCTAGAGACACTGCATGGGAAAAAGA
 TACTAAAGTTTCTACAGCTAATGAAATAGCCATAGGCAACAATCTGGCTATGGAATTAATATCAAGCTAATCTTTGGAGAAGTTTT
 CTGACTCCAATGAGCTTTGACTACTTCCAGATGTTTACAAGTACAGCCCAACTAACATTAATCTCTGCCGCTAACACCAACCTATG
 AGTACATGAACGGGCGAGTGGTTTTCCCATCTCTGGTCGATTACATCAACAATGGCCAGGTGGTCTCTTGACC

1992

>BA22-92

AGATGGCCACCCCTCGATGATGCCCGAATGGGCATACATGCACATCGCCGGACAGGATGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGT
 GCAGTTCGCCCGTGCACAGACACCTACTTCACTATGGGGAACAAGTTTGAACACCCACAGTGGCGCCACCACGATGTGACCACC
 GACCGTAGCCAGCGACTGATGCTGCGCTTCGTGCCGTTGACCGGGAGGACAATACATACTCTTACAAAGTCCGGTACACCCTCGCCG
 TGGGCGACAACAGAGTGTGACATGGCCAGCACATTTTTCGACATTAGGGGGGTGCTTGATAGAGGTCCTAGCTTCAAGCCATATT
 CGGCACAGCTTCAATTTCACTGGCTCCTAAGGGCGCGCCTAACACATCTCAGTGGATAGTTACAACGGGAGACAAATGCCACACA
 TACACATTTGGCATTGCTTCCAGGAAGGGAGACAATTAAGGAAGGTTTGAAGAAATGGGAAAGACATTACTGCAGACAACAAGC
 CCATTTATGCGGATAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATACTGATGGAACAAATGAAAAGTTTGG
 AGGTAGAGCTTAAACCAGCTACCAAAATGAAGCCATGCTACGGGTCTTTTGAAGACCTACAATATAAAAGGGGGCCAAAGCTAAA
 AACAGAAAAGTAAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAGACTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAATTTTTGATGGTAGAGAAGCTGCTG
 ACGTTTTTCCGCTGAAAATTTGCTTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAACCTCCAGACAGCCATGTGGTATACAAGTGAAGAACTC
 TGATGGTAACTCTATGCAAAATTTGGTCAACAAGCCATGCCTAACAGACCAATTAATGCTTCCAGGATAACTTTGTAGGTCTT
 ATGACTACAACAGTACTGGAATATGGGAGTTTTGGCCGGCAAGCATCACAACCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACA
 CTGAAGTGTATATCAGTTTTGCTTGTATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAAGTATGGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGA
 TCCCGATGTTCTGATTTAGAAAATCATGGCGTCGAGGATGAATGCTTCAATTAATGTTTCTCTGGATGGCATAGGACCAGGGAAC
 AAATATCAAGGCATTAACCTAGAGACACTGCATGGGAAAAGATACTAAAGTTTCTACAGCTAATGAAATAGCCATAGGCAACAATC
 TGGCTATGGAATTAATATCCAAGCTAATCTTGGAGAAGTTTTCTGACTCCAATGTGGCTTTGTACTTCCAGATGTTTACAAGTA
 CAGCCAACTAACATTAATCTGCCCCTAACACCAACACCTATGAGTACATGAACGGGCGAGTGGTTTTCCCATCTCTGGTCGATTCA
 TACATCAACATTTGGCCAGTGGTCTTCTGACCAATGGGATGACTGCAATTTAACACCAACGAATTAACCACTTCCAGGACCACTAC
 GGTCCATGCTTCTGGCAATGGCCGTTATGTGCTTTCCACATACAAGTGCCTCAAAAATTTCTTGTCTCAAGAACCCTACTTCTTCT
 ACCTGGCTCCTACACCTATGAGTGGAACTTCAAGAAAGGATGTGACCATGGTCTGCAAAAGTTCCTTGGAAATGACCTCAGACAGAT
 GGTGCTACCAATAGTTTACCAGCATCAATCCATATGCCACTTATTTCCCATGGCTCACAACACAGCTTCAACCCCTGAAGCCATGG
 TGCGCAACGATAGCCCAATGCTTCAACAGCAACTCTCGGAGGATGAACTGCAATTTAACACCAACGAATTAACCACTTCCAGGACCA
 ACCAATTTCCATCCCATCTCGCACTGGCCAGCCTTCAAGGGCTGGTCTTCACTAGGCTCAAAACCAAGGAGACTCCATCTCTGGA
 TCAGGTTTGCATCCCTACTTCTGATATTTCTGGATCTATCCCTACCTGGATGGCACCTTTTACCTTAACCACTTTCAAGAAGGTCT
 CAATCATGTTTGAATCTCAGTCACTGGCCTGGCAATGACAGGCTGTTGTCTCAAAATGAGTTTGAATCAAGCGCACTGGCGATGG
 GGAAGGATACAATGTTGCCCAATGCCATGACCAAAAGACTGGTTCTGGTTGAGTGTGCTTGCACCACTACAACATTTGGTCAACAGGCG
 TTTTACATCCCTGAGGGATACAAGGATCGCATGTACTCTTTTTCAGAACTTCCAGCCTATGAGCAGGCGAGGTGGTTGATGAGGTTA
 ATTACTGACTACAAGCCGCTACCTTACCATATCAACACAACAACCTCTGGCTTTGATGATACCTTGGCGCTACTATGAGACAAGG
 GGAACCTTACCAGCAATTTATCCATACCCGCTCATCGGAACCTACTGCGTTAAAAGTGTATCCCAAAAAGTTCCTGTGGCAGCAGG
 ACCATGTGGCGCATAACCTTCTCCAGCAACTTCAATGTCTGGGAGCCCTTACGGACCTGGGACAGAAACATGCTCTATGCAACTCGG
 CCCATGCGCTGGACATGACTTTTGGAGTGGATCCCATGGATGAGCCACCCTGCTTTATCTTTTGAAGTCTTCCAGCTGGTCCAG
 AGTGCACCAGCCACCGCGCGCTCATCGAGGCGCTCACTGCGCACACCGTCTCGGCCGGCAACGCCACCAATAAG

>BA23-92

ATGGGCATACATGCACATCGCCGGACAGGATGCTTCGGAGTACTTGAAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTCGCCCGTGCACAGGACACTAC
 TTCAGTATGGGGAACAATTTAGAAACCCACAGTGGCGCCACCACGATGTGACCACCGACCGTAGCCAGCGACCGATGTGCGCT
 TCGTGCCCGTTGACCGGGAAGACAATACCTACTCTTACAAAGTCCGGTACACCCCTCGCCGTGGGCGACAACAGAGTCCGTGACATGCG
 CAGCACCTTTTTCGACATTAGGGGGGTGCTTGATAGAGGTCCTAGCTTCAAGCCATATTCCGGCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCT
 AAGGCGGCTTAAACATCTCAGTGGATAGTTACAACGGGAGAGAACAATGCCACCAATACACATTTGGCATTTGCTTCCAGCAAGG
 GAGACAATATACTAAGGAAGGTTTGAAGAAATGGGAAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAACATATCAGCC
 AGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAAATCATGACTGATATTTGATGGAACAAATGAAAATTTGGAGGTAGAGCTTAAACCAGCTACTAAA
 ATGAAGCCATGCTACGGGTCTTTTGAAGACCTACGAATATAAAAGGGGGCCAAAGCTAAAACAGAAAAGTAAAACCAACCGAAGGAG
 ATGTTGAGACTGAGGACAGATATGATATGGAATTTTTGATGTTGAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTCGCTGAAATTTGCTTTA
 CACGGAAAATGTCAATTTAGAACTCCAGACAGCCATGTAGTATACAACCCAGGAACCTCTGATGGTAACTCTCATGCAAAATTTGGGT

CAACAACCCATGCCTAACAGACCCCAATTACATTTGGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGCCTAATGTACTACAACAGTACTGGAAATATGG
 GAGTTTTGGCCGCAAGCATCAACCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGCATATCAGCTTTTGGTTGA
 TTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAGCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGATCCCGATGTTTGGTATTATTGAAAATCAT
 GGGTCGAGGATGAACCTAATTACTGTTTTCTCTGGATGGCATAGGACAGGGAAACAAATATCAAGGCATTAACCTAGAGACA
 CTCGATGGGAAAAGATACTAAAGTTTCTACAGTAATGAAATGGCCATAGGCAACAAATCTGGCTATGGAAATTAATATCCAAGCTAA
 TCTTTGGAGAAGTTTTCTGACTCCAATGTGGCTTTGACTCTCCAGATTTTACAAGTACACGCAACTAACATTACTTTGGCCGCT
 AACACCAACACCTATGATGTACATGAACGGGGAGTGTATCCCATCTCTGGTTCGATTACATCAACATTGGCCAGGTTGGTCTC
 TTGACCAATGGACAATGTGAATCCATTCAACCACCACCGCAATGCTGGTCTGCGCTACCGGTCATGCTTCTGGGCAATGGTCTGTA
 TGTGCTTTCCACATCAAGTGCCTCAAAAATTTCTTGTCTGCAAGAACCTACTTCTTACTCTGGCTCTACACCTATGAGTGGAA
 TTCAGAAAGATGTGAACATGGTCTGCAAAAGTTCCTTGGAAATGACCTCAGAACAGATGGTGTCTACCATAAGTTTACCAGCATCA
 ATCTGATGCACTTCTTCCCATGGCTCAACAACAGCTTCCACCCTTCAAGCAATGCTGCGCAAGCTTACATGATCCATGATCCAT
 CAACGACTACCTCTCTGCAGCTAACATGCTTTACCCCATCCCTGCCAATGCAACCAACATTCCAATTTCCATCCCATCTCGCAACTGG
 GCAGCCTTCAGGGGCTGGTCTTCACTAGGCTCAAAAACCAAGGAGACTCCATCTCTGGATCAGGGTTGATCCCTACTTCTGATATT
 CTGGATCTATTCCCTACCTGGATGGCACCTTTTACCTTAACCACACTTTCAAGAAGGTCTCCATCATGTTTACTCTCAGTCAGCTG
 GCCTGGCAATGACAGGCTGTTGAGCCCAAATGAGTTGAAATCAAGCGCACTGTGGACGGGAAAGGTTACAATGTCGCAATGTAAC
 ATGACCAAGACTGGTTCCTGGTTCAGATGCTTGCCAACTACAACATTGGCTACCAGGGCTTTTACATCCCTGAGGGATAACAAGGATC
 GCATGTACTCTTTTTCAGAACTTCCAGCCTATGAGCAGGAGGTTGGTGTATGAGGTTAATACACTGACTACAAAGCCGTCACCTT
 ACCATATCAACAACAACCTCTGGCTTTGTAGGATACCTTGGCCTACTATGAGACAAGGGGAACTTACCAGCCAATTTCCATAC
 CCGCTCATCGAACTACTGCCGTTAAAAGTGTACCCAAAAGTTCTTGAAGCACTGTGCGACAGGACCATGTGGCGCATACCGTTCTCAGCA
 ACTTCATGTCCATGGGAGCCCTTACGGACCTGGGACAGAACCTGCTCTATGCCAACTCGGCCATGCGCTGGACATGACTTTTGGAGT
 GGATCCCATGGATGAGCCACCCTGCTTTATCTTTTGAAGTCTTCGACAGGTGAGTGCACAGCCACACCGGGCGTAACT
 GAGGCGTCTACCTGCGACA

1998

>BA3-99

TGCACATCGCCGACAGGATGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTGCGCCGTGCAACAGACACCTACTTCAGTATGGG
 GAACAAGTTTAGAAACCCACAGTGGCGCCACCACAGTATGACACCGGATGCGGACTGATGCTGCGCTTCGTGCCCGTT
 GACCGGGAGGACAATACACTCTTACAAGTGGCGTACACCTGCTCCGCTGGGCGACACAGAGTGTGATGCTGCGCAGCATTTCT
 TTGACATTAGGGGCTTGTATAGAGGCTTCTAGCTTCAAGCCATATTCGGGACAGCTTACAATTCATGGCTCCTAAGGGGCGCC
 TAACACATCTCAGTGGATAGTTACAACGGGAGAAGACAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAAAT
 ACTAAGGAAGTTTAGAAATGGGAAAGACATTAAGTGCAGACAACAGCCCATTTATGCCGATAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAG
 TTGGAGAAGAATCATGGAAGTATTTGATGGAACAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTTTAAACCAGCTACTAAAATGAAGCCATG
 CTACGGGTCTTTTGAAGCCTCAAAACATAAAAGGGGGCCAAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCT
 GAGGAGCCAGATTTGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGTCTGACGCTTTTTCGCTGAAATTTGCTTTACACGGAAAATG
 TCAATTTGGAACCTCCAGACAGCCATGTTGATACAAGCCAGGAACCTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAAATTTGGGTCAACAAGCCAT
 GCCTAACAGACCAATTAATTTGGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGTCTTATGTAACAACAGTACTGGAATATGGGAGTTTTGGCC
 GGCCAGCATCAACCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGTCAATCAGCTTTTGGTGTATCTCTGGGAG
 ACAGAAGCAGATACTTCAGCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGTATGATCCCGATGTTTGGTATTATTGAAAATCATGGCGTCGAGGA
 TGAATGCTTAATTAATGTTTTCTCTGGATGGCATAGGACAGGGAAACAAATATCAAGGCATTAACCTTAGAGACACTGCATGGGAC
 AAAGTGATAATGTTTTCTAAATCTAATGAAATAGCCATAGGCAACCAAGGCTATGGAATTAATATCCAAGTAACTTTGGAGAA
 GTTTTCTGACTTCAAACTGAATGTTGACTTCCAGATGTTTACAAGTACACGCAACTAACATTACTCTGCCCGCCAAACACAAAC
 CTATGAGTACATGAACGGGCGAGTGGTATCCCATCTCTGGTTGATTACATACATCAACATTGGCGCCAGGTTGGTCTCTTGGCCAAATG
 GACAATGTGAATCCATTCAACCACCACCGCAATGCTGGTCTGCGCTACCGGTCATGCTTCTGGGCAATGGTCTGTTATGTCCTTTCC
 ACATACAAGTGCCTCAAAAATTTCTTGTCTGCAAGAACCTACTTCTTACTCTGGCTCTACACCTATGAGTGGAACTTCAAGAAAGGA
 TGTGAACATGGTCTGCAAGTTCCTTGGAAATGACCTCAGAACAGTGGTGTACCATAAGTTTACCAGTACTTCAAGTACTGATGCTG
 ACCTTCTTCCCATGGCTCACAAACAGCTTCCACCCTTGAAGCCATGCTGCGCAACGATACCAATGATCAGTCAATTCAACGACTACC
 TCTCTGAGCTAACATGCTTTACCCATCCCTGCAATGCAACCAACATTCCAATTTCCATCCCATCTTGAACCTGGGCAAGCTTCAAG
 GGGCTGGTCTTTCACAGACTCAAAAACCAAGAAAGCTCCATCTCTTGGATCAGGGTTGATCCCTACTTCTGTTTATTCTGGATCTATT
 CCTACTCTGGATGGCACTTTTACCTTAACCACACTTTCAAGAAGGTCTCCATCATGTTTGGTCTCCTCAGTCACTGGCTGGCCATG
 ACAGGCTGTTGCTTCAAAATGAGTTTGAATCAAGCCACTGTGGATGGGAAAGGATACAATGTTGGCCCAACTGCAACATGACCAAGA
 CTGGTCTCTGGTTCAGATGCTTGCCTACAACATTGGCTACCAGGGCTTTTACATCCCTGAGGGATAACAAGATCGCATGTACTCC
 TTTTTCAGAACTTCCAGCCTATGAGCAGGCAAGTGGTGTATGAGGTTAATTAACACTGACTACAAAGCCGTCACCTTACCATATCAAC
 ACAAACTCTGGCTTTGTAGGATACCTTGGCCTACTATAAGACAAGGGAACTTACCAGCCAATTTCCATCCCTCAGGCTCAGG
 AACTACTGCGGTTAAAAGTGTACCCAAAAGTTCCTGTCGACAGGACCATGTGGCGCATACCGTTCTCCAGCAACTTCAATGCTC
 ATGGGAGCCCTTACGGACCTGGGACAGAACCTGCTCTATGCCAACTCGGCCATGCGCTGGACATGACTTTTGGAGTGGATCCCATGG
 ATGAGCCACCCCTGCTTTATCTTTTGAAGTCTTCGACGTGGTTCAGAGTGCACAGCCACACCGGGCGTATGAGGGCGTCTA
 C

1999

>BA1-99

TCCGGGTCTGGTCCAGTTCGCGCCGTGCAACAGACACCTACTTCAGTATGGGAAACCAATTTAGAAACCCACAGTGGCGCCACCAC
 GATGTGACCACCGACCGTAGCCAGGACTGATGCTGCGCTTCGTGCCGTTGACCGGGAGACCAATACATACTTTACAAGTGGCT
 ACACCTCTGCGCTGGGCGACAGAGTGTGACATGGCCAGCACATTTTGAATTAGGGGGTCTTATGATAGAGGCTTAGCTT
 CAAGCCATATTCGGGACAGCTTACAATTCATGGCTCCTAAGGGCGCGCTAACACATCTCAGTGGATAGTTACAACGGGAGAAGAC
 AATGCCACCACATACATATTGGAATGCTTCCAGGAAGGGAGACAATATAAGGAAGTTTAGAAATGGGAAAGACATTAAGT
 CAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAACATACAGCCAGAGCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATATTGATGGAACAAA
 TGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTTTAAACAGCTATAAAATGAAAGCCATGCTACGGGCTTATGCAAGACTACAACACTGAAACAAAAGG
 GGCCAGCTAAAAACAGAAAAGTAAAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAGACTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAATTTTTGATGGTA
 GAGAAGTCTGACGCTTTTTGCGCTGAAATTTGCTTTACACGGAAATGTCAATTTAGAAACTCCAGACAGCCATGTAGTTTACAA
 GCCAGGAACCTCTGATGATAACTCTCATGCAAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCTTAAACAGCCATAACAGACCCAAATTAATTGGCTCAGGATAAC
 TTTGATGGCCTAATGATAACAACAGTACTGGAAATGAGGATTTGGCTGGCCAAAGCATCAACAAGCTGAAAGTGGTCTGATTTG
 AGGCCAGAAACCTTGGACTGTCAAACAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATCTTCAGCATGTGGAATCAGGCTGT
 GGACAGCTATGATCCCGATGTTTCTGATTTATTGAAAATCATGGCGTCGAGGATGAACTGCCTAATTAATGTTTTCTCTGGATGGCATA
 GGACCAGGAAACAAATCAAGGCATTAACCTAGAGACACTGCATGGGAAAAGATACTAAAGTTTCTACAGCTAATGAAATGACCA
 TAGGCAACACTCTGGCTATGGAAATTAATATCAAGCTAATCTTTGGAGAAGTTTTCTGACTCCAATGAGTGGCTTTGTTACTTCCAGA
 TGTTTACAAGTACACGCAACTAACATTAATCTGCCCCGTAACCAACACCTATGAGTACATGAACGGGCGAGTGGTTTTCCCATCT
 CTGGTCTGATCATACTCAACATTGGCGCCAGGTTGGTCTTTCAGCCAAATGGACAATGTGAATCCATTAACCAACCGCAATGCTG
 GCCTACGCTACCGGTCATGCTTCTGGCAATGGCCGTTATGTGCTTTCCACATACAAGTGCCTCAAAAATTTCTTGTCTGCAAGAA
 CCTACTTCTTACTCTGGCTCCTACACCTATGATGGAACTCAGAAGGATGTGAACATGGTCTGCAAGTTCCCTTGGAAATGAC

CTCAGAACAGATGGTGCTACCATAAGTTTACCAGGATCAACTCCTATGCCACCTTCTTCCCATGGGTCAACAACCCGGTTCAAATC
 TTGAAGCCATGCTGCGCAACGATACCAATGATCAGTCAATTCAACGACTACCTCTCTGCAAGGTAACATGCTTTACCCCATCCCTGCCAA
 TGCAACCAACATTCCAATTTCCATCCCATCTCGCAACTGGGCAGCCTTCAAGGGCTGGTCTTCACTAGGCTCAAAACCAAGGAGACT
 CCATCTCTTGGATCAGGGTTTCGATCCCTACTTTCGTATATTCTGGATCTATTCCCTACCTGGATGGCACCTTTTACCTTAAACCACTT
 TCAAGAAGGTCATCATGTTGACTCCTCAGTCACTGGCCTGGCAATGACAGGCTGTGTCTCCAAATGAGTTTGAATCAAGCG
 CACTGTGGATGGGAAGGATACAATGTGGCCCAATGCAACTGACCAAAAGACTGGTTCCTGGTTCAGATGCTTCCCACTACAACATT
 GGCTACCAGGGCTTTTACATCCCTTGGGAATACAAGGATCGCATGTACTCCTTTTTTCCAGAACTTCCAGCCTATGACCAGCCAGTTGT
 TTGATGAGGTTAATTACTGACTACAAGCCGCTCACCTTACCATATCAACACAACAACCTCTGGCTTTGTAGAATACCTTGGCCCTAC
 TATGAGACAAGGGGAACCTTACCAGCCAATTATCCATACCCGCTCATCGGAACTACTGCCGTTAAAAGTGTACCACAAAAAGTTC
 CTGTGCGACAGGACCATGTGGCGCATACCGTTTCCAGCAACTCATGTCCATGGGAGCCCTTACGGACCTGGGACAGAACCCTGCTCT
 ATGCCAACTCGGCCATGCGCTGGACATGACTTTTGGAGTGGATCCCATGGATGAGCCACCCTGCTTTATCTTCTTTTTCGAAGTCTT
 CGACGTGGTCAGAGTGACCAGCCACCGCGCGCTCATCGAGCCGCTCTACCTGCGCACACCGTCTCGGCCGGCAAGCCACCACA
 T

>BA4-99

GCTTGATAGAGGTCCTAGCTTCAAGCCATATTCCGGCAGCTTACAATTCACTGGCTCCTAAGGGCGCGCCTAACACATCTCAGTGG
 ATAGTTACAACGGGAGAAGACAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTACTAAGGAAGGTTTAG
 AAATTTGGAAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCATTATGCGCATAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAAATCATG
 GACTGATTTGATGGAACAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTTAAACCAGCTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGTCTTTTGCA
 AGACCTACAACATAAAAAGGGGGCCAAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCAGATATTG
 ATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTCGCCTGAAATGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAACCTCC
 AGACAGCCATGTGGTATACAAGCCAGGAACCTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCTTAAACAGACCAAT
 TACATTTGGCTTTCAGGATAACTTTGTAGGCTTATGTACTACAACAGTACTGGAATAATGGGAGTTTTGGCCGGCAAGCATACAAC
 TGAATTCAGTGTGACTTTCAGATGTTTCCAGGACAGAACTGAACTGTCACTAGCTTTTGGTGTGATTCTCTGGGAGACAGAACCAGATCTT
 CAGCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGATCCCGATGTTTCGTATTATTGAAAATCATGGCGTGGAGGATGAACTGCCTAATTAC
 TGTTTTCTCTGGATGGCATAGGACAGGGAAACAAATATCAAGGCATTAACCTTAGAGACACTGCATGGGAAAAGATACTAAAGTTT
 CTACAGCTAATGAAATAGCCATAGGCAACAATCTGGCTATGGAATTAATATCAAGCTAATCTTTGGAGAAGTTTTCTGTACTCCAA
 TGTGGCTTTGACTTCCAGATGTTTACAAGTACACGCCAACTTAACTTACTCTGCCCGCTAACCAACACTATGAGGATGAACTGAAAC
 GGGCGAGTGGTTTCCCATCTCTGGTTCGATTCATACATCAACATTGGCGCCAGGTGGTCTCTTGACCCAATGGACAATGTGAATCCAT
 TTAACCAACCAGCAATGCTGGGCTACGCTACCGGTCATGCTTCTGGGCAATGGCCGTTATGTGCCTTTCCACATACAAGTGCCTCA
 AAAATCTTTGCTGCAAGAACCTACTTCTTCTACCTGGCTCTACCTATGAGTGGAACTTCAAGAAGGATGTGAACATGGTCCCTG
 GAAAGTTCTTGGAAATGACCTCAGAAAGTGTGGTGTGACTGACTTACAGGATCAATCTCTAGTCCACTTCTCCCATGG
 GTCACAACACAGGTTCAACTCTTGAAGCCATGGTGGCAGCAACGATACCAATGATCAGGATTCAACGAATACCTCTCTGAGCTAACAT
 GCTTTACCCCATCCCTGCCAATGCAACCAACATTTCCATTTCCATCCCATCTGCAACTGGGCAAGCTTCAAGGGCTGGTCTTACC
 AGACTCAAAACCAAGAAGACTCCATCTCTGGATCAGGGTTCGATCCCTACTCTGTTTTATTCTGGATCTATTCCCTACTGGATGGCA
 CTTTTTCTTAAACCACTTCAAGAAGTCTCCATCATGTTGACTCCTCAGTCACTGGCCTGGCAATGACAGCTTGTGTCTCC
 AAATGAGTTTGAATCAAGCGCACTGTGGATGGGAAAGGATACAATGTGGCCCAATGCAACATGACCAAGACTGGTCTCTGGTTTCAG
 ATGCTTGCCAACATAACAATTGGCTACAGGGCTTTTACATCCCTGAGGGATAACAAGGATCGCATGTACTCCTTTTTAGAAAATTC
 AGCCTATGAGCAGGCGGTTGATGAGGTTAATTACTGACTACAAAGCCGTCACCTTACCATATCAACACAACAACCTCTGGCT
 TGTAGGATACCTTGGCCTACTATGAGACAAGGGGAACCTTACCAGCCAATATCCATACCCGCTCATCGGAACACTGCGGTTAAA
 AGTGTTACCAGAAAAGTTTCTGTGGCAGCAAGACTGTGGCGCATGCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGAGCCCTTACGG
 ACCTGGACAGAACCTGCTCTATGCCAACTCGGCCATGCGCTGGACATGACTTTTGGAGTGGATCCCATGGATGAGCCACCCTGCT
 TTATCTTCTTTTCGAAGTCTTTCGACGTGGTCAGAGTGCA

>BA496-99

GATACCTGAGTCCGGTCTGGTGCAGTTCGCCCGTGCAACAGACACCTACTTCAAGTATGGGGAACAAATTTAGAAAACCCACAGTGGC
 GCCCACCACGATGTGACCACCGATCGTAGCCAGCGCTGATGCTGCGCTTCTGTCGCCGTTGACCGGGAAGACAATACCTACTCTTAC
 AAAGTTCGCTACACGCTGGCTGTAGGCGACAACAGAGTGTGATGATGGCCAGCACATCTTTGACATTCGGGGGGTGGCTGATAGAG
 GTCCTAGCTTCAAGCCATATTCGGCACAGCTTACAATTCAGTCTCTAAGGGCGCGCCCAATACATCTCAGTGGATAGTTACAAC
 GAATCGAGACAATGAGTAACACTACCACAACAACATTTGGCATTGCTTCCATGAAGGGAGACAATTTACTAAAGAGGTTTGCAA
 ATTGGGAAAGACATTACCGCAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAAATCATGGA
 CTGATACCTGATTAACAAAATGAAAAGTTTGGTGAAGAGCCCTTAAACCAGCTACCAACATGAAGCCATGCTACGGGTCTTTTGAAG
 AACTACAACATAAAAAGGGGGCAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAAACCAACCGAAGGAGGGGTTGAAACTGAGGAACAGATATTGAT
 ATGGAATTTTTGAGTGGTAGAGAAGTCTTGCAGACTTACGCTGAAATTTGCTTTTACGGAAAATACCGGCATCGAGATGACTGCTAATTA
 ACAGCCATGTAGTTTACAAGCCAGGAACCTTCTGATGATAACTCTCATGCAAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCCTAACAGACCCAATTA
 CATTGGCTTCAAGGATAACTTTGTAGGCTAATGTACTACAACAGTACTGGAATATGGGAGTTTGGCTGGCAGCAATCACAACCTG
 AATGCACTGGTGTGACTGACAGGACAGAAACACTGAACTGTATCATGCTTTTGGCTGATTCTCTGGGAGACAGAACCAGATACCTCA
 GTATGTGAAACCAAGCTGTGGACAGTTATGATCCGATGTGTCATTTTGAATTTGAAAATACCGGCATCGAGATGACTGCTAATTA
 TTTTCTCTGGATGGCATTATCAAGCATTAAAGTATCAAGGCATTAATGTAAAATCAATGCATGGGCAAAAGATGCTAATGTTGCT
 ACAGCTAATGAAATAGCCATAGGAAACAACACTAGGCTATGGAATTAATATCAAGCTAAACTTTGGAGAAGTTTCTGTACTCCAATG
 TGGCTTTGACTCTCCAGATGTTTAGAACTAAACATTCATAACATTAATCTGCCCCCAACCAACACCTATGAGTACATGAACGG
 GCGAGTGGTATCCCATCTCTGGTGTATTATACATCAACATTTGGCGCCAGGTGGTCTCTTGACCAATGGACAATGTGAATCCATTC
 AACCAACACCGCAATGCTGGTCTGCGCTACCGGTCATGCTTCTGGGCAATGGTCTGTTATGTGCCTTTCCACATACAAGTGCCTCAA
 AATTCTTTGCTGTCAAGAACCTACTTCTTCTACCTGGCTCTACACCTATGAGTGGAACTTCAAGAAAGATGTGAACATGGTCTGCA
 AAGTTCCCTTGGAAATGACCTCAGAACAGATGGTGTACCATAAGTTTACCAGCATCAATCTGTATGCCACCTTCTTCCCATGGCT
 CACAACACAGTTTCCACCTTGAAGCCATGTGCGCAACGATACCAATGATCAGTCAATTCAGCACTACCTCTCTGAGCTAACATGCT
 TTTACCCCATCCCTGCCAATGCAACCAACATTTCCAATTTCCATCCCATCTCGCAACTGGGCAACCTTCAAGGGTGGTCTTACCAG
 GCTAAAACCAAGAAGACTCCATTTTTTGGATCAGGGTTTGAATCCATTTTGAATATTTCTGGATCTATCCCTACCTGGATGGCCCC
 TTTTACCTTAAACCACTTCAAGAAGTCTCCATCATGTTGACTCCTCAGTCACTGGCCTGCAAAATGACAGGCTGTTGAGCCCCAA
 ATGAGTTTGAATCAAGCGCACTGTGGACGGGAAGGATAACAAGTGAACCAATGCAACATGCAACAAAGACTGGTCTTCTAGTTAGAT
 GCTTGCCAACTACAACATTGGCTACCAGGCTTTTACATCCCTGAGGGATAACAAGGATCGCATGTACTCTTTTTTCCAGAACTTCCAG
 CCTATGAGCAGGCGGTTGATGAGGTTAATTACTGACTACAAGCCGCTCACCTTACCATAACCAACAACACTCTGGCTTTG
 TAGGTAACCTGACACTACTATGAGACAAGGGGAACCTTACCAGCCAATTTACATACCCGCTCATCGGAACACTGCTCCGTTAAGAG
 TGTACCAGAAAAGTTTCTGTGCGACAGGACCATGTGGCGGATCCCTTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGAGCCCTTACGGC
 CTGGGACAGAACATGCTCTATGCCAACTCAGCCCATGCGCTGGACATGACTTTTGGAGTGGATCCCATGGATGAGCCACCCTGCTT
 ATCTTCTTTTCGAAGTCTTTCGACGTGGTCAGAGTGCA

>BA501-99

CCTGAGTCCGGTCTGGTGCAGTTCGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAATCTGGGAAATAAGTTTAGAAAATCCACCGTAGCGCCG
 ACCACGATGTGACCACCGATCGTAGCCAGCGCTCATGTTGCGCTTCTGTCGCCGTTGACCGGAGGACAATACATACTTTACAAAG

TGCGGTACACACTGGCCGTGGGCGACAACAGAGTGTGGATATGGCCAGCACGTTCTTTGACATTAGGGGCGTGTGGACAGAGGTCC
CAGTTTCAAACCTATTCTGGTACGGTTTACAACCTCTCTGGCTCCTAAAGGCGCTCAAATACATCTCAGTGGAT

>BA991-99

CTAGCTTCAAGCCATATTCCGGCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCGCCCTACACATCTCAGTGGATAGTTACACCGGG
AGAAGACAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTACTAAGGAAGGTTAGAAATTTGGAAAGAC
ATTACTGCAGACTACAAGCCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATAGTATG
GAACAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGCTACTTAAATGAAGCCATGTCTACGGGTCTTTTGCAAGACCTACAAACAT
AAAAGGGGGCCAAGCTAAAACAGTAAAGTAACACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAATTTTTC
GATGGTAGAGAAGCTGTGACGCTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAATCCAGACAGCCATGTGG
TATACAAGCCAGGAATCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCCTAACAGACCAATTAACATTTGGCTTCAG
GGATAAATTTGTAGGCTTATGTACTACAGCTACTGAAAATATGGGATTTGGCCGGCCAAGCATCACTCTGAATGTCAGTGGTT
GACTTGCAGGACAGAAACTGAACTGTATATCAGCTTCTGCTTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTACGATGTGGAATC
CGACTGAGGACAGTTATGATCCCGATGCTCGTAATATTGAAAATCATAGCATCG

>BA1325-99

GCTTGATAGAGGCTTAGCTTCAAGCCATATTCCGGCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCGCCTAACACATCTCAGTGG
ATAGTTACAACGGGAGAAGACAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTACTAAGGAAGGTTAG
AAATTTGGAAAGACATTACTGCAGACAACAGCCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATG
GACTGATATTGATGGAACAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGCTACTAAAATGAAGCCATGTCTACGGGTCTTTTGCA
AGACTACAACATGAAAGTGGTTCAGGACAAAACACTGAACTGGCATATCAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGAAACAGATAATTG
ATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAATCC
AGACAGCCATGTGGTATACAAGCCAGGAACTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCCTAACAGACCAAT
TACATTTGGCTTCAAGGATAACTTTGTAGGCTTATGTACTACAACAGTACTGAAAATATGGGAGTTTGGCCGGCCAAGCATCAACA
TGAATGCATGGTTGACTTGCAGGACAAAACACTGAACTGGCATATCAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGAAACAGATACTT
CAGCATGTGGAATCAGGCTGGGACAGCTATTATCCCGATGTTGCGATTATTGAAAATCAGGCATCGAGGATGAACTGCCTAATTAC
TGTTTTCTCTGGATGGCATAGGACCAGGACCAAATATCAAGGCATTAACCTAGAGACACTGCATGGGAAAAGATACTAAAGTTT
CTACAGCTAATGAAATAGCCATAGGCAACAATCTGGCTATGGAATTAATATCCAAGCTAATCCTTGGAGAAGTTTCTGTACTCCAA
TGTGGCTTTGACTTCCAGATGTTTACAAGTACAGGCCAACTAACACTACTCTGCCGCTAACACCAACCTATGATGATCAATGAAC
GGCGAGTGGTTTTCCCATCTCTGGTTCGATTCATACATCAACATTTGGCCAGGTGGTCTCTTGACCAATGGACAATGTGAATGCAG
TTAACCCACCAGCAATGCTGGGCTACGCTACCGGTCATGCTTCTGGGCAATGGGCGTTATGTGCTTTCCACATACAAGTGCCTCA
AAAATTTCTTTGCTGTCAAGAACCTACTTCTTCAACTGGGCTCTACCTATGATGGAATTCAGAAAGGATGTGAACATGGTCTCG
CAAAGTTCCCTTGGAAATGACCTCAGAACAGATGGTGTACCATAGTTTACCAGGATCAAATCTATGGCACCTTCTTTCCCATGG
GTCAAAAACGGGTTCAAATCTTGAAGCCATGCTGCGCAAGCATGATCAAGTATTCAAGCTATTCAACGACTACTCTCTGAAGCTAACAT
GCTTTACCCCATCCCTGCCAATGCAACCAACATTCAAATTTCCATCCATTCTCGCAATTTGGGCAGCCTTCAAGGGCTGGTCTTACC
AGACTCAAACCAAGGAGACTCCATTTCTGGATCAGGGTTCGATCCCTACTCTGTTTTATTCTGGATCTATTCCCTACCTGGATGGCA
CTTTTACCTTAAACCACTTTCAAGAAGGTCTCCATCATGTTTACTCTCAGTCACTGGCCTGGCAATGACAGGCTGTTGTCTCC
AAATGAGTTTGAATCAAGCGCACTGTTGATGGGAAAGGATACAATGTGGCCAAATGCAACATGACCAAAGACTGGTCTCTGGTTTCCAG
ATGCTTGCCAACTACAACATTTGGCTACCAGGCTTTTACATCCCTGAGGGATACAAGGATCGCATGTACTCTTTTTCAGAACTTCC
AGCCTATGAGCAGGCGAGTGGTTGATGAGGTTAATTACTGACTACAAAGCCGTACCTTACCATATCAACACAACAACTCTGGCTT
TGTAGGATCACTTGGCCTACTATGAGACAAGGGAACTTACCAGCAATATCCATAACCGCTCATCGAACTACTGCCGTTAA
AGTGTATCCCAAAAAGGTTCTGTGCGCAGGACCATGTGGCGGCACTTCCAGCACTTCCAGCACTTCAAGTCCAGGAAATTTGGGA
ACCTGGGACAGAACCTGCTCTATGCCAACTCGGCCATGCGCTGGACATGACTTTTGGAGTGGATCCCATGGATGAGCCACCTGCT
TTATCTTCTTTTGAAGTCTTGCAGTGGTGCAGAGTGCACCAGCCACCGCGGCTCATCGAGGCCGTCTACTGCGCACACCGGTT
TCGGCCGGCAACGCCACCACATAAG

>BA1390-99

AGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATACTGATGGAACAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGCTACTAAAAT
GAAGCCATGCTACGGGCTTTTTGCAAGACCTACAATAATAAAAGGGGCAAGCTAAAACAGAAAAGTAACACCAACCGAAGGAGAT
GTTGAAGCTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGTGACGCTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACA
CGGAAAATGCTCAATTTGGAACCTCCAGACAGCCATGTGGTATAAAGCCAGGAACTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAAATTTGGGTCA
ACAAGCCATGCCTAACAGACCAATTTACATTTGGCTTCAAGGATAAATTTGTAGGTTCTTATGTACTACAACAGTACTGGAATTTGGGA
GTTTTGGCTGGCCAAGCATCACACTGTATGCAGTGGTTGACTGCGCAGGACAGAAACACTGAACTGTATATCAGCGATAGCGTGATT
CATTGGGAGACAGGAGCAGATACTTACGAGGGGAAATCAGGCTGTAGAGAGCTATTATCGCGATATAGGGATC

>BA1419-99

ACCTGAGTCCGGTCTGGTGCAGTTCGCCCCTGCAACAGACACCTACTTCAAGTATGGGGAACAAATTTAGAAACCCACAGTGGCGCC
CACCCAGATGTGACCACCGACCGTAGCCAGCGCTGATGCTGCGCTTCTGTCGCGTTGACCCGGGAGACAATACTACTCTTACAAA
GTTTCGCTACACGCTGGCTGTAGGCGACAACAGAGTGTGACATGGCCAGCACATTTCTTGGACATTGGGGGGTGTGATAGAGGTC
CTAGCTTCAAGCCATATTCCGGCACAGCTTACAAT

>BA2972-99

GGCCACCCCTCGATGATCCCCAATGGGCAAAAATGCACATCGCCGACAGGATGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGTCTGGTGCAG
TTCGCCCCTGCAACAGACACCTACTTCAAGTATGGGGAACAAGTTTAAAGCCACAGTGGCGCCACCCACGATGTGACCACGGACC
TAGCCAGCGACTGATGCTGCGCTTCTGTCGCGTTACCCGGGAGGACAATACATACTTTACAAGAGTCCGGTACACCTCGCCGTTGG
CGACAACAGAGTGTGACTTGCAGCACATTTCTTGAATGAGGGGGTGTGATAGAGGCTTACTGCTCAAGCCATATTCCGGC
ACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCCCTAACACATCTCAGTGGATAGTTACAACGGGAGAAGACAATGCCACCACATACA
CATTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTACTAAGGAAGGTTAGAAATTTGGAAAGACATTAAGTGCAGACAACAAGCCAT
TTATGCCGATTAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATATTGATGGAACAAATGAAAAATTTGGAGGT
AGAGCTCTTAAACCAGCTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGCTTTTGGCAAGACCTACACATA

>BA3106-99

ACCCAATTACATTTGGCTTCAAGGATAAATTTGTAGGTTTATGTACTACAACAGTACTGGAATATGGGAGTTTGGCCGGCCAAGCA
TCACAATGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGTATATCAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCA
GATACTTCAAGCATG

>BA3150-99

GCCAGATATTGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGTGACGCTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAAT
TTGGAATCCAGACAGCAGCTGTGGTATACAAGCCAGGAATCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCCATA
ACAGACCAATTAATTTGGCTTCAAGGATAAATTTGTAGGCTTATGTACTACAACAGTACTGGAATTTGGGATTTGGCCCGGCCA
AGCATACAACCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGTATATCAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGA
AGCAGATACTTCAAGCATGTGGAATCAGCCTGTGGACAGTTATGATCCCGATGTTCTGATATTATTGAAAATCA

>CONS3187-99

TCGCCGGACAGGATGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGTGCAGTTCGCCCGTGCAACAGACACCTACTTCAGTATGGGGAAACAA
GTTTAGAAAACCCACAGTGGCGCCACCACAGATGTGACCACCGACCGTAGCCAGCGACTGATGCTGCGCTTCGTGCCCGTTGACCGG
GAGGACAATACATACTCTTACAAAAGTGGCGTACACCCTCGCCGTGGGGGACAACAGAGTGTGACATGGCCAGCACATTCTTTGACA
TTAGGGGGGTGCTTGATAGAGGTCCTAGCTTCAAGCCATATTCGGGCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCCCTAACAC
ATCTCAGTGGATAGTTACAACGGGAGAAGACAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTACTAAG
GAAGGTTTAGAAAATTGGGAAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAG
AAGAATCATGGACTGATATTGATGGAACAAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGTACTAAAATGAAGCCATGCTACGG
TTCTTTTGCAAGACCTACACATATAAAAGGGGGCCAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAGACTGAGGAG
CCAGATAATTGATATGGAATTTTTTGTGGTACAGAAGCTGCTGACGCTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTACACGGAAAATGTCATTT
TGGAACTCCAGACAGCCATGTGGTATACAAGCCAGGAACCTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAGCCATGCCCTAA
CAGACCCAAATACAGCTTCCAGGGATAAATTTGTAGTCTTATGTACTACAACAGTACTGGAAATATGGGAGTTTGGCCGGCCAA
GCATCACAACCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAAACCTGAACTGTATATCAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGAA
GCAGATACTTCAAGTATGGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGATCCCGATGTTGCGATTATTGAAAATCATGGCCAGCATGAACT
GCCTAATTAAGTCTTCTCTGGATGGCATAGGACCAGGGAACAAATCAAGGCATTAACCTAGAGACACTGCATGGGAAAAAGAT
ACTAAAGTTTCTACAGCTAATGAAATAGCCATAGCCAACTGCGGCTATGGAAATTAATATCCAAGTAACTTTGGAGAAATTTTC
TGACTCCAATGTGGCTTTGTACTTCCAGATGTTTACAAGTACAGCCAACTAACATTAATCTGCCCCGCTAACACCAACCTATGA
GTACATGAACGGGCGAGTGGTTTCCCCATCTCTGGTTCGATTACATATCAACATTTGGCCAGGTTGGTCTCTTGACCCAAATGGACAAT
GTGAATCCATTTAACACCACCAGCAATGCTGGCTACGCTACCGGTCATGCTTCTGGGCAATGGCCGTTATGTGCCTTTCCACATAC
AAGTCCCTCAAAAATTTCTTGTGTCAAGAACCTACTTCTTACCTGGCTCTTACACCTATGAGTGGAACTTCAGAACGGATG

>BA3434-99

TTTTTTGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTTCGCCCTGAAATTTGTCGTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAAACTCCAGACAGCC
ATGTGGTTTACAAGCCAGGAACCTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAGCCATGCCTGACAGACCCAAATTACATTGG
CTTCAAGGATAAATTTGTAGGCTTATGTACTACAACAGTACTGGAAATATGGAGTTTGGCCGGCCAGCATCAACCTGAATGCA
GTGGTTGACTTGCAGGACAGAAAACCTGAACTGTATATCAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAAGCATGT
GGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGATCCC

2000

>BA3017-00

AGAGGTCTAGCTTCAAGCCATATTCGGGCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCGCCTAACACATCTCAGTGGATAGTTA
CAACGGGAGAAGACAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTAAGGAAAGTTTAGAAAATTGG
GAAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGAT
ATTGATGGAACAAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGTCTTTTGAAGACCTA
CAAAACATAAAAGGGGGCCAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCAGATTTTGTATGGA
ATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAAACTCCAGACAGC
CATGTGGTATACAAGCCAGGAACCTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAGCCATGCCTAACAGACCCAAATTACATTG
GCTTCAAGGATAAATTTGTAGGCTTATGTACTACAACAGTACTGAAATATGGGAGTTTGGCCGGCCAAGCATCACAACCTGAATGC
AGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAAACCTGAACTGTATATCAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAAGCATG
TGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGATCCCGATGTTGCTATTATTGAAAATCATGGCCCGAGGATG

2001

>BA6800-01

TTGATAGAGGTCCTAGCTTCAAGCCATATTCGGCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCGCCTAACACATCTCAGTGGAT
AGTTACAGCGGGAGAAGACAATGCCACCACATACACATGTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTAAGGAAAGTTTAGAA
ATTGGGAAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGA
CTGATATTGATGGAACAAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGTACTGAAATGAAGCCATGCTACGGGTCTTTTGAAG
ACCTCAAAAACATAAAAGGGGGCCAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCAGATAATTGAT
ATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAAACTCCAG
ACAGCCATGTGGTATACAAGCCAGGAACCTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAGCCATGCCTAACAGACCCAAATTA
CATTGGCTTCAAGGATAAATTTGTAGGCTTAAATGTACTACACAGTACTGAAATATGGGAGTTTGGCCGGCCAAGCATCACAACCTG
AATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAAACCTGAACTGTATATCAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCA
GCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGATCCCGATGTTGCTATTATTGAAAATCATGGCCCGAGGATG

2002

>BA148-02

CCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTAAGGAAAGTTTAGAAAATTTGGGAAAGACATTACTGCAGA
CAACAAGCCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATATTGATGGAACAAAATGAA
AAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGTCTTTTGAAGACCTCAAAAATAAAAGGGGGCC
AAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGA
AGCTGCTGACGCTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAAACTCCAGACAGCCATGTGGTATACAAGCCA
GGAACCTTCAAGTGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAGCCATGCCTAACAGACCCAAATTAATTTGGCTTCAAGGATAAATTTG
TAGGCTTATGTACTACAACAGTACTGAAATATGGGAGTTTGGCCGGCCAAGCATCACAACCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGA
CAGAAAACACTGAACTGTATATCAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAAGCATGTGGAATCAGACTGTGGAC
AGTTATGATCCCGATGTTGCTATTATTGAAAATCA

>BA1924-02

GGGGGGTGTGATAGAGGTTCTAGCTTCAAGCCATATTCGGGCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCGCCTAACACATC
TCAGTGGATAGTTACAACGGGAGAAGACAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTAAGGAA
GGTTTAGAAAATTTGGGAAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAG
AATCATGGACTGATATTGATGGAACAAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGTCT
TTTTGCAAGACCTCAAAACATAAAAGGGGGCCAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCA
GATATTGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGG
AACTCCAGACAGCCATGTGGTATACAAGCCAGGAACCTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAGCCATGCCTAACAG
ACCCAAATTAATTTGGCTTCAAGGATAAATTTGTAGGCTTATGTACTACAACAGTACTGAAATATGGGAGTTTGGCCGGCCAAGCATCACA
TCAACCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAAACCTGAACTGTATATCAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCA
GATACTTCAAGCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGTTATGATCCCGAT

>BA2026-02

GGGGGGTGTGATAGAGGTTCTAGCTTCAAGCCATATTCGGGCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCGCCTAACACATC
TCAGTGGATAGTTACAACGGGAGAAGACAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTAAGGAA
GGTTTAGAAAATTTGGGAAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAG
AATCATGGACTGATATTGATGGAACAAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGTCT
TTTTGCAAGACCTCAAAACATAAAAGGGGGCCAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCA
GATATTGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGG
AACTCCAGACAGCCATGTGGTATACAAGCCAGGAACCTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAGCCATGCCTAACAG
ACCCAAATTAATTTGGCTTCAAGGATAAATTTGTAGGCTTATGTACTACAACAGTACTGAAATATGGGAGTTTGGCCGGCCAAGCATCACA
TCAACCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAAACCTGAACTGTATATCAGCTTTTGTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCA
GATACTTCAAGCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGTTATGATCCCGAT

GATATTGATATGGAATTTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGG
 AAATCCAGACAGCCATGTGGTATACAAGCCAGGAACCTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCCTAACAG
 ACCCAATTACATTGGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGTCTTATGTACTACAACAGTACTGGAAATATGGGAGTTTTGGCCGGCCAAGCA
 TCACAACGTAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGTATATCAGCTTTTGTCTGATTTCTCTGGGAGACAGAAGCA
 GATACTTCAGCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGATCCCGATGTTCTGATGATTGAAAATCA

>BA2169-02

GGGCGCGCTAACACATCTCAGTGGATAGTTACAACGGGAGAATACAATGCCACCACATACACATTTGCCATTGCTTCCACGAAGGGA
 GACTATATTACTAAGGAAGGTTTGAATAATGGGAAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAG
 AGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATATTGATGGAAACAAATGGAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTAAACCAGCTACTAAAAT
 GAAGCCATGCTACGGGCTTTTTGCAAGACCTACAACATAAAAAGGGGGCCAAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGAT
 GTTGAAGCTGAGGAGCAGATAATTGATATGGAATTTTTTCGATGGTAGAAGCTGCTGACGCTTTTTTCGCCTGAAATTTGGCTTTTACA
 CGGAAAATGTCAATTTGGAACTCCAGACAGCCATGTGGTATAACAAGCCAGGAACTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCA
 ACAAGCCATGCCTAACAGACCCAAATTACATTGGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGTCTTATGTACTACAACAGTACTGGAAATATGGGA
 GTTTTGGCCGGCCAAGCATCAAACTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGTATATCAGCTTTTGTCTGATT
 CTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAGCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGATCCCG

>BA2268-02

GTGGTTGTAGAGGTCCAGCTTCAAGCCATATTCGGACCAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTTAGGGCGCGCCTAACACATCTCAGT
 GGATAGTTACAACGGGAGAAGCAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTACTAAGGAAGGTTT
 AGAAATTTGGAAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCA
 TGGACTGATATTGATGGAAACAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGCTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGCTTTTTG
 CAAGACCTACAACATAAAAAGGGGGCCAAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCAGATAT
 TGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAACT
 CCAGACAGCCATGTGGTATAACAAGCCAGGAACTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCCTAACAGACCCA
 ATTACATTTGGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGTCTTATGTACTACAACAGTACTGGAAATATGGGAGTTTTGGCCGGCCAAGCATCACA
 ACTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGTATATCAGCTTTTGTCTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATAC
 TTCAGCATGTGGAATCAGGCTGT

>BA2687-02

GGGTGCTTGTAGAGGTCTAGCTTCAAGCCATATTCGGCCACAGCTTACAATTCAGTGGTCTTAAGGGCGCGCCTACACATCTCA
 GTGGATAGGTACAACGGGAGAAGCAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTACTAAGGAAGGT
 TTAGAAATTTGGAAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAAT
 CATGGACTGATATTGATGGAAACAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGCTACTTAAATGAAGCCATGCTACGGGCTTTTT
 TCAAGACCTACAACATAAAAAGGGGGCCAAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCAGAT
 ATTGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAAA
 CTCAGACAGCCATGTGGTATAACAAGCCAGGAACTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCCTAACAGACC
 CAATTACATTTGGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGTCTTATGTACTACAACAGTACTGGAAATATGGGAGTTTTGGCCGGCCAAGCATCA
 CACTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGTATATCAGCTTTTGTCTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATAC
 ACTTCAGCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGTTATGATCCCGATGTT

>BA2688-02

ATTTGGCTTTCCCTCCATGAAGGGAGACAATATTACTAAGGAAGGTTTGAATAATGGGAAAGACATTACTGCTGACTACAAGCCCAT
 TATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATATTGATGGAACAAATGAAAAGTTTGGAGGTA
 GAGCTCTTAAACCAGCTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGCTTTTTGCAAGACCTACAACATAAAAAGGGGGCCAAGCTAAAAACAG
 AAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCT
 TTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAACTCCAGACAGCCATGTGGTATAACAAGCCAGGAACTTCTGATG
 TAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCCTAACAGACCCAATTACATTTGGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGTCTTATGTA
 CTACAACAGTACTGGAAATATGGGAGTTTTGGCCGGCCAAGCATCACAACCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAA
 CTGTATATCAGCTTTTGTCTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAGCATGTGGAATCAGGCTGTGAAGAGTTATGATCCCG
 ATGTTCTGATTATTGAAAATCATAGCGTCCGTGATGAACTGCC

>BA2966-02

AGCCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATATTGATGGAACAAATGAAAAAT
 TGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGCTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGCTTTTTGCAAGACCTACAACATAAAAAGGGGGCCAAGCT
 AAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTG
 CTGACGCTTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAACTCCAGACAGCCATGTGGTATAACAAGCCAGGAACT
 TTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCCTAACAGACCCAATTACATTTGGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGT
 CTTATGTACTACAACAGTACTGAAATATGGGAGTTTTGGCCGGCCAAGCATCACAACCTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAA
 ACACTGAACTGTATATCAGCTTTTGTCTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAGCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGCTA
 TGATCCCGATGTTCTGATATTATTGAAAATCATGGCGTCCGAGGATGAACTGCCT

>BA3029-02

GAGGTCCTAGCTTCAAGCCATATTCGGCCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCGCCTACACATCTCAGTGGATAGTTAC
 AACGGGAGAAGCAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTACTAAGGAAGGTTTGAATAATGGG
 AAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATA
 TTGATGGAAACAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGCTACTAAAATGAAGCCATGCTAAGCCATGCTACGGGCTTTTTG
 CAAGACCTAC
 AAACATAAAAAGGGGGCCAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAA
 TTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAACTCCAGACAGCC
 ATGTGGTATAACAAGCCAGGAACTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCCTAACAGACCCAATTTACTATTGG
 CTTACAGGATAACTTTGTAGGTCTTATGTACTACAACAGTACTGGAAATATGGGAGTTTTGGCCGGCCAAGCATCACAACCTGAATGCA
 GTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGTATATCAGCTTTTGTCTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATAGTTTCAGCATGT
 G

>BA3037-02

GAGGTCCTAGCTTCAAGCAATATTCGGCCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCGCCTAACACATCTCAGTGGATAGTTAC
 AACGGGAGAAGCAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTACTAAGGAAGGTTTGAATAATGGG
 AAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCATTTATGCCGATAAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATA
 TTGATGGAAACAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTTAAACCAGCTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGCTTTTTGCAAGACCTAC
 AACATAAAAAGGGGGCCAAGCTAAAAACAGAAAAGTAAACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAA
 TTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTTCGCCTGAAATTTGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGGAACTCCAGACAGCC
 ATGTGGTATAACAAGCCAGGAACTTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCCTAACAGACCCAATTTACTATTGG
 CTTACAGGATAACTTTGTAGGTCTTATGTACTACAACAGTACTGGAAATATGGGAGTTTTGGCCGGCCAAGCATCACAACCTGAATGCA
 GTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGTATATCAGCTTTTGTCTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATAGTTTCAGCATGT

GTGGTTGACTTGCAGGACAGAACTGAACTGTTCATATCAGCTTTTGTCTTATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAGCATGT
GGAATCAGACTGTGGACAGTTATGATCCCGATG

>BA3270 - 02

TCAGGGATAACTTTGTAGGCTTATGTACTACAACAGTACTGAAAATATGGGAGTTTTGGCCGGCCAAGCATCAAACTGAATGCAGT
GGTTGACTTGCAGGACAGAACTGAACTGTTCATATCAGCTTTTGTCTTATTCTCTGGGAGACAGAA

>BA3282 - 02

TATAGGTCCTAGCTTCAAGCCATATTCGGGCACAGCTTACAATTCAGTGGCTCCTAAGGGCGCGCCTAACACATCTCAGTGGATAGTT
ACACCGGGAGAAGACAATGCCACCACATACACATTTGGCATTGCTTCCACGAAGGGAGACAATATTACTAAGGAAGGTTTAGAAATTG
GGAAAGACATTACTGCAGACAACAAGCCCATTTATGCCGATTAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGA
TATTGATGGAACAAATGAAAAATTTGGAGGTAGAGCTCTAAACCAGCTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGTCTTTTGCAGACCT
ACAAACATAAAAGGGGGCCAAGCTAAAAACAGAAAAGTAACACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCAGATATTGATATGG
AATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTCGCCTGAAATGTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGAAAATCCAGACAG
CCATGTGGTATACAAGCCAGGAACCTCTGATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCTAAACAGACCCAATTACATT
GGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGCTTATGTACTACAACAGTACTGGAAAATATGGGAGTTTTGGCCGGCCAAGCATCAAACTGAATG
CAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAACTGAACTGTTCATATCAGCTTTTGTCTTATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAGCAT
GTGGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGATCCCGATGTTTCG

>BA3387 - 02

GGCACAGCTTACAATTCAGGGTTCCTAAGGGCGCGCCCAATACATCTCAGTGGATAGTTACAACGGGAGAAGACAAGCCACCACAA
ACACATTTGGCATTTGCTTCCAGAAAGGGAGACAATATTACTAAGGAAGGTTTAGAAATTTGGGAAAGACATTACGGCAGACAACAGCC
AATTTATGCCGATAAAACATATCAGCCAGAGCCTCAAGTTGGAGAAGAATCATGGACTGATATTGATGGAACAAATGAAAAATTTGGA
GGTAGAGCTCTTAAACCAGCTACTAAAATGAAGCCATGCTACGGGTCTTTTGAAGCCTACAAACATAAAAGGGGGCCAAGCTAAAA
ACAGAAAAGTAACACCAACCGAAGGAGATGTTGAAGCTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGA
CGCTTTTTCGCCTGAAATTTGCTTTACACGGAAAATGTCAATTTGAAAATCCAGACAGCCATGTTGGTATACAAGCCAGGAACCTCT
GATGGTAACTCTCATGCAAATTTGGGTCAACAAGCCATGCTTAAACAGACCCAATTAACATTGGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGCTTA
TGTACTACAACAGTACTGAAAATATGGGAGTTTTGGCCGGCCAAGCATCAAACTGAATGCAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACAC
TGAACCTGTTCATATCAGCTTTTGTCTTATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAGCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGAT
CCCGATGTTCCGATTATTGAAAATCA

>BA3478 - 02

AGGAGATGTTGAGACTGAGGAGCCAGATATTGATATGGAATTTTTCGATGGTAGAGAAGCTGCTGACGCTTTTTTCGCTGAAATTTG
CTTTACACGGAAAATGTCAATTTGAAAATCCAGACAGCCATGTTGGTATACAAGCCAGGAACCTCTGATGGTAACTCTCATGCAAAT
TGGGTCAACAAGCCATGCTTAAACAGACCCAATTAACATTGGCTTCAGGGATAACTTTGTAGGCTTATGTACTACAACAGTACTGAAA
TATGGGAGTTTTGGCCGGCCAAGCATCAAACTGAAATGCAAGTGGTTGACTTGCAGGACAGAAACACTGAACTGTTCATATCAGCTTTG
CTTGATTCTCTGGGAGACAGAAGCAGATACTTCAGCATGTGGAATCAGGCTGTGGACAGCTATGATCCCGATGTTTCGATTATTGAA

Primers diseñados

1. ttggctgtggggtgaat (av1)
2. ttgagtgccagcgagaagagtttt (av2)
3. acagatcgtgcagcgtagg (av3)
4. agctgaaatggactgctgtgta (av4)
5. agatttatgtttactgctgatt (av5r)
6. tgggatggaccttggaccttag (av6)
7. attactcttgggtggggtcttgg (av7r)
8. ggaaccgcaaacactcact (av8)
9. ggatactgagacaccaccgacca (av9r)
10. gggatgtggccaggggtgtg (av10)
11. gggatgtggccaggggtgtcgg (av11r)
12. ggggaatgtttatgcttaccagt (av12)
13. atagggtgtcaggggaatgttt (av13r)
14. gccgcccgcctactgct (av14)
15. gctactgctgcccacaaccatc (av15r)
16. ctgtaaagggtgggattgaa (av16)
17. aaatctgtgagctgggacgggtg (av17r)
18. cctgtgcccgggagcatagttc (av18)
19. tggtagtttagggagcgacagc (av19r)
20. aggcgctctcccgaagtatag (av20)
21. gcagacctctctgttcgctgg (av21r)
22. ccgacccgagggagcgcagac (av22)
23. caaagaggctgctgctgtcccg (av23r)
24. cgaggaggattgatattgacagt (av24)
25. tggttcttctctgtccgctg (av25r)
26. attctgactgcccactccctattg (av26)
27. tcatctgccattctgaactgcca (av27r)
28. gctgtctgcacatagtca (av28)
29. agcatcccttctccactgg (av29r)
30. attgagcagcaggtatgagtg (av30)
31. gtgagagcatagttcagggcc (av31r)
32. tgaccagcatgaaggggattag (av32)
33. ctgtgcaggtatgagagccgat (av33r)
34. tacctcgcctctactatg (av34)
35. ccagacctgcccggcgag (av35r)
36. gacgacgcccgggtgacatcc (av36)
37. agacgcccgtgtagacca (av37)
38. gaccacagccccacgg (av38r)
39. aagttcagcgaagttg (av39r)
40. gcaactctctgcccgcctg (av40r)

41. ccatccccaagcatcatcctg (av41)
 42. ccgcatggcctggacaa (av42)
 43. caagaccgcccagccgact (av43r)
 44. tttgtcgcccagatgcatccagt (av44r)
 45. ctaggcggagcagtggtgtat (av45)
 46. caaggcggaggtgaggtg (av46)
 47. tgacctgatgacaatgcca (av47r)
 48. gtgggacccgaaactaa (av48)
 49. gaagacaaaatcaacacggcctac (av49r)
 50. atcctcatccgcccgcg (av50r)
 51. gttacaaggccctggg (av51r)
 52. caccgcatgaattggcttag (av52)
 53. gcaatcagcagtcagtgga (av53)
 54. agcaccatccactactaacctcc (av54)
 55. caatactaccctccaaaaccgg (av55r)
 56. taataataaaacatggaacaatac (av56)
 57. ttattcgccctagacaaagcaa (av57r)
 58. tgcaacaaaactaaaccaata (av58)
 59. ggtaactattatggtatgacaga (av59r)
 60. gcaaggcttattatgga (av60)
 61. ccactctgctccccgc (av61r)
 62. attcttatttctattctgccgt (av62r)
 63. ttgcggcactcttagcctattt (av63)
 64. acaaccttactgctcctgcca (av64r)
 65. cgactcgcccaactacgcatcc (av65)
 66. atttctcccagcagcacctcact (av66)
 67. gaagatgaaagcacctcccaacac (av67r)
 68. taaaactggagccctgctcactgc (av68r)
 69. ggaatacaggagttgcccagaag (av69r)
 70. ccgaatggcaggaagt (av70)
 71. tgattgcccgcgaagaagtacc (av71)
 72. tggcggctcagaggtt (av72r)
 73. ttacgctgcaaaatctacaag (av73)
 74. caagatcatcgctcagggtcaaga (av74r)
 75. tggagactgatggcacaacc (av75)
 76. ccggcctcatctggacgaatagc (av76r)
 77. cggaagccggtgctcagc (av77)
 78. gtccggtcctgattactcttcc (av78)
 79. ggcatgactccccacaaac (av79r)
 80. ctactgaggaggagag (av80)
 81. gatcctctctctccgcagta (av81r)
 82. atgcccagacctaatgac (av82)
 83. attctatcggccttcttcttcc (av83r)
 84. ccccatgatcccaggctctct (av84r)
 85. tctgacgaaggaggagac (av85r)
 86. cgccggcggcccaccatta (av86)
 87. atctgcccagtaataaac (av87)
 88. cacaaactccgcccagccatcat (av88r)
 89. gccgctgctcaagaata (av89r)
 90. atggcaagcgtagtagaataac (av90)
 91. tgcggaaccttgactcactgc (av91)
 92. gcaaggaggcagcggcaacatt (av92r)
 93. aagcaattgcgggtggtttt (av93)
 94. gtgcggagccaaggatgaaaaat (av94r)
 95. accaggctgtgcagaaaaagalaa (av95)
 96. ccagtcgcccagcagggtca (av96)
 97. cctggctacggcagctggttc (av97r)
 98. gctgctgtgacggcgtgtaagac (av98r)
 99. taggagccaggaggtgtaagc (av99r)
 100. gcggcatcatcaggcagctca (av100)
 101. ttccagcglatacagcggctct (av101r)
 102. gaccgctgtattacgtggaaaaa (av102)
 103. ttccgaaltcaagtggaacc (av103r)
 104. gaatgacccgaggcagtgatacg (av104)
 105. gcacagccgcatcattcacac (av105)
 106. caatgacgcccgtgctgt (av106r)
 107. tatccagcctgtactctccat (av107)
 108. ccgattagctgccccgggtct (av108r)
 109. ggggtatcggaggaggaggact (av109)
 110. gaccgccacaggagcacacc (av110r)
 111. gcccaaaaacagagcagata (av111)
 112. agtcgggttctgatccatttc (av112r)
 113. cgattagcggcaggagact (av113r)
 114. cgccgatgccctactcaat (av114)
 115. ggaagcccgcgtgattac (av115)
 116. tggcacaggatagatagacaaa (av116r)

117. agcaggTggcgggcaggalac (av117r)
118. ctgccctccgactttgtccctc (av118)
119. gaggaggcagaggaggTggaagaa (av119)
120. tgtttgcggcggttacttctcc (av120r)
121. cagcaaatcccggcagTctcg (av121)
122. gccgcccgtgtctttatctgtcg (av122r)
123. aaaaaggcgggaattacatcat (av123)
124. ggcggggcgTggTggtaag (av124r)
125. acatcaatcgtagccgtccac (av125r)
126. aggacaaaacatggctactggTg (av126)
127. gtagtattttgctcccccttcc (av127)
128. laaaagcgtccagccaaaactca (av128)
129. ttccggaaggTtatattgggtgc (av129r)
130. aagctcgggtttcatttcctcac (av130)
131. tgcgccagacatcaccttac (av131r)
132. tccatcgcacTaatcgttctgag (av132)
133. tcttcgtctctcccctcctct (av133r)
134. aaaatatctgtcctctgtgTca (av134)
135. gcgtcccctgctctgttcc (av135r)
136. acaagccacagggtctcc (av136)
137. accctgtggctgtctgtgatg (av137r)
138. acaaagTaaaaggccacaggagaat (av138)
139. ggaagTtacgcctgttgggattg (av139r)
140. tcgtgtggTgattggctgtg (av140)
141. atggtccaatatgTaaatgaggt (av141r)
142. tcaagcgggtTaaaaaggacaaaa (av88b)
143. ccttatagatggaatggTgcc (itr1)
144. ggcaccattccatctataagg (itr1r)
145. cggggggtgctTgatagaggTccta (hx4)
146. ccagctaccaaaatgaagcc (hx5r)
147. gatgtgagactgaggagccag (hx6r)
148. ggggaaccttaccagccaattatcc (hx7)
149. cgtggtcagagTgcaccagccaca (hx9r)
150. gttgcttcaagatggccacc (hxs1)
151. agggcgcgccaatacat (hxs2r)
152. gatgtgagactgaggagc (hxs3)
153. catcgaggatgaactgcct (hxs4)
154. ggaccagcgaatacatc (hxs5r)
155. gctaccggTccatgcttctg (hxs6r)

Fe de erratas

| Página | Línea | Dice | Debe decir |
|---------------|--------------|--------------|---|
| 5 | 8 | infecta | infectan |
| 16 | 9 | protein | proteína |
| 17 | 2 | descripto | descripto |
| | 10 | VA RNA genes | genes VA RNA |
| 18 | 14 | intemedias | intermedias |
| | 15 | to | a |
| 23 | 1 | response | - |
| | 6 | estabilizand | estabilizando |
| 25 | 5 | apoptotica | apoptótica |
| | 8 | . | - |
| 26 | 12 | reconida | reconocida |
| 31 | 12 | monomeros | monómeros |
| 35 | 13 | (13) | Lí y Waddell, 1999 |
| 37 | 7 | interferon | interferón/interferones |
| | 14 | require | requiere |
| 39 | 15 | protína | proteína |
| 45 | 10 | ha | han |
| 62 | 20 | gráfico 1 | - |
| 73 | 5 | portenciales | potenciales |
| 75 | | ref Tabla 10 | va en página 76 |
| 80 | 8 | Figura | - |
| 97 | 5 y 8 | Bg III | Bgl II |
| 114 | 2 | - | Altschul et al., 1997.Nucleic Ac Res 25:3389-3402 |
| 117 | 4 | - | Smith et al., 1997. J Gen Virol 78:1511-1519 |

FCE y N BIBLIOTECA

**Secuencia nucleotídica completa del Adenovirus 7h: análisis de los
polimorfismos del gen del hexón de los Adenovirus circulantes en
Buenos Aires entre los años 1990-2002.**

Tesista: Paola Roxana Barrero

Licenciada en Ciencias Biológicas

Director: Dra. Alicia Susana Mistchenko

Laboratorio de Virología, Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez

Cuadernillo complementario

7142

√.2

Contenido

- Discusión de los objetivos planteados y alcance de resultados obtenidos
- Figuras con mayor definición
- Leyendas para figuras

Discusión de los objetivos planteados y alcance de resultados obtenidos

Discusión de los objetivos planteados y alcance de resultados obtenidos

Esta Tesis es el producto de cuatro años de investigación en la diversidad genética de los Adenovirus.

El trabajo fue abordado en dos etapas, en la primera se estudiaron las *variaciones del gen del hexón*. Esto ha permitido localizar marcadores para la diferenciación filogenética de los Adenovirus asociados a evolución fatal. La *aplicación de estos marcadores en muestras de pacientes con infección respiratoria* permitirá evaluar la aplicabilidad clínica de los mismos y ahondar en su importancia en la patogenicidad.

En la segunda etapa el trabajo estuvo dirigido a la secuenciación completa del genoma del Adenovirus 7h, cuyo tamaño y complejidad es notable. A nivel internacional es uno de los primeros genomas de Adenovirus humanos reportados, y el primero en nuestro país.

Teniendo en cuenta el impacto de la infección por Adenovirus, el trabajo tendrá numerosas aplicaciones futuras.

A continuación se discuten los alcances de los objetivos propuestos.

Polimorfismos Hexón AV7h

¿Por qué utilizar herramientas moleculares en el hospital público?

Para enriquecer los métodos diagnósticos con herramientas de última generación, agregando información más detallada al dato obtenido en un diagnóstico rápido por inmunofluorescencia. Como hemos observado los anticuerpos monoclonales que se usan para diagnóstico no detectan en un 100% el amplio rango de genotipos que circulan en una población pediátrica.

¿Por qué realizar estudios de epidemiología molecular en AV?

Porque hay restricción temporal y geográfica en la circulación de otros virus respiratorios y es importante conocer la incidencia de patógenos, más aún cuando no cuentan con tratamiento y pueden generar enfermedades crónicas como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en fumadores y asma y enfermedad pulmonar crónica postviral en niños. En nuestro estudio predominó de la subespecie B1 y el AV7 fue el de mayor prevalencia, dato importante en pediatría dada su asociación con enfermedad severa o fatal.

¿Por qué analizar la filogenia de los AV7h?

Si bien el análisis de las regiones hipervariables en el período 1990-2002 posicionó a las muestras analizadas en el *cluster* GTC2 junto al AV7h, el análisis filogenético del hexón completo permitió agrupar las muestras fatales y las separó de las graves y leves. Esto nos permitió identificar probables marcadores moleculares fuera de HVRs que son las regiones usadas para genotipificar los AV. La presencia de estos marcadores moleculares, fáciles de detectar puede sumar un valor predictivo y pronóstico en una patología endémica de alto impacto en pediatría. Estos datos constituyen un primer paso

hacia la posible elucidación de las relaciones entre la evolución clínica y el genotipo.

Genoma AV7h

¿Por qué secuenciar el genoma AV7h por solapado de productos de PCR?

Porque la estrategia de biblioteca genómica y *shotgun* o caminata cromosómica no se podía completar debido a que era necesario terminar de analizar una secuencia y a partir de ella genera *primers* específicos para completar el clon de tamaño molecular grande y por falta de templados que funcionaran como moldes alternativos de *primers* en bases de datos públicas.

La secuencia de AV11p está disponible en bases de datos públicas desde octubre 2002. A partir de allí la estrategia de solapado de amplicones resultó una metodología aplicable sin inconvenientes en el Laboratorio.

¿Por qué secuenciar el genoma AV7h?

Porque

- AV7h es reconocido por su asociación con enfermedad severa y su distribución geográfica se está ampliando.
- En nuestro país se detecta en niños y está asociado a enfermedad de *evolución severa y/o fatal*.
- La infección persistente por AV se relaciona con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en adultos fumadores.
- En niños, la infección persistente por AV se asoció con asma y con enfermedad pulmonar crónica postviral.

- Se conocen sólo 4 genomas de AV humanos, y se puede encarar desde el conocimiento estrategias terapéuticas tanto farmacológicas como preventivas.

¿Por qué buscamos entre los mimotopes péptidos E1a, pentón, fibra y hexón?

Los componentes de la cápside son los más abundantes y se encontró DNA E1A en células epiteliales de pacientes adultos fumadores con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Si bien no encontramos mimotopes en estos péptidos, su búsqueda exhaustiva resultaba necesaria.

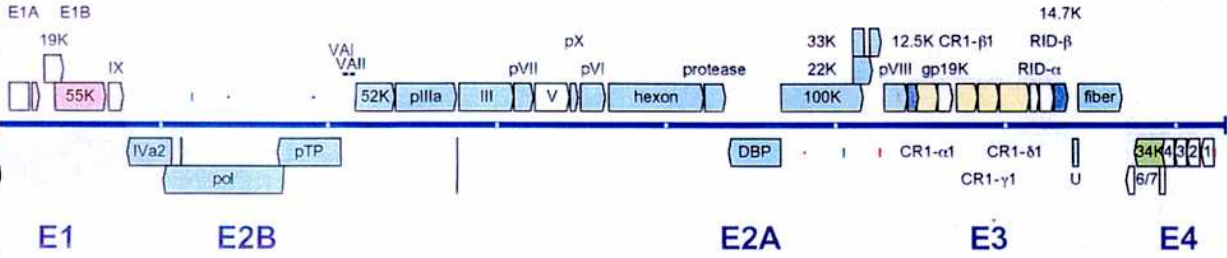
¿Por qué postular como mimotopes ORFs presentes en el genoma viral?

Porque

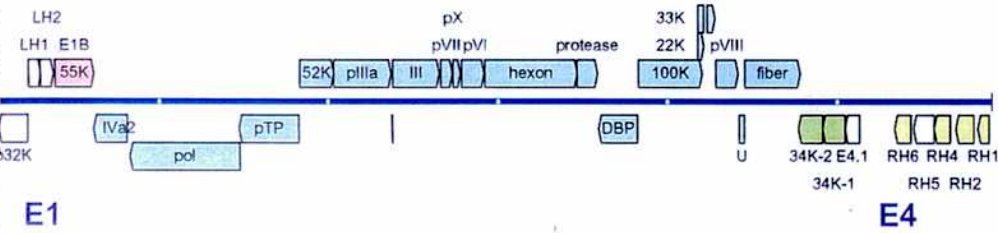
- Existe expresión preferencial de péptidos virales por *shutoff* celular
- Así habría expresión preferencial péptidos miméticos que no se encuentran dentro de ninguna proteína viral ni forman parte del virión
- Habría inducción de autoanticuerpos anti-elastina y miosina, superando la tolerancia al ser expresados como proteínas extrañas
- En la patogénesis de AV la expresión de las proteínas de músculo liso y matriz extracelular están aumentadas en pulmón
- Existe una hiperreactividad generalizada, dado un estado de alerta inmune.
- El daño al pulmón es crónico, disminuyendo su funcionalidad progresivamente de manera independiente de la presencia actual de infección viral.

Figuras con mayor definición

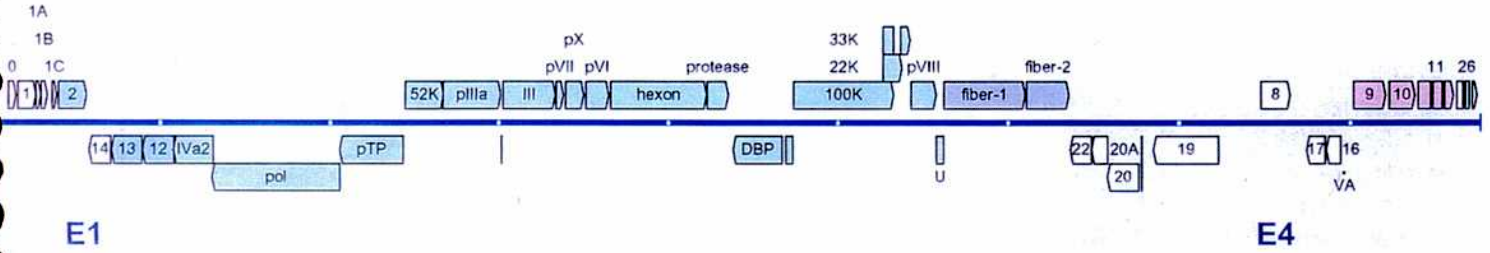
Mastadenovirus: SAdV-25 (HAdV-E)



Atadenovirus: OAdV-7 (OAdV-D)



Aviadenovirus: FAdV-1 (FAdV-A)



Siadenovirus: TAdV-3 (TAdV-A)

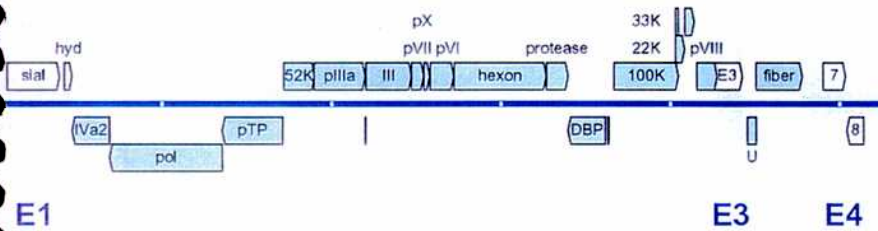


FIGURE 2

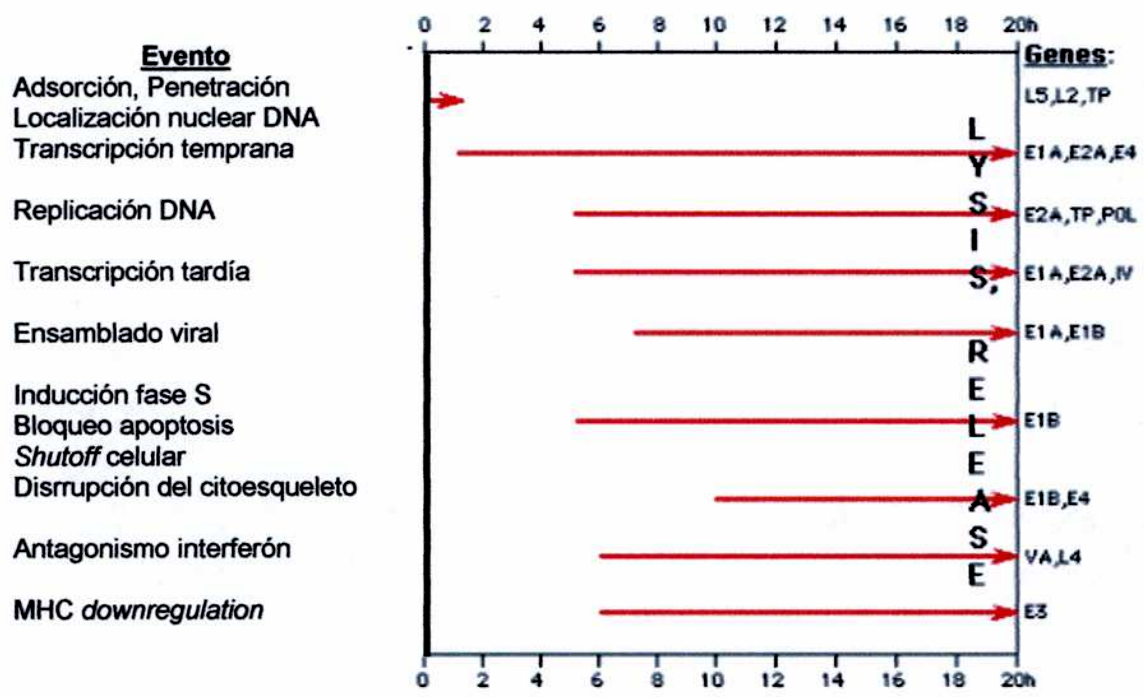


FIGURA 4

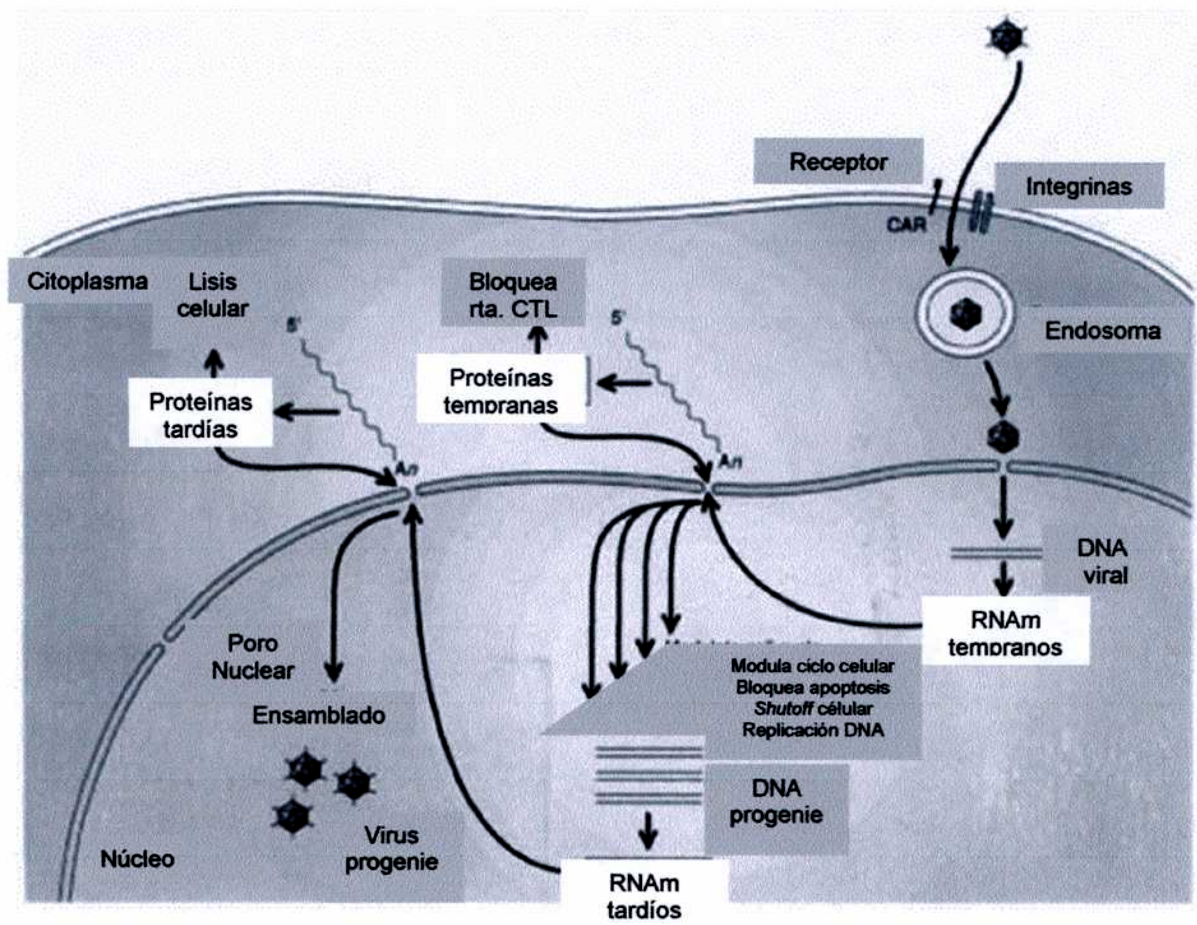


FIGURA 5

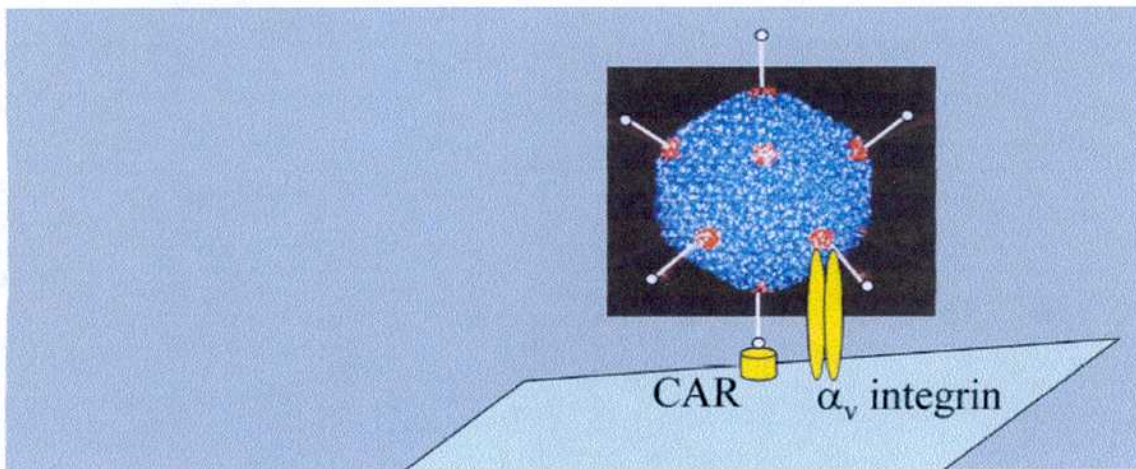


Figura 6

Cara apical

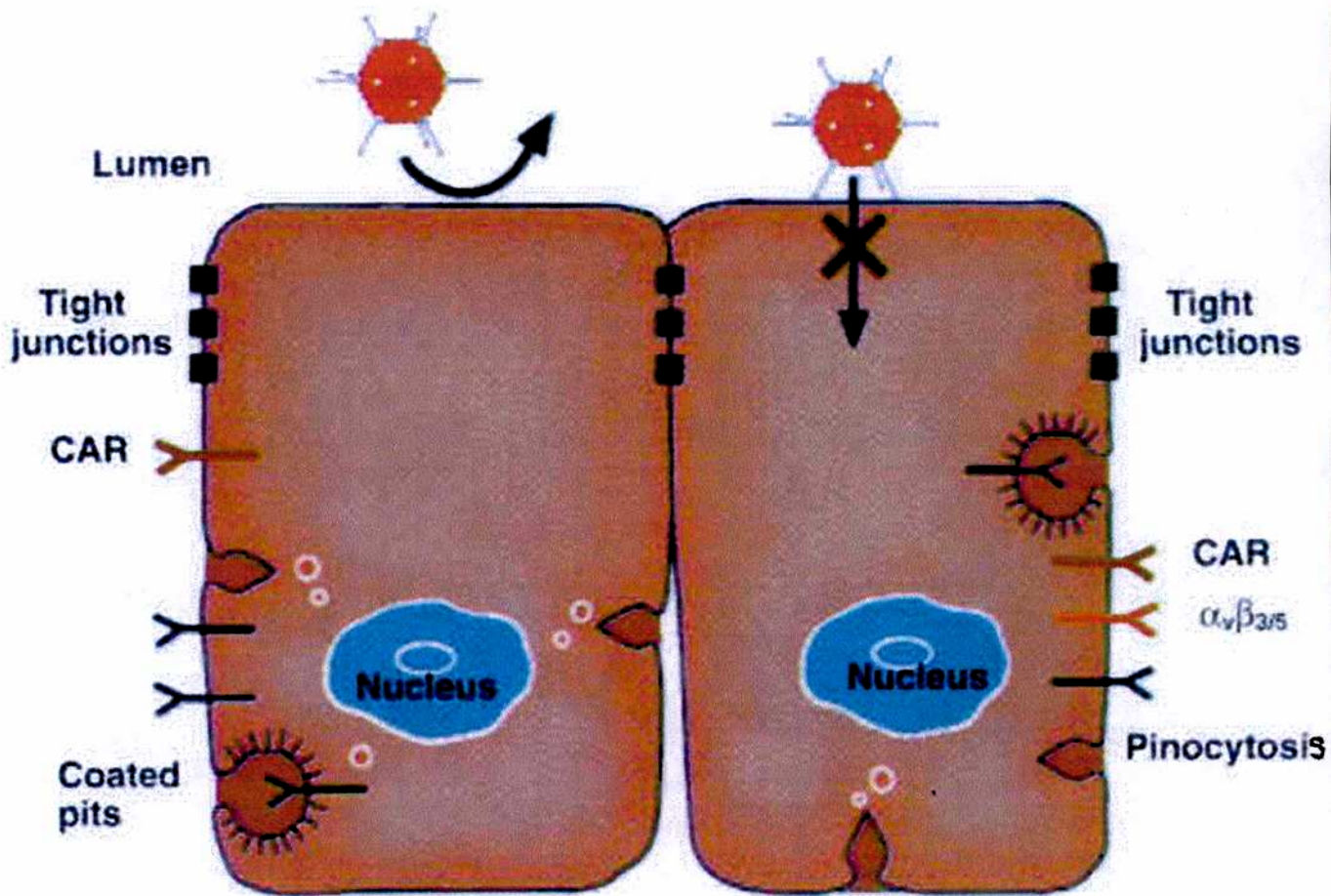


Figura 7

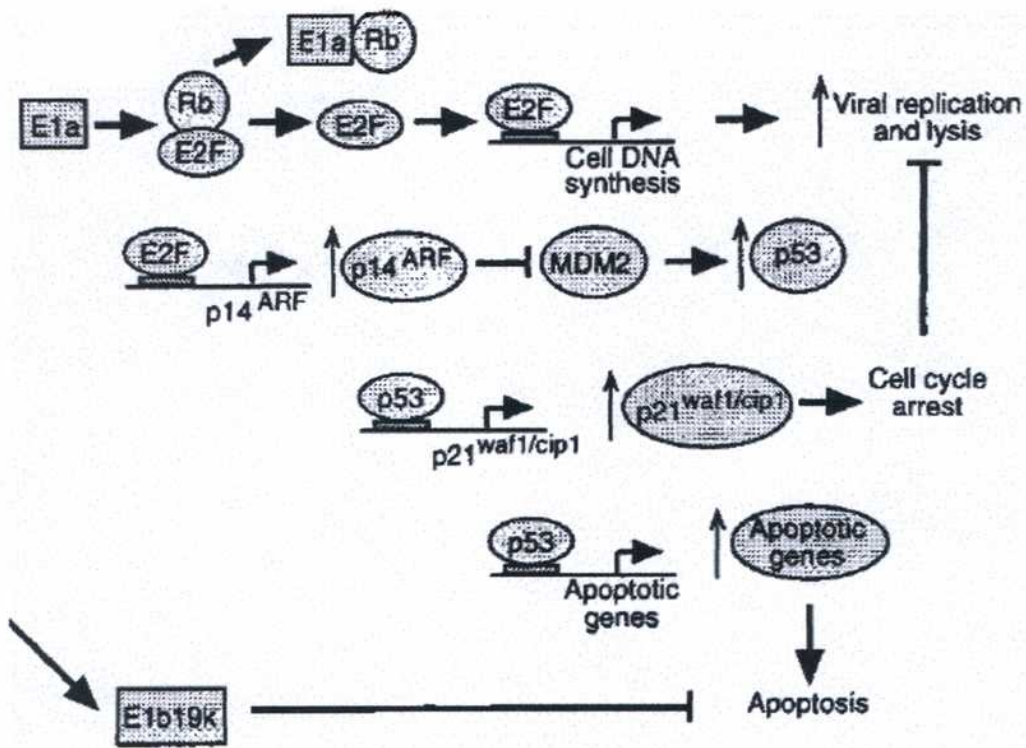


Figura 14

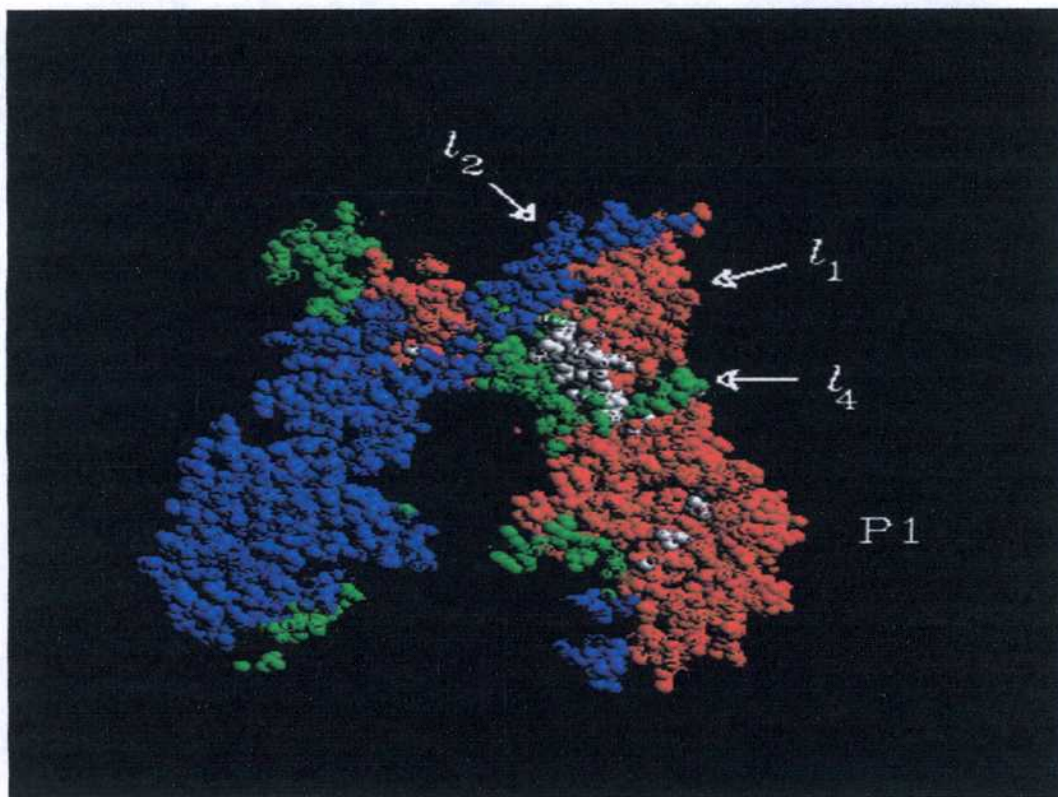


Figura 19

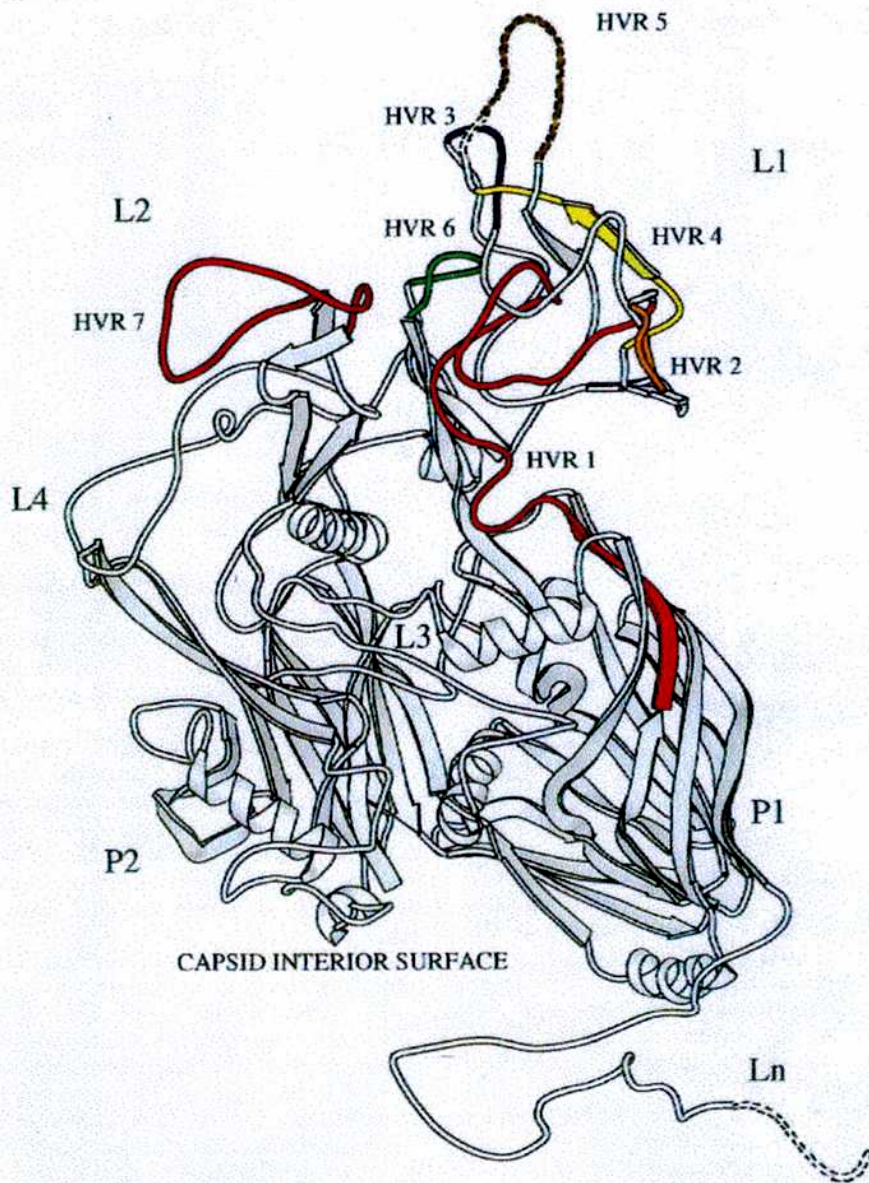


FIGURA 20 b.

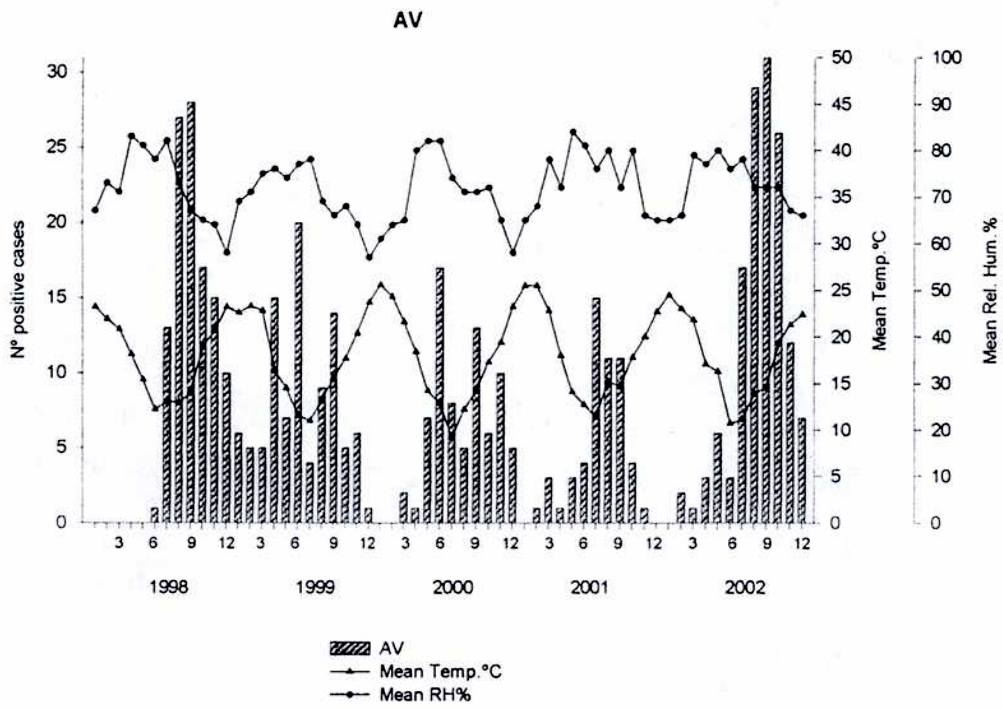


FIGURA 25

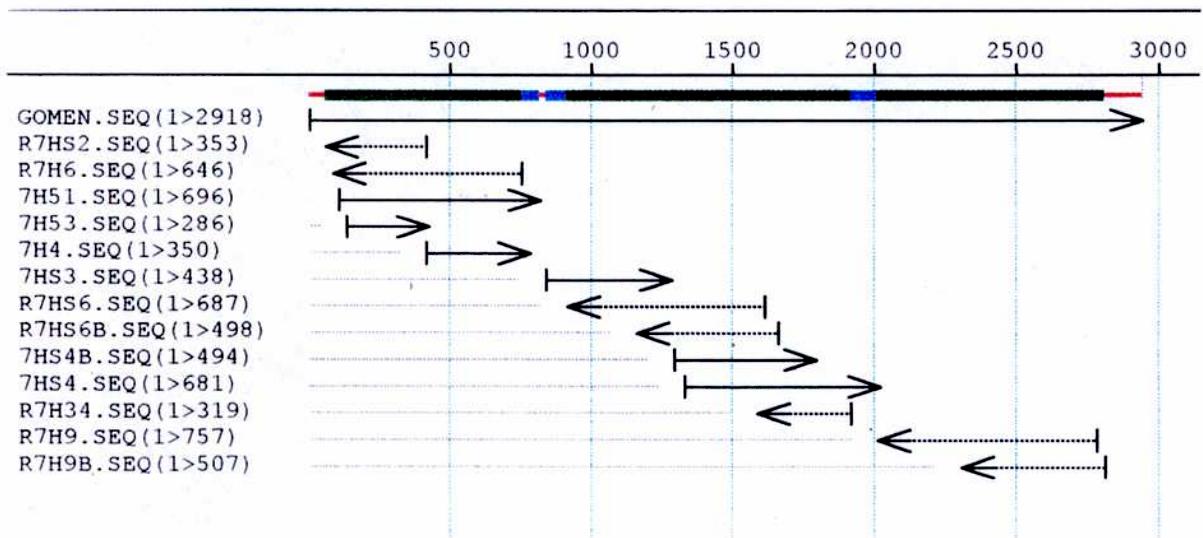


FIGURA 27

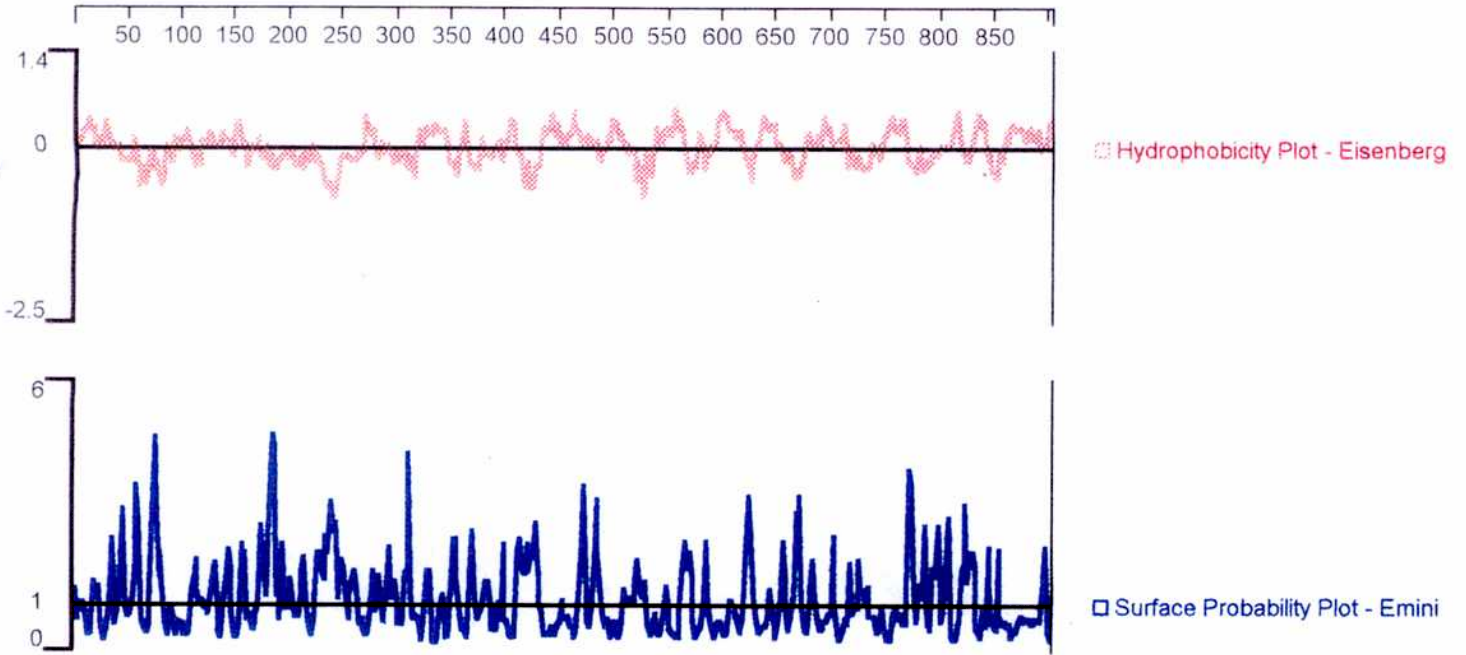


FIGURA 30 a -

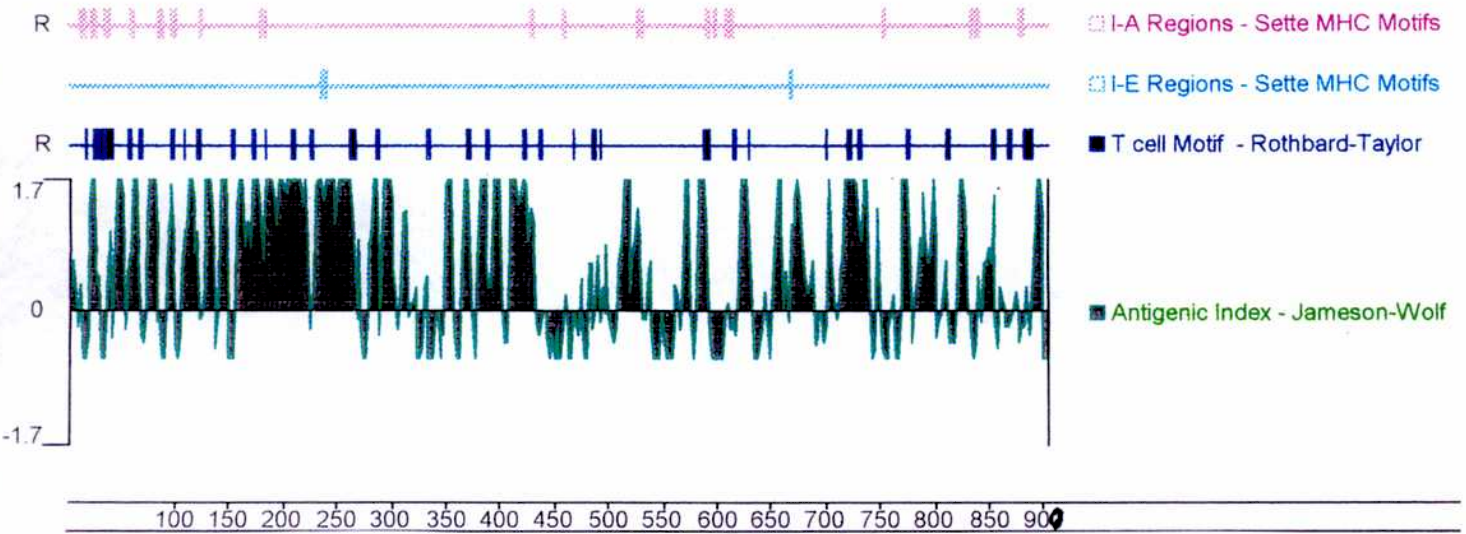


FIGURA 33

Mastadenovirus: SAdV-25 (HAdV-E)

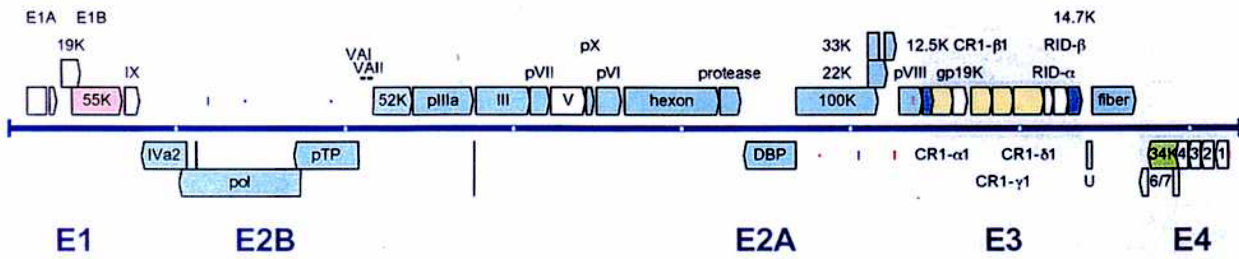


FIGURA 43

Leyendas

Leyendas para las Figuras

Figura 1: Filogenia de la proteína hexón de la familia *Adenoviridae*. Árbol de distancia con raíz en el esturión. Los géneros se marcan en diferentes colores y se destacan en verde los virus que pertenecen a la misma especie. Abreviaturas B: bovino, C: canino, D: pato, E: equino, F: aviar, Fr: rana, H: humano, M: murino, O: ovino, P: porcino, Po: zarigüeyas, Sn: serpiente, T: pavo, TS: musaraña. Tomado de Davison *et al.*, 2003.

Figura 2: Organización genómica de los diferentes géneros de la familia *Adenoviridae*. Los genes comunes se marcaron en celeste, los específicos en otro color. Abreviaturas F: aviar, H: humano, O: ovino, T: pavo. Modificado de Davison *et al.*, 2003.

Figura 3: Estructura del virión de Adenovirus. Se señala la localización de los componentes de la cápside del core y cemento. Modificado de Russell, 2000.

Figura 4: Estructura del virión de Adenovirus. Microscopía electrónica (x 500,000) mostrando la simetría icosaédrica y las fibras que protruyen de la cápside. Tomado de Valentine & Pereira, 2003.

Figura 5: Ciclo replicativo de Adenovirus (ver texto). Modificado de Shenk, 2001.

Figura 6: Entrada a la célula de los Adenovirus. Ilustración esquemática de la interacción de AV2 con los receptores celulares involucrados en la infección. La fibra (blanco) se une con alta afinidad con el receptor conocido como CAR (*coxsackie-adenovirus receptor*) y luego se promueve la internalización por la unión de la base del pentón (rojo) con integrinas α_v . Modificado de Nemerow & Stewart, 1999.

Figura 7: Ubicación de los receptores para Adenovirus los receptores para Adenovirus en las caras basolaterales de las células epiteliales. Se muestra que el virus entra a la célula vía endocitosis mediada por receptor. Los complejos AV-receptor CAR (*cocksackie-adenovirus receptor*) difunden en vesículas recubiertas (*coated pits*). Se muestra también la localización de las integrinas $\alpha_v\beta_{3/5}$. Modificado de Zhang et al., 2002.

Figura 8: Penetración a la célula y *uncoating* de Adenovirus. Las membranas de las vacuolas se rompen por la actividad tóxica del pentón liberándose así la partícula en el citoplasma. El *uncoating* sigue una secuencia ordenada: los pentones, hexones. El *core* migra al núcleo. Modificado de Cann, 1997.

Figura 9: Genoma de Mastadenovirus. Los genes comunes a todos los géneros se marcaron en celeste, los específicos en otro color. Las regiones codificantes se muestran como flechas. Modificado de Davison et al., 2003.

Figura 10: Mapa de transcripción de Adenovirus. Se muestran los genes tempranos (E=*Early*) y las cinco familias de genes tardíos (L=*Late*). Cada gen transcrito por la RNA polimerasa II da lugar a múltiples RNAs que se diferencian por *splicing* alternativo y en algunos casos por el uso de diferentes sitios *poly(A)*. Modificado de Cann, 1997.

Figura 11: Expresión del genoma en Adenovirus. Los transcritos tempranos se marcan en verde, los tardíos en azul, en marrón la ubicación de los genes VA RNA y en rojo las proteínas que codifica cada uno. Las flechas indican la dirección de la transcripción. MLP: *Major late promoter*, promotor tardío mayor. Modificado de Russel, 2000.

Figura 12: Unión de proteínas celulares a E1A (ver texto). CR1, CR2 y CR3 son regiones presentes en un amplio rango de adenovirus. PLDLS y LXCXE son

motivos de reconocimiento. E2F-1. *homology* se refiere a secuencias que desplazan E2F-1 de Rb y p300, *TATA-box-binding protein* (TBP) y *TBP-associated protein* (TAF). Modificado de Russell, 2000.

Figura 13: Interacción de E1A con NF- κ B. E1A bloquea la vía de NF- κ B, impidiendo su traslado al núcleo. κ B factor inhibitorio asociado, IKK complejo kinasa. Modificado de Hiscott et al., 2001.

Figura 14: Interacción de E1A y E1B con célula hospedador. E1A desplaza E2F de Rb y se induce p53 aumentando la replicación viral y lisis. p21^{waf1/cip1} lleva al *arresto del ciclo celular*. E1B *inhibe la apoptosis mediada por p53*. Modificado de Dix et al., 2001.

Figura 15: Proteínas y funciones E3. Se muestran los distintos productos de E3 (ver texto). Las flechas horizontales indican la dirección de la transcripción. Modificado de Russell, 2000.

Figura 16: Proteínas y funciones de E4. Se muestran los distintos marcos de lectura (ORFs) de E4 y sus funciones conocidas. Modificado de Russell, 2000.

Figura 17: Mecanismos de interacción del Adenovirus con la célula. Se ilustran algunos sitios de acción de las proteínas virales (rojo) en algunas vías celulares (amarillo). Se muestra una *partícula viral (verde) uniéndose al receptor*. Modificado de Russell, 2000.

Figura 18: *Infección lítica por Adenovirus*. Las células infectadas con Adenovirus tienen afinidad por la Hematoxilina (colorante azul-purpúreo). Las células infectadas se redondean y la monocapa se desintegra. Las inclusiones basofílicas oscuras en el núcleo representan el cúmulo de proteínas virales en el sitio de ensamblado del virus.

Figura 19: Estructura del Hexón de Adenovirus. Modelo del monómero indicando los *loops* L1, L2 y L4 hacia la superficie y los pedestales P1 y P2 internos. Tomado de San Martin & Burnett (2003).

Figura 20: Hexón de Adenovirus. a- Esquema del perfil hidropático del Hexón de Adenovirus. Se muestra el número de residuos en aminoácidos y la localización de los *loops* y los pedestales en la secuencia primaria. b- Esquema de cintas del monómero del hexón de Adenovirus. Se muestran las regiones hipervariables (HVR). Abreviaturas: L (*loop*), P (pedestal), Pc (conector del pedestal), Ln (*loop* amino terminal), Δ= deleción. Tomado de Crawford-Mikszta et al., 1996.

Figura 21: Esquema de la estrategia de secuenciación del gen hexón. Se delinearon las regiones que rodean al hexón y se muestran las siete regiones hipervariables, los *primers* y las regiones secuenciadas. Tomada de Takeuchi et al., 1999.

Figura 22: Distribución por mes AV positivos 1999-2002. Se grafican los adenovirus positivos detectados por inmunofluorescencia por mes.

Figura 23: Distribución por edad AV positivos 1999-2002. Se grafican los adenovirus positivos detectados por inmunofluorescencia por grupo etario divididos en 1-3, 4-6, 7-9, 10-12, 13-15, 16-18, 19-21, 22-24 y >30 meses.

Figura 24: Causa de Internación por AV muestras 1999-2002. Se graficaron las causas de internación en 321 pacientes.

Figura 25: Relación entre datos meteorológicos y frecuencias de AV 1998-2002. Se graficaron los adenovirus positivos detectados por inmunofluorescencia por mes junto con los datos de temperatura media (°C) y humedad relativa (%) promedio mensual. Modificado de Viegas et al., 2003.

Figura 26: *Primers* usados para amplificación y secuenciación del hexón. Los *primers* señalados en negro fueron tomados de Takeuchi et al., 1999; en azul se señalan los *primers* diseñados de novo para Av7h. Se muestran las regiones que rodean al hexón y las siete regiones hipervariables.

Figura 27: Esquema del armado de la secuencia del gen hexón Av7h. Las flechas indican la dirección de los primers. Se marca en la parte superior en verde las regiones leídas 4 veces, en azul las leídas 2 veces y en rojo las leídas 1 vez. La escala indica el número de pares de bases.

Figura 28: Composición nucleotídica hexón AV7h. Se grafica el número de bases obtenido en la secuencia consenso.

Figura 29: Composición aminoacídica hexón AV7h. Se discriminaron en básicos (Lis, Arg), ácidos (Asp, Glu), hidrofóbicos (Ala, Ile, Leu, Phe, Trp, Val) y polares (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr).

Figura 30: Esquema del perfil hidropático del Hexón de AV7h. Se muestra el número de residuos en aminoácidos. a- Ploteo de hidrofobicidad en rojo y de superficie (azul). Se tomó como valor de corte 1. b- Esquema del ploteo, se muestra la localización de las regiones hipervariables.

Figura 31: Comparación de las secuencias inferidas de aminoácidos. Cepas Gomen (Ad7p X76551) Ad7h HVR (X76551) y 87-922 (cepa aportada por este trabajo). Los puntos (.) significan igual residuo, los guiones (-) no hay secuencias disponible y los cambios de aminoácidos están indicados. Se indican también las 7 HVRs y los *loops*.

Figura 32: Diversidad hexón AV7h vs. Gomen. Se grafica el número promedio de diferencias por sitio (Pi) con respecto a la cepa prototipo del serotipo 7

(Gomen) avanzando de a 10 nucleótidos en ventanas de 50 bases de longitud. Se tomaron como valores importantes los >1 .

Figura 33: Localización gráfica de las regiones antigénicas Hexón AV7h. Se muestra el número de residuos en aminoácidos. El índice antigénico integra hidrofiliicidad, probabilidad de exposición en superficie y estructura secundaria. Se dedujeron los epitopes B y T.

Figura 34: PCR especie específica. Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 2% en buffer TAE teñido con Bromuro de Etidio. Calle 1: marcador de 100 pb., calles 2 a 9, 11, 13 a 18 producto a cortar con *Taq I*, calles 10 y 12 especie B:2 (290 pb.), calle 19 control negativo y calle 20 control positivo.

Figura 35: Restricción con *Taq I* de los productos de 420 a 510 pb.. Los productos de restricción se corrieron en geles de poliacrilamida nativa al 10% en buffer TBE. Calle 1 marcador de 100 pb, calle 9 marcador de 25 pb, calle 15 marcador de 10 pb; calle 2 AV7h calles 3 a 7 y 12 patrón similar a AV7h, calles 8 y 11 patrón símil AV7g y p, calle 10, control negativo, calle 13 patrón especie C, calle 14 AV2.

Figura 36: Alcance de las secuencias AV7 1990-2002 medido en aminoácidos. Se graficó el comienzo y el alcance de cada secuencia obtenida.

Figura 37: Inferencia filogenética hexones completos 1990-1999: La escala indica en el árbol los % de distancia y los números las sustituciones. Se utilizó la tabla de residuos PAM250. El código de las muestras es el usado en la Tabla 13.

Figura 38: Inferencia filogenética de las regiones hipervariables de los hexones 1990-2002. El árbol de distancia se construyó con 953 nucleótidos y se

tomaron como referencias secuencias disponibles de las distintas especies de Adenovirus humanos (A-F) y como grupo externo un adenovirus bovino. Se separan claramente las especies de Adenovirus humanos A (AV12 y 18), C (AV1, 2 y 6), D (AV8, 9, 10, 15, 19, 22, 24, 26, 37, 46 y 48), E (AV4) y F (40-41). Dentro de la especie B se separa la subespecie B2 (AV11 y 14) de la B1 (AV3 y 7). Dentro de la subespecie B1, podemos separar los clusters genómicos GTC1 (AV7p1 y Gomen) del GTC2 (AV7h y todas las muestras analizadas 1990-2002).

Figura 39: Corte de restricción para DNA genómico AV7h. Los fragmentos de restricción obtenidos con enzimas de restricción *BamH* I, *Bgl* II, *Hind* III y *Sma* I se visualizaron en gel de agarosa al 1% en buffer TAE y se tiñeron con Bromuro de etidio.

Figura 40: Cobertura de genoma AV7h.. Se tomó para cada *primer* (eje y) su punto de origen putativo (referido a la cepa AV11p) y la longitud leída (eje x). Se graficaron las 155 secuencias consenso derivadas de los 155 *primers* diseñados *ad hoc*. Se adicionaron 5 secuencias derivadas de la biblioteca genómica y 4 de *primers* de diagnóstico. Se puede apreciar que la redundancia es alta y la cobertura es total

Figura 41: Esquema de los contigs del armado del genoma AV7h. Se señalan en celeste los *contigs* cuyos *primers* fueron diseñados en base a secuencias de AV7 Gomen y en naranja los que fueron diseñados en base a AV11p. Se muestra el alcance de cada uno de ellos (en pb.), cómo se solapan y se resalta el número de *primers* utilizado para armar cada *contig*.

Figura 42: Marcos de lectura abiertos (ORFs) del genoma de AV7h. Se utilizaron dos programas para predecir los marcos de lectura probables (*ORF*

Finder (NCBI) y *GeneMark* v2.4. Se analizaron los seis marcos de lectura probables (+1, +2, +3; -1, -2, -3) tomando como mínima proteína posible un péptido de 43 aa.. Se marcan en verde los marcos de lectura confirmados por homología con proteínas de AV.

Figura 43: Esquema del genoma de Mastadenovirus. Los genes comunes a todos los géneros se marcaron en celeste, los específicos en otro color. Las regiones codificantes se muestran como flechas. Modificado de Davison et al., 2003.

Figura 44: Mapa de transcripción de AV7h. Se señalan los genes en gris y las proteínas en rosa.

Figura 45: Relaciones filogenéticas entre AV humanos. Se usó el modelo de evolución F81+G con tasas de sustituciones equiprobables para construir un árbol por el método de *Maximum Likelihood* que genera la filogenia más probable. Se tomó como referencia el prototipo de cada especie reconocido por ICTV. HAVA-D: AV especie A-B-C-D. Se tomó como grupo externo un AV bovino (BAVB).