

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**UNIDAD DE ENSEÑANZA APRENDIZAJE
TECNOLOGÍAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA TERAPÉUTICA
(336022)**

Comisión de actualización de la carta descriptiva

Dra. Marisol López López

Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes

Fecha de conclusión de la actualización 21/09/2016

ÍNDICE

Datos generales	3
Introducción	4
Ubicación de la UEA en el plan de estudios	4
Objeto de transformación	4
Problema eje	5
Objetivo general de la UEA	5
Atributos del perfil de egreso que se alcanzarán al final de la UEA	5
Estructura de la UEA	5
Modelos experimentales sugeridos	5
Principales líneas de investigación	6
Cronograma de actividades	6
Mapa Curricular	7
Unidad I	8
Unidad II	9
Unidad III	10
Unidad IV	11
Unidad V	12
Sesiones Experimentales	13
Bibliografía necesaria o recomendable	21
Modalidades de evaluación	22

DATOS GENERALES

Nombre de la UEA	TECNOLOGÍAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA TERAPÉUTICA
Clave de la UEA	3360020
Trimestre de impartición	XII
Créditos	45
UEA precedente:	Trayectoria A, Obtención de metabolitos de interés industrial para la salud; Trayectorias B y C, Evaluación de la calidad de los medicamentos
UEA subsiguiente	Ninguno
No. Hrs./teoría/semana	15
No. Hrs./práctica/semana	15
No. Hrs./ totales por trimestre:	330
No. unidades	cinco
Fecha elaboración	2009
Comisión de diseño de la UEA	M. en C. Antonio Ulises López Gutiérrez., Dra. Marisol López López, QFB. Luis Mario Madrid Jiménez, Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes
Fecha de actualización	24/07/2015
Comisión de actualización	Dra. Marisol López López, Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes
Responsable de la actualización	Dra. Marisol López López, Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes
Perfil idóneo del profesor de esta UEA	Q.F.B, Q.B.P., médico o biólogo con posgrado y experiencia en investigación en el área de genética y genómica humana molecular

INTRODUCCIÓN

Una de las áreas más relevantes en la práctica profesional actual y futura del Q.F.B. es la aplicación de nuevas tecnologías moleculares y genómicas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades que representan problemas de salud en México.

Esta UEA complementa y amplía de manera significativa los conocimientos y habilidades adquiridas por el estudiante durante el período de su formación profesional. En particular, es esencial para formular estrategias moleculares y genómicas de solución a problemas de salud mediante métodos diagnósticos y desarrollo de fármacos moleculares.

Las ciencias genómicas surgen como resultado de los avances en la secuenciación del genoma humano y de otros organismos, así como del espectacular desarrollo tecnológico y de sistemas en bioinformática para la obtención, almacenamiento, e interpretación del enorme volumen de datos que se generan.

En este contexto, la genómica mejorará el conocimiento biológico del concepto salud-enfermedad, abriendo nuevas expectativas de calidad de vida para la población en general así como nuevos sistemas terapéuticos y nuevas fuentes de empleo para los profesionistas formados en esta disciplina.

El campo de trabajo incluye instituciones tanto del sector salud, como hospitales, clínicas y laboratorios de diagnóstico, así como empresas nuevas y tradicionales donde se desarrollan nuevos sistemas de diagnóstico y novedosos tratamientos.

El objetivo general de la UEA, que es conocer, analizar, y aplicar las tecnologías moleculares para el diagnóstico y la terapéutica en humanos, hará que los alumnos desarrollen su actividad profesional en instituciones de salud, y en industrias farmacéuticas y biotecnológicas, dentro de un marco jurídico y social adecuado. El alumno realizará esta actividad profesional dentro de la normatividad vigente en México. Así mismo, construirá un aparato teórico y metodológico que le permita desarrollarse dentro de las ciencias genómicas y sus aplicaciones.

UBICACIÓN DE LA UEA EN EL PLAN DE ESTUDIOS

Se trata de una UEA optativa en el último trimestre de la carrera de Q.F.B. Se requieren los conocimientos de los UEAs previos, ya que los temas a tratar son complejos e integran información básica y de reciente aparición.

OBJETO DE TRANSFORMACIÓN: Tecnologías moleculares para el diagnóstico y la terapéutica

La era de la genómica nos provee de una vasta cantidad de información derivada de la secuenciación de diferentes genomas y de las tecnologías moleculares utilizadas para ello. Sin lugar a dudas esto ha revolucionado la biología y la forma en que se descubren nuevos medicamentos y profilácticos.

En las últimas décadas nuestro conocimiento sobre la fisiopatología de las enfermedades ha avanzado rápidamente, pero los mecanismos moleculares de muchos padecimientos permanecen sin conocerse. La investigación genómica ofrece una nueva oportunidad para determinar cómo se desarrollan las enfermedades, tornando ventaja de herramientas de investigación sofisticadas para identificar las anomalías moleculares en el proceso patológico. El conocimiento de las bases moleculares de las enfermedades permitirá el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico y terapéutica.

El grado y la velocidad con la que ha progresado la genómica se pueden ilustrar con el logro de la secuencia completa del genoma humano 50 años después de la publicación de la estructura del ADN por J Watson y F. Crick en 1953. Esto ha resultado en un avance muy importante de la ciencia, la tecnología y la

medicina, lo cual se ha visto reflejado en la abundante literatura publicada sobre estos temas.

La farmacogenómica se ha convertido en una parte integral del proceso del diseño y desarrollo de nuevos fármacos de acuerdo a la identificación de blancos moleculares. Las compañías farmacéuticas han incorporado esta estrategia farmacogenómica ya que les permite reducir el tiempo y el costo que lleva sacar al mercado nuevos medicamentos.

La cantidad y complejidad del conocimiento que se obtienen mediante las nuevas tecnologías genómicas originó la disciplina de bioinformática como una herramienta para el análisis, manejo y comprensión de los datos obtenidos del conocimiento de los genomas secuenciados.

PROBLEMA EJE:

El diagnóstico molecular, la farmacogenómica y la terapéutica molecular aplicados al cuidado y la atención de la salud.

Los avances recientes en biología molecular y genética, como los resultantes del Proyecto Genoma Humano, son de gran importancia para el área farmacéutica y biotecnológica. Por ejemplo, el diseño racional de fármacos requiere un entendimiento de los procesos patológicos a nivel molecular, mientras que la farmacogenómica permitirá aumentar la seguridad y eficacia de la prescripción de medicamentos, disminuir la incidencia de las reacciones adversas, mejorar la salud pública y apoyar la entrada de la medicina en una etapa personalizada predictiva y profiláctica.

El programa de esta UEA comprenderá las bases de biología molecular y de genómica necesarias para alcanzar estos objetivos.

OBJETIVO GENERAL DE LA UEA:

Conocer, analizar y aplicar las tecnologías moleculares para el diagnóstico y la terapéutica en humanos.

ATRIBUTOS DEL PERFIL DE EGRESO QUE SE ALCANZARÁN AL FINAL DE LA UEA:

- Profesional caracterizado por un comportamiento ético y responsable en el ejercicio de la profesión farmacéutica
- Con actitud crítica ante los determinantes de tipo económico, político y social de los problemas de salud en México
- Con capacidad de adoptar una perspectiva sustentable en la planeación de la producción de medicamentos y otros insumos para la salud
- Con una sólida formación básica que le permitirá acceder y desenvolverse exitosamente en el campo profesional, en los estudios de posgrado y la investigación
- Manejar y eliminar los desechos de los procesos de producción de la IQF con apego a las normas de seguridad, tratando de reducir al mínimo los riesgos personales y ecológicos

ESTRUCTURA DE LA UEA

Unidad I. Genética de la célula eucarionte

Unidad II. Variabilidad y mutabilidad del genoma humano

Unidad III. Tecnologías moleculares

Unidad IV. Organismos genéticamente modificados

Unidad V. Medicina genómica

MODELOS EXPERIMENTALES SUGERIDOS:

1. Aislamiento, purificación y cuantificación de ácidos nucleicos (plásmidos, DNA genómico).
2. Técnicas de electroforesis, PCR y restricción (plásmidos, DNA genómico).
3. Manejo de recursos bioinformáticos para la obtención y análisis de información a través del uso de bases de datos genómicos y proteómicos.

PRINCIPALES LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Para el desarrollo del proyecto de investigación de la UEA se proponen las siguientes líneas de investigación que ofrecen posibilidades de formación para el manejo de las técnicas moleculares.

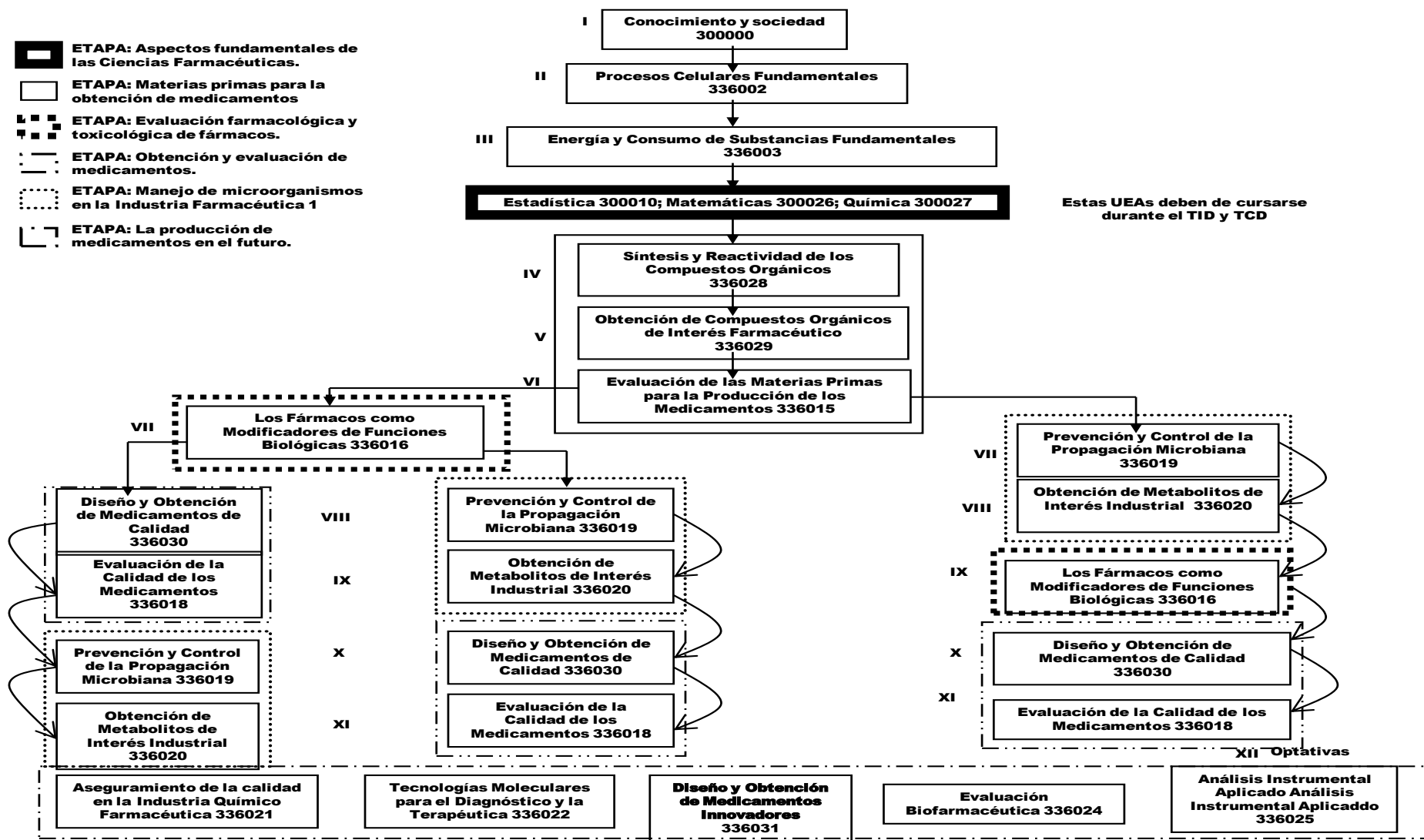
1. Identificación y/o monitoreo de genes de interés a través de las técnicas moleculares.
2. Identificación genómica y taxonomía molecular de microorganismos.
3. Diseño, implementación y aplicación de metodologías para el diagnóstico molecular en enfermedades (PCR, RT-PCR, PCR RFLP).
4. Estudios de variabilidad y mutabilidad de genomas.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Semana (sesiones)	1-1.5 (8)	1.6-3 (9)	4-5 (11)	6 (6)	7 (5)	8-9.5 (8)	9.6-10 (8)	11 (1)
Unidades	I	II	III		IV		V	
Investigación		Selección del proyecto	Elaboración del protocolo			Seminario de avance	Presentación escrita	Presentación oral
		Marco Teórico						
				Desarrollo experimental				
Sesiones prácticas			2	2	2	2		
Evaluaciones objetivas		1	1		1		1	

MAPA CURRICULAR

- ETAPA: Aspectos fundamentales de las Ciencias Farmacéuticas.**
- ETAPA: Materias primas para la obtención de medicamentos**
- ETAPA: Evaluación farmacológica y toxicológica de fármacos.**
- ETAPA: Obtención y evaluación de medicamentos.**
- ETAPA: Manejo de microorganismos en la Industria Farmacéutica 1**
- ETAPA: La producción de medicamentos en el futuro.**



UNIDAD I GENÉTICA DE LA CÉLULA EUCARIONTE

Objetivo General de la Unidad Conocer los fundamentos genéticos para distinguir los procesos moleculares implicados en el almacenamiento y expresión de la información genética.

Contenidos	Objetivos de proceso	Actividades	Duración en sesiones	Bibliografía
<p>1. Dogma central de la biología molecular. Concepto de gen, alelo, genotipo y fenotipo. Patrones de herencia: autosómica (recesiva, dominante), ligada al X (recesiva, dominante) y multifactorial. Mecanismos de dominancia. Herencia mitocondrial.</p> <p>2. Estructura y función del genoma eucarionte. Estructura y función de la cromatina. Niveles de empaquetamiento de la cromatina. Eucromatina y heterocromatina. Estructura de los cromosomas humanos. Organización del genoma eucarionte. Replicación del DNA y de la cromatina eucarionte. Tipos de ARN (eucariontes). Estructura y función. Transcripción y Traducción (eucariontes).</p> <p>Control de la expresión genética en eucariontes.</p>	<p>Comprender la naturaleza del flujo de la información genética y los procesos asociados en los organismos.</p> <p>Conocer los fundamentos de la genética.</p> <p>Comprender la relación genotipo- fenotipo.</p> <p>Conocer la estructura y función del material genético en eucariontes, así como los procesos implicados.</p>	<p>Revisión de bibliografía.</p> <p>Presentación del tema por equipo de trabajo.</p> <p>Análisis y discusión del tema tratado por el grupo y coordinado por el profesor.</p> <p>Tarea por unidad de ejercicios y problemas de integración de los contenidos de la unidad</p>	8 sesiones	2, 3, 4, 8, 9, 10, 16, 31, 32

UNIDAD II VARIABILIDAD Y MUTABILIDAD DEL GENOMA HUMANO

Objetivo General de la Unidad Analizar la variabilidad genética, los mecanismos que la generan y la aplicación de los polimorfismos genéticos en estudios de genotipificación.

Contenidos	Objetivos de proceso	Actividades	Duración en sesiones	Bibliografía
1. Variabilidad genética del genoma humano. 2. Mecanismos que generan variabilidad genética 3. Tipos de variabilidad genética en el humano. Concepto de mutación. Tipos de mutaciones. Agentes mutagénicos. Mecanismos de reparación del material genético 4. Polimorfismos genéticos. Polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP), variación en el número de copias (CNV)	Conocer los tipos de variación genética que existen y los mecanismos que la generan. Analizar el concepto de polimorfismo genético y compararlo con el concepto de mutación, Conocer las implicaciones de los polimorfismos genéticos en el diagnóstico y la terapéutica molecular.	Revisión de bibliografía. Presentación del tema por equipo de trabajo. Análisis y discusión del tema tratado por el grupo y coordinado por el profesor. Tarea por unidad de ejercicios y	9 sesiones	4, 8, 9, 11, 16, 26, 31

UNIDAD III TECNOLOGÍAS MOLECULARES

Objetivo General de la Unidad: Aplicar las técnicas moleculares básicas en la investigación biomédica.

Contenidos	Objetivos de proceso	Actividades	Duración en sesiones	Bibliografía
<ol style="list-style-type: none"> 1. Tecnología de separación de moléculas por electroforesis 2. Tecnologías de fragmentación de ácidos nucleicos. Enzimas de restricción. RFLP. 3. Tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), RT-PCR. 4. Tecnologías basadas en patrones de hibridación molecular. Southern-blot, Northern-blot, Western-blot. Colony-blot. Hibridación in situ (FISH). 5. Tecnología para la secuenciación de ácidos nucleicos. Métodos químico, enzimático y de secuenciación automatizada 6. Nuevas tecnologías. Electroforesis capilar. Microarreglos 7. Tecnologías para el análisis global y determinación de perfiles moleculares Hibridación genómica comparativa (CGH), Análisis serial de expresión genética (SAGE). Electroforesis bidimensional (2-DE). Espectrometría de masas 8. Aplicaciones. Identificación de individuos mediante el perfil genético. Diagnóstico molecular. Terapéutica molecular. Diseño y desarrollo de nuevos fármacos. 	<p>Conocer las tecnologías utilizadas para el estudio y manipulación de los genomas así como sus aplicaciones en el diagnóstico y la terapéutica molecular</p> <p>Aplicar las tecnologías moleculares para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos.</p>	<p>Revisión de bibliografía.</p> <p>Presentación del tema por equipo de trabajo.</p> <p>Análisis y discusión del tema</p> <p>Tarea por unidad de ejercicios y problemas de integración de los contenidos de la unidad</p>	11 sesiones	10, 15, 31, 20, 23

UNIDAD IV ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Objetivo General de la Unidad: Analizar las características de los organismos genéticamente modificados y su empleo en la industria biotecnológica.

Contenidos	Objetivos de proceso	Actividades	Duración en sesiones	Bibliografía
<p>1. Bacterias recombinantes Estrategias moleculares. Identificación genómica. Aplicaciones.</p> <p>2. Clonación de mamíferos Técnica de transferencia nuclear. Aplicaciones: producción de proteínas terapéuticas humanas, xenotransplantes, otros</p> <p>3. Implicaciones éticas, Legales y sociales y normatividad. Vacunas genómicas, Vacunas de DNA. Ratones <i>Knock-in</i> y <i>Knock-out</i>. Plantas transgénicas (Plásmido Ti)</p>	<p>Conocer los tipos de organismos modificados genéticamente y sus implicaciones en el diagnóstico y la terapéutica molecular.</p> <p>Analizar y discutir las implicaciones éticas, legales y sociales de los organismos genéticamente modificados</p>	<p>Revisión de bibliografía.</p> <p>Presentación del tema por equipo de trabajo.</p> <p>Análisis y discusión del tema tratado por el grupo y coordinado por el profesor.</p> <p>Tarea por unidad de ejercicios y problemas de integración de los contenidos de la unidad</p>	<p>9 sesiones</p>	<p>5, 12, 13, 14, 27, 28, 33</p>

UNIDAD V MEDICINA GENÓMICA

Objetivo General de la Unidad: Conocer los avances en el conocimiento genómico y su impacto en la medicina, así como sus implicaciones éticas, legales y sociales.

Contenidos	Objetivos de proceso	Actividades	Duración en sesiones	Bibliografía
<ol style="list-style-type: none"> 1. El Proyecto del Genoma Humano. Antecedentes históricos. Metas. Avances, perspectivas. Aspectos éticos legales y sociales. 2. Surgimiento de las ciencias genómicas. 3. Medicina Genómica. 4. De la Farmacogenética a la Farmacogenómica 5. Aplicaciones de la medicina genómica en enfermedades comunes. 6. Implicaciones de la medicina genómica en la industria farmacéutica. 7. Implicaciones éticas, legales y sociales de la medicina genómica y su normatividad en México. 	<p>Conocer el Proyecto Genoma Humano y sus implicaciones en el surgimiento de las ciencias genómicas. Conocer las bases de la medicina genómica. Comprender las bases de la farmacogenética</p> <p>Analizar las aplicaciones de la farmacogenómica. Aplicar los conceptos de la medicina genómica en la industria farmacéutica.</p> <p>Analizar y discutir las implicaciones éticas, legales y sociales del Proyecto del Genoma Humano y de la medicina genómica. Conocer la normatividad vigente y las propuestas de desarrollo.</p>	<p>Revisión de bibliografía.</p> <p>Presentación del tema por equipo de trabajo.</p> <p>Análisis y discusión de Tarea por unidad de ejercicios y problemas de integración de los contenidos de la unidad</p>	8 sesiones	1, 6, 7, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25,26, 30, 31, 34

SESION EXPERIMENTAL I

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR de SANGRE PERIFÉRICA.

Introducción

Actualmente existen varios métodos de extracción de DNA genómico dependiendo del origen, pureza, cantidad y calidad de la muestra de células eucariontes utilizada para su aislamiento, así como del uso posterior de la muestra de DNA obtenida.

El primer requerimiento es que el DNA esté libre de otros compuestos celulares. Los pasos generales son la lisis de las células con algún detergente y la precipitación con alcohol para obtener DNA puro. La solución final acuosa se trata con RNAsa para eliminar todo el RNA repitiendo los procedimientos hasta que esté puro. Hoy en día existen numerosos equipos comerciales que facilitan la extracción con un aceptable grado de pureza.

Objetivo (s)

Describir el fundamento, técnica y limitaciones de la técnica de extracción de DNA genómico. Desarrollar la técnica para la obtención de DNA.

Materiales, equipo y reactivos

Vortex

Micropipetas

Microcentrífuga

Tubos de 15 ml

Vacutainer con anticoagulante

Tubo cónico estéril de 15ml

Puntas para micropipeta

Micro tubos

Jeringa con aguja

Pipetas de 5 y 10 ml estériles

Guantes desechables

Isopropanol

Etanol

Procedimiento experimental. Se utilizarán estuches comerciales (Por ejemplo: Qiagen o Promega)

Obtención de DNA cromosómico de células sanguíneas. (Promega)

1. En un tubo estéril de 15 mL adicionar 3 mL de sangre y 9.0 mL de solución de lisis celular.
2. Mezclar por inversión 5-6 veces.
3. Incubar la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente e invertir 3-4 veces para la lisis. Centrifugar a 2000 x g durante 10 min.
4. Retirar el sobrenadante con cuidado sin destruir el botón blanco visible obtenido. Deben permanecer aprox. 50-100 μ l en el tubo.
5. Mezcle por Vortex vigorosamente hasta que se resuspendan las células blancas.
6. Adicionar 3 mL de solución de lisis nucleica. La solución se tornará viscosa.
7. Adicionar 15 μ l de solución RNAsa para eliminar el RNA contaminante. Invertir el tubo de 2-5 veces para mezclar.

8. Incubar a 37°C por un lapso de 15-60 minutos. Transcurrido este tiempo enfriar a temperatura ambiente.
9. Adicionar 1 mL de solución de precipitación de proteínas a las células tratadas con RNAsa. Agitar en Vortex vigorosamente por un lapso de 20 segundos para mezclar la solución precipitadora de proteínas con el lisado celular.
10. Centrifugar a 2000 x g por 10 minutos.
11. Transferir el sobrenadante que contiene el DNA a un microtubo estéril de 15 mL que contenga 3 mL de isopropanol a temperatura ambiente.
12. Mezclar por inversión hasta que el DNA forme una masa visible.
13. Centrifugar a 2000 x g por 2 minutos.
14. Desechar el sobrenadante y secar el tubo en papel absorbente. Adicionar un volumen de etanol al 70% a temperatura ambiente y mezclar invirtiendo los tubos para formar una pelotilla de DNA.
15. Centrifugar como en paso 13 y transcurrido este tiempo desechar el etanol utilizando una pipeta Pasteur con mucho cuidado.
16. Colocar el tubo en papel absorbente y dejar secar la pelotilla por 10-15 minutos.
17. Adicionar 250 p.l de solución rehidratadora de DNA al tubo. Incubar a 65°C por 1 hora. Periódicamente mezclar la solución para evitar taponar el tubo.
18. Guardar la solución de DNA a una temperatura de 2-8°C.

MECANISMO DE ELIMINACIÓN DE RESIDUOS: actividades de desecho de materiales (pertinentes con la noción de sustentabilidad) procedimientos generales en laboratorio y consideraciones de seguridad

Cualquier agar solidificado o agarosa que no esté contaminado debe tirarse a la basura en un contenedor con una bolsa de plástico específica para esos desechos. No debe por ningún motivo desecharse en la tarja.

Cualquier medio que se haya contaminado debe ser esterilizado antes de descartarlo. Las cajas de Petri y otros desechos biológicos deben ser tirados en los contenedores señalados (bolsas indicadas) los cuales serán llevados a esterilizar antes de desecharlos.

El bromuro de etidio es una sustancia mutagénica que debe ser tratada antes de desecharse y debe ser manipulada únicamente con guantes. El bromuro de etidio debe ser desechado en un contenedor etiquetado para tal propósito. Por lo mismo actualmente se deben utilizar colorantes inocuos como el RED-GEL.

Recuerde que existen algunas sustancias que se utilizan en estas técnicas que son potencialmente tóxicas: (Fenol: puede causar quemaduras severas, Acrilamida: neurotóxico; Bromuro de etidio: carcinógeno)

- Estas sustancias no causan daño si se manipulan de forma adecuada. **SIEMPRE SE DEBEN UTILIZAR GUANTES.** Nunca pipetear con la boca cualquiera de estas sustancias. Si accidentalmente se derramara cualquiera de estas sustancias en la piel **INMEDIATAMENTE** enjuague abundantemente con agua e informe al docente.
- Luz Ultravioleta: La exposición a la luz ultravioleta puede causar irritación en los ojos. Debido a que la retina no puede detectar la luz ultravioleta, se puede dañar seriamente los ojos y no darse cuenta hasta 30 mm n a 24 horas después de la exposición. Por tanto, **SIEMPRE** utilice protección en los ojos cuando observe los geles con lámpara de luz ultravioleta.

SESION EXPERIMENTAL II

ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Introducción

Esta técnica separa fragmentos de DNA y cadenas de RNA de distinto tamaño, y es insustituible en los trabajos de investigación en genética molecular. En general, la electroforesis separa o resuelve diferentes moléculas de DNA o RNA de una mezcla haciéndolas migrar bajo la influencia de un campo eléctrico. Para ello se coloca la muestra en una sustancia porosa (como un gel semisólido), que a su vez se coloca en una solución conductora de electricidad. El uso de medios porosos como los geles de agarosa o de poliacrilamida, que pueden prepararse con distinto tamaño de poro, permite que las moléculas se separen dependiendo de su tamaño. En estos casos, las moléculas más pequeñas migran a través del gel a una velocidad mayor que las más grandes.

Objetivo (s)

Describir el fundamento, técnica y limitaciones de la técnica electroforesis de ácidos nucleicos

Desarrollar la técnica para obtención de la separación de fragmentos de DNA.

Interpretación de resultados

Materiales, equipo y reactivos

Microtubos

Matraz Erlenmeyer

Pipetas

Puntas para micropipetas

Guantes desechables

Parafilm

Balanza

Agarosa grado biología molecular

Cámara de electroforesis horizontal.

Fuente de poder

Micropipetas

Horno de microondas

Cámara de luz UV

Trizma base

Ácido bórico

EDTA

Bromuro de etidio ó RED GEL

Agua desionizada Preparación de 1 litro de solución de TBE 10x (Tris, Borato, EDTA)

Pesar 108.0 g de Tris base, 55.0 g de ácido bórico, 93 g de EDTA y disolver en 500-600 mL de agua desionizada, una vez disueltos aforar a 1 litro con agua desionizada. Guardar la solución en refrigeración para su uso posterior. Para 1x diluir 100 mL de TBE 10x en 900 mL de agua desionizada.

Procedimiento experimental

Preparación del gel de agarosa al 1.2% en TBE

En un matraz Erlenmeyer pesar 0.300 g de agarosa, agregar 25 mL de amortiguador TBE 1x y registrar el peso. Disolver la agarosa en un horno de microondas por 20 seg. (Repetir cuantas veces sea necesario).

Al disolverse por completo volver a pesar y recuperar el peso faltante con agua. Dejar enfriar un poco. Verter en la cámara de electroforesis con el peine de 8 pozos y dejar que solidifique.

Carga de la muestra

Colocar 2 microlitros, de amortiguador de carga sobre un pedazo de Parafilm.

Inmediatamente después colocar 5 µL de la muestra de DNA, hacer la mezcla de ambos y cargar en los pozos del gel, procurando no dispersar la muestra.

Correr el gel de 45 a 60 minutos a un voltaje de 85 V.

Revelado del gel

Para revelar el gel se utiliza una solución de bromuro de etidio (5 µL de bromuro de etidio en 100 mL de agua ó reactivo RED-GEL), colocar el gel por un lapso de 5-10 minutos en esta solución, después enjuagar por 5 minutos más en agua desionizada y observar en la cámara de luz U.V.

MECANISMO DE ELIMINACIÓN DE RESIDUOS: actividades de desecho de materiales (pertinentes con la noción de sustentabilidad) procedimientos generales en laboratorio y consideraciones de seguridad

Cualquier agar solidificado o agarosa que no esté contaminado debe tirarse a la basura en un contenedor con una bolsa de plástico específica para esos desechos. No debe por ningún motivo desecharse en la tarja.

Cualquier medio que se haya contaminado debe ser esterilizado antes de descartarlo. Las cajas de Petri y otros desechos biológicos deben ser tirados en los contenedores señalados (bolsas indicadas) los cuales serán llevados a esterilizar antes de desecharlos.

El bromuro de etidio es una sustancia mutagénica que debe ser tratada antes de desecharse y debe ser manipulada únicamente con guantes. El bromuro de etidio debe ser desechado en un contenedor etiquetado para tal propósito. Por lo mismo actualmente se deben utilizar colorantes inocuos como el RED-GEL.

Recuerde que existen algunas sustancias que se utilizan en estas técnicas que son potencialmente tóxicas: (Fenol: puede causar quemaduras severas, Acrilamida: neurotóxico; Bromuro de etidio: carcinógeno)

– Estas sustancias no causan daño si se manipulan de forma adecuada. **SIEMPRE SE DEBEN UTILIZAR GUANTES.** Nunca pipetear con la boca cualquiera de estas sustancias. Si accidentalmente se derramara cualquiera de estas sustancias en la piel **INMEDIATAMENTE** enjuague abundantemente con agua e informe al docente.

– Luz Ultravioleta: La exposición a la luz ultravioleta puede causar irritación en los ojos. Debido a que la retina no puede detectar la luz ultravioleta, se puede dañar seriamente los ojos y no darse cuenta hasta 30 mm n a 24 horas después de la exposición. Por tanto, **SIEMPRE** utilice protección en los ojos cuando observe los geles con lámpara de luz ultravioleta.

Bibliografía

Diagnostic Molecular Microbiology. Edited by: David Persing, Thomas Smith, Fred Tenover and Thomas White. American Society for Microbiology. Washington D.C. USA. 1995.

EXTRACCIÓN DE DNA DE PLÁSMIDOS DE BACTERIAS.

Introducción

Los plásmidos son material genético extra cromosómico que se pueden encontrar en numerosas especies de bacterias. Algunos de ellos suelen llevar factores de virulencia como toxinas o resistencia a antimicrobianos. También se utilizan como vectores para la donación de genes en la tecnología del DNA recombinante. Por sus características de ser DNA circular covalentemente cerrado, su técnica de extracción es diferente a la del DNA cromosómico.

Objetivo (s)

Describir el fundamento, técnica y limitaciones de la técnica de extracción de DNA de plásmidos Desarrollar la técnica para obtención de DNA de plásmidos.

Materiales, equipo y reactivos

Cultivo de *E. coli* portadora de un plásmido

Microcentrífuga

Vortex

Micropipetas

Puntas para micropipetas

Micro tubos de 1.5ml

Pipetas

Guantes desechables

Isopropanol

Etanol

Estuches comerciales. (QIAGEN).

Procedimiento experimental.

1. Centrifugar a 3500 rpm 3-5 mL del cultivo bacteriano incubado toda la noche a temperatura de 37°C, tirar el medio de cultivo y colocar el botón en un micro tubo de 1.5 mL
2. Resuspender el botón bacteriano en 0.3 mililitros de amortiguador P 1, al que se le agregó previamente la RNAsa a mezcla vigorosamente en un vórtex
3. Adicionar 0.3 mL de amortiguador P2 mezclar vigorosamente por inversión del tubo de 4 a 6 veces e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Adicionar 0.3 mL de amortiguador P3 previamente enfriado, mezclar inmediatamente y con fuerza por inversión de 4 a 6 veces e incubar en hielo por 5 minutos.
5. Centrifugar a máxima velocidad en micro centrífuga por 10 min. Remover el sobrenadante el cual contiene el DNA plasmídico.
6. Equilibrar la columna QIAGEN® tip 20 aplicándole 1 ml de amortiguador QBT y permitir que la columna se vacíe por gravedad.
7. Adicionar el sobrenadante plasmídico a la columna QIAGEN® tip 20 y permitir que atravesase la resina por gravedad.
8. Lavar la columna QIAGEN® tip 20 2 veces con 2 ml de amortiguador QC.
9. Eluir el DNA con 0,8 ml de amortiguador QF.
10. Precipitar el DNA por adición de 0,7 volúmenes de isopropanol (a temperatura ambiente) por cada volumen de DNA (en este caso con 0.56 ml). Mezclar y centrifugar a 10000 rpm por 30 mm n en micro centrífuga. Decantar cuidadosamente el sobrenadante. II. Lavar el botón de DNA con 1 ml de etanol al 70% y centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos. Decantar cuidadosamente el sobrenadante sin deshacer el precipitado.
11. Secar el botón, resuspender el DNA plasmídico en un volumen suficiente de amortiguador (Ej. Amortiguador TE pH 8,0 ó 10 mM de Tris-CI pH 8,5).

12. Se puede usar el DNA resuspendido inmediatamente o se puede congelar para su uso posterior

Electroforesis en gel de agarosa

I. Preparación de solución de TAE (1 Litro) 40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 2 mM Na₂EDTA a pH 7,9-8,1

2. Pesar 4.84 g de Tris y 0,744 g de EDTA y disolver en 500-600 ml de agua desionizada, una vez disueltos ajustar el pH con ácido acético glacial hasta llegar al pH antes mencionado, si el cambio de pH es muy rápido agregar 200 ml más de agua y seguir ajustando el pH, una vez llegado al valor de pH deseado se termina de agregar el agua y se mezcla bien la solución.
3. Una vez hecha la solución, guardar en refrigeración para su uso posterior.

Preparación del gel de agarosa al 0.7% en TAE:

- En un matraz Erlenmeyer pesar 0,175 g de agarosa, agregar 25 ml de amortiguador TAE y registrar el peso.
- Disolver la agarosa en un horno de microondas por 5 seg. a nivel de poder 6. Esto se repite cuantas veces sea necesario.
- Al disolverse por completo volver a pesar y recuperar el peso faltante con H₂O, dejar enfriar.
- - Verter en la cámara de electroforesis con el peine de 8 pozos y dejar que solidifique.
- Carga de la muestra:
- Colocar 2 µl de amortiguador de carga sobre un pedazo de Parafilm.-Inmediatamente colocar 5 µl de plásmido obtenido, hacer la mezcla de ambos y cargar en los pozos del gel, sin dispersar la muestra. Correr el gel de 45 a 60 minutos a un voltaje de 85 V.
- Revelado del gel:
- Se utiliza una solución de bromuro de etidio (5 µl en 100 ml) en agua, o reactivo RED-GEL revelar por aproximadamente 10 minutos y después enjuagar por 5 minutos más en agua desionizada.

MECANISMO DE ELIMINACIÓN DE RESIDUOS: actividades de desecho de materiales (pertinentes con la noción de sustentabilidad) procedimientos generales en laboratorio y consideraciones de seguridad

Cualquier agar solidificado o agarosa que no esté contaminado debe tirarse a la basura en un contenedor con una bolsa de plástico específica para esos desechos. No debe por ningún motivo desecharse en la tarja.

Cualquier medio que se haya contaminado debe ser esterilizado antes de descartarlo. Las cajas de Petri y otros desechos biológicos deben ser tirados en los contenedores señalados (bolsas indicadas) los cuales serán llevados a esterilizar antes de desecharlos.

El bromuro de etidio es una sustancia mutagénica que debe ser tratada antes de desecharse y debe ser manipulada únicamente con guantes. El bromuro de etidio debe ser desechado en un contenedor etiquetado para tal propósito. Por lo mismo actualmente se deben utilizar colorantes inocuos como el RED-GEL.

Recuerde que existen algunas sustancias que se utilizan en estas técnicas que son potencialmente tóxicas: (Fenol: puede causar quemaduras severas, Acrilamida: neurotóxico; Bromuro de etidio: carcinógeno)

- Estas sustancias no causan daño si se manipulan de forma adecuada. **SIEMPRE SE DEBEN UTILIZAR GUANTES.** Nunca pipetear con la boca cualquiera de estas sustancias. Si accidentalmente se derramara cualquiera de estas sustancias en la piel **INMEDIATAMENTE** enjuague abundantemente con agua e informe al docente.
- Luz Ultravioleta: La exposición a la luz ultravioleta puede causar irritación en los ojos. Debido a que la retina no puede detectar la luz ultravioleta, se puede dañar seriamente los ojos y no darse cuenta hasta 30 mm n a 24 horas después de la exposición. Por tanto, **SIEMPRE** utilice protección en los ojos cuando observe los geles con lámpara de luz ultravioleta.

SESIÓN EXPERIMENTAL IV

DIGESTION DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Introducción

Las enzimas o endonucleasas de restricción son enzimas bacterianas que cortan los enlaces fosfodiéster de las cadenas dobles de DNA. Estas enzimas pueden ser utilizadas para cortar el ADN en fragmentos definidos y se puede generar un mapa al analizar los sitios que se sobrelapan entre los fragmentos que se generan al digerir el ADN con enzimas de restricción. Cada enzima de restricción reconoce un sitio específico, que puede ser de 4-6 pares de bases, donde va a cortar en el dúplex de ADN. La enzima va a cortar el ADN en cada punto en el que la secuencia que reconozca aparezca. Enzimas de restricción diferentes presentan diferentes sitios de reconocimiento.

Cuando una molécula de ADN es cortada con una enzima de restricción, el ADN es cortado en diferentes fragmentos. Estos fragmentos pueden ser separados en base a sus tamaños por electroforesis en gel. El ADN cortado, se coloca en la parte superior del gel ya sea de agarosa o poliacrilamida. Cuando se aplica una corriente eléctrica al gel, cada fragmento se desplazará a una velocidad inversamente relacionada con el log de su peso molecular. Esta migración de los fragmentos producirá una serie de bandas. Cada banda corresponde a un fragmento de un tamaño en particular.

Objetivo

Que el alumno analice los patrones de restricción obtenidos a partir de la digestión de una muestra de ADN con diferentes enzimas de restricción.

Materiales, equipo y reactivos

Amortiguador para la enzima de restricción

ADN

Agua estéril

Enzima o enzimas de restricción

Microtubos estériles

Puntas para micropipeta estériles

Microcentrífuga

Baño de temperatura a 37°C

Guantes desechables

Procedimiento experimental

1. Adicionar a un microtubo: 2 microlitros de amortiguador (10X) apropiado para la enzima de restricción a utilizar; 0.1- 5 microlitros de ADN y Agua estéril a un volumen final de 20 microlitros
2. Adicionar de 1 a 2 microlitros (3 a 20 unidades) de enzima y mezclar suavemente. Centrifugar por unos segundos en la microcentrífuga.
3. Incubar a la temperatura indicada para la enzima a utilizar (por lo general a 37° C) de 1 a 2 horas.
4. Correr un gel de agarosa para observar la digestión. Seguir instrucciones ya mencionadas para correr gel en agarosa

Forma de presentación y discusión de resultados para las 3 sesiones experimentales.

Los alumnos entregarán un reporte escrito de la práctica realizada que comprenda los siguientes puntos: Título, Marco teórico, Análisis de la técnica, Resultados, Discusión, Conclusiones y Bibliografía.

Bibliografía

Diagnostic Molecular Microbiology. Edited by: David Persing, Thomas Smith, Fred Tenover and Thomas White. American Society for Microbiology.

Washington D.C. USA. 1995.

MECANISMO DE ELIMINACIÓN DE RESIDUOS: actividades de desecho de materiales (pertinentes con la noción de sustentabilidad) procedimientos generales en laboratorio y consideraciones de seguridad

Cualquier agar solidificado o agarosa que no esté contaminado debe tirarse a la basura en un contenedor con una bolsa de plástico específica para esos desechos. No debe por ningún motivo desecharse en la tarja.

Cualquier medio que se haya contaminado debe ser esterilizado antes de descartarlo. Las cajas de Petri y otros desechos biológicos deben ser tirados en los contenedores señalados (bolsas indicadas) los cuales serán llevados a esterilizar antes de desecharlos.

El bromuro de etidio es una sustancia mutagénica que debe ser tratada antes de desecharse y debe ser manipulada únicamente con guantes. El bromuro de etidio debe ser desechado en un contenedor etiquetado para tal propósito. Por lo mismo actualmente se deben utilizar colorantes inocuos como el RED-GEL.

Recuerde que existen algunas sustancias que se utilizan en estas técnicas que son potencialmente tóxicas: (Fenol: puede causar quemaduras severas, Acrilamida: neurotóxico; Bromuro de etidio: carcinógeno)

- Estas sustancias no causan daño si se manipulan de forma adecuada. **SIEMPRE SE DEBEN UTILIZAR GUANTES.** Nunca pipetear con la boca cualquiera de estas sustancias. Si accidentalmente se derramara cualquiera de estas sustancias en la piel **INMEDIATAMENTE** enjuague abundantemente con agua e informe al docente.
- Luz Ultravioleta: La exposición a la luz ultravioleta puede causar irritación en los ojos. Debido a que la retina no puede detectar la luz ultravioleta, se puede dañar seriamente los ojos y no darse cuenta hasta 30 mm n a 24 horas después de la exposición. Por tanto, **SIEMPRE** utilice protección en los ojos cuando observe los geles con lámpara de luz ultravioleta.

BIBLIOGRAFÍA NECESARIA O RECOMENDABLE

1. Alan, E., Gutmacher, M.D., Collins, F.S. (2003). Welcome to the genomic era. *N. Engl. J. Med.*, 349(10):996-8.
2. Balmain, A., Gray, J., Ponder, B. (2003). The genetics and genomics of cancer. *Nature. Genet.* 33: 238-244.
3. Bostein, D, Risch, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat. Genet.* 33:228-236.
4. Brown, T.A. (2006). *Genomes bios*, Ed. Scientific Publishers Ltd., UK.
5. Bruijn, F.J. (2011). *Molecular microbial ecology I*. Ed. Wiley-Blackwell, USA. Clayton E. Ethical, legal, and social implications of genomic medicine. *N Engl Med* 2003; 349:562-9.
6. Comisión Nacional de Bioética. (2002). *Código de bioética para el personal de salud*. Ed. Secretaría de Salud, México.
7. Comisión Nacional de Bioética. (2002). *Reglamento de la ley general de salud en materia de Investigación para la salud*. Ed. Secretaría de Salud, México.
8. Del Castillo, R.V., Uranga, H.R.J., Zafra, R.G. (2012). *Genética clínica*. Ed. Manuel Moderno, México.
9. DNA Learning Center. <http://www.dnalc.org/websites/>. Cold Spring Harbor Laboratory
Dongyou L. (2011). *Molecular detection of human bacterial pathogens*. Ed. CRC Press, USA.
10. Glick, B. y Pasternack, J. (2010). *Molecular biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA*, 4a ed. Ed. ASM Press, USA.
11. Griffith, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H., Lewontin, R.C. (2013). *Genética moderna*. 1ª ed. Ed. McGraw-Hill Inter., México.
12. Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R.M., Rainer, F. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins, *Nat. Biotech.*, 22(11):1414-22.
13. Herráez, S.A. (2012). *Texto ilustrado e interactivo de biología molecular e ingeniería genética*. 2ª ed. Ed. Elsevier, España.
14. Jiménez-Sánchez G. (2003). Developing a platform for genomic medicine in México. *Science*, 300:295-296.
15. Kanehisa, M. y Bork P. (2003). *Bioinformatics in the post-sequence era*. *Nat. Genet.*, suppl.33:305-310.
16. Klug, W.S., Cummings, M.R. y Spencer, C.A. (2008). *Conceptos de genética*. 8ª ed. Ed. Pearson, USA.
17. Krebs, J.E., Goldstein, E.S. y Kilpatrick, S.E. (2011). *Lewin's gene X*. Ed. Jones and Bartlett Publishers, USA.
18. Lares, A.I. (2005). *Farmacología clínica en pediatría. Conceptos de farmacocinética y farmacogenómica*. Ed. Prado, México.
19. Learn Genetics. Genetic science learning center. <http://learn.genetics.utah.edu/es/>. The University of Utah.
20. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H, Amon, A. y Scott, M.P. (2012). *Molecular Cell Biology*. 7a ed. Ed. W.H. Freeman & Co. USA.
21. López, M., Dorado, P., Monroy, N., Alonso, M.E., Jung-Cook, H., Machín, E., Peñas-Lledó, E. y Llerena A. (2011). Pharmacogenetics of the antiepileptic drugs phenytoin and lamotrigine. *Drug Metab. Drug. Interact.* 26(1):5-12.
22. López-López, M., Guerrero-Camacho, J.L., Familiar-López, I.M., Jung-Cook, H., Corona, T. y Alonso-Vilatela, M.E. (2004). Farmacogenómica: búsqueda de la terapia personalizada. *Rev. Neurol.* 39:1063-71.
23. Luque, J. y Herráez, A. (2001). *Biología molecular e ingeniería genética*. Ed. Elsevier, España.
24. Ma Q, Lu AYH. Pharmacogenetics, pharmacogenomics and individualized medicine. *Pharmacol. Rev.* 2011; 63:437-59.
25. Novartis Foundation. (2000). *From genome to therapy: Integrating new technologies with drug development*. Ed. Wiley. USA.

26. Nussbaum, R, McInnes, R. Willard, H. (2007). *Thompson and Thompson Genetics in medicine*. 7ª ed. Ed. Saunders, Elsevier. USA
27. Pérez-Tamayo, R. (2005). La ley, la ética médica y los trasplantes. *Rev. Invest. Clin.* 57(2): 170-176.
28. Persing, D.H., Tenover, C.F., Versalovic, J., Tang, Wi-Wei, et al. (2004). *Molecular Microbiology*. Ed. ASM Press, USA.
29. Pharmacogenomics and pharmacogenetics. <http://www.yourgenome.org/sis/pharm/index.shtml> Wellcome Trust Sanger Institute´s.
30. Philips, K.A., Vennstra, D., Van Bebber, S. y Sakowski, J. (2003). An introduction to cost-effectiveness and cost-benefit analysis of pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*, 4:231-239.
31. Reddy, C.A. (2007). *Methods for general and molecular microbiology*. 3a ed. Ed. ASM PRESS. USA
32. Russell, Pi. (2003). *Genetics*. 6a ed. Ed. Addison Wesley Longman, Inc. USA.
33. Sachse, K., Frey, J. (2003) *PCR Detection of microbial pathogens. Methods in molecular biology*. Vol 216. Ed. Human Press USA.
34. Salemme, F.R. (2003). Chemical genomics as an emerging paradigm for postgenomic drug discovery. *Pharmacogenomics*. 4(3):257-267.

MODALIDADES DE EVALUACIÓN GLOBAL

- | | |
|-----------------------------|-----|
| 1. Evaluación objetiva | 40% |
| 2. Participación | 20% |
| 3. Trabajo de investigación | 40% |

Para ser considerados todos los rubros, deberá tener calificación aprobatoria en cada uno de ellos.

La calificación final será el promedio de los tres rubros anteriores, siempre y cuando sean aprobatorias. Si alguna de ellas es inferior a 6, la calificación final será NA.

MODALIDADES DE EVALUACIÓN DE RECUPERACION

Sólo podrá tener derecho a examen si el alumno ha aprobado el trabajo de investigación. El examen teórico se basará en los contenidos de la UEA.

Equivalencias

Evaluación	Desde	Hasta	Significa
MB	8.67	10.00	Muy bien
B	7.34	8.66	Bien
S	6.00	7.33	Suficiente
NA	cero	5.99	No acreditado