



Ministerio de Cultura y Educación  
 Universidad Nacional de San Luis  
 Facultad de Química Bioquímica y Farmacia  
 Departamento: Bioquímica y Cs Biológicas  
 Área: Biología Molecular

(Programa del año 2014)

### I - Oferta Académica

Materia	Carrera	Plan	Año	Período
BIOQUIMICA AVANZADA	LIC. EN BIOLOGIA MOLECULAR	11/06	2014	1° cuatrimestre

### II - Equipo Docente

Docente	Función	Cargo	Dedicación
ALVAREZ, SERGIO EDUARDO	Prof. Responsable	P.Adj Simp	10 Hs
RAMIREZ, DARIO CEFERINO	Prof. Colaborador	P.Adj Exc	40 Hs
ARCE, MARIA ELENA	Auxiliar de Práctico	A.1ra Exc	40 Hs
MANZUR, MARIA JIMENA	Auxiliar de Práctico	JTP Exc	40 Hs
TORRES BASSO, MARIA BELEN	Auxiliar de Práctico	A.1ra Semi	20 Hs
SEGUIN, LEONARDO ROQUE	Auxiliar de Laboratorio	A.1ra Semi	20 Hs

### III - Características del Curso

Credito Horario Semanal				
Teórico/Práctico	Teóricas	Prácticas de Aula	Práct. de lab/ camp/ Resid/ PIP, etc.	Total
4 Hs	0 Hs	2 Hs	2 Hs	8 Hs

Tipificación	Periodo
B - Teoría con prácticas de aula y laboratorio	1° Cuatrimestre

Duración			
Desde	Hasta	Cantidad de Semanas	Cantidad de Horas
12/03/2014	19/06/2014	15	120

### IV - Fundamentación

El presente curso está destinado a alumnos de 4to año de Lic. en Biología Molecular. Tiene como finalidad comprender mecanismos celulares y moleculares relevantes en la fisiología celular tanto en condiciones normales como patológicas, con especial énfasis en procesos de reconocimiento y la respuesta de las células a estímulos provenientes del medio ambiente. En una primera fase del curso se estudiarán los procesos de interacción hormona-receptor y droga-receptor desde el punto de vista bioquímico y farmacológico. Se analizan diferentes metodologías para el estudio de la interacción ligando-receptor y de sus mecanismos de transducción. Finalmente se estudiarán mecanismos de recepción del mensaje y transducción del mismo al medio intracelular siempre en el contexto de procesos fisiológicos de relevancia como proliferación y crecimiento celular, apoptosis, estrés oxidativo, inflamación y cáncer.

Los temas teóricos serán integrados mediante la lectura y el análisis de artículos de investigación relevantes. El curso tiene una modalidad teórico-práctica, con activa participación de los alumnos, a través de seminarios y discusión de problemas. Los Trabajos Prácticos de laboratorio, requieren de una modalidad en un módulo compacto de 40 hs, que se dictan en una semana dedicada exclusivamente a la práctica.

### V - Objetivos / Resultados de Aprendizaje

1. Permitir que el alumno comprenda los procesos de reconocimiento y su importante rol en el funcionamiento del organismo.
2. Capacitar al alumno en el análisis y evaluación de trabajos publicados, promoviendo una actitud crítica en el análisis de los

mismos.

3. Capacitación experimental del alumno en técnicas de laboratorio de uso común en el estudio de mecanismos de transducción de señal.

4. Alcanzar que el alumno integre los mecanismos moleculares dentro del contexto global de procesos fisiopatológicos importantes para el funcionamiento celular.

## VI - Contenidos

### Programa Desarrollado

TEMA 1. El reconocimiento molecular en procesos bioquímicos. Interacción hormona-receptor, droga-receptor, enzima-sustrato, DNA-proteína de binding, etc. Procesos físico-químicos que determinan el reconocimiento molecular. Tipos de energías de interacción que participan en los procesos mencionados.

TEMA 2. Técnicas bioquímicas de uso común del laboratorio bioquímico. Métodos separativos: filtración por tamices moleculares. Cromatografía por intercambio iónico. Cromatografía de afinidad. Ultrafiltración. Solubilización y determinación de concentración de proteínas.

TEMA 3. Principios de separación y aplicaciones. SDS-PAGE. Separación de proteínas. Western e inmunoblotting para la identificación de proteínas. Inmunoprecipitación como método de análisis, identificación y purificación de proteínas. Pull down. Ultra centrifugación. Aplicaciones.

Métodos de importancia en Biología Molecular. Proteómica: MALDI-TOF. RNA de interferencia: Aplicaciones

TEMA 3. Receptores. Concepto de receptores. Propiedades del receptor biológico. Teoría de receptores. Curva de saturación. Gráfico de Scatchard. Interpretación de resultados experimentales. Estimación del  $K_d$  y  $N$ . Significado de los sitios de binding. Cinética del binding de receptores Curvas de asociación-disociación. Estimación del  $K_d$  a partir del estudio cinético. Estudios de competencia: curvas de desplazamiento. Estimación de  $IC_{50}$  y  $K_i$ . Métodos de estudio y análisis de resultados.

TEMA 4. Receptores de membrana: aspectos prácticos del estudio de receptores de membrana. Métodos de preparación. Ensayo de binding. Métodos de separación del ligando 'libre' del ligando 'unido'. Solubilización de receptores. Aspectos experimentales. Caracterización bioquímica y molecular de los receptores. Análisis de casos. Resolución de problemas.

TEMA 5. Clasificación de los receptores sobre la base de su estructura y mecanismos de transducción. Estructura de los receptores y mecanismos de transducción. Diferentes tipos de señales según el tipo de receptor. Receptores acoplados a canales iónicos. Receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Receptores con propiedades autocatalíticas.

TEMA 6. Proteínas G. Diferentes tipos de proteína G y su acoplamiento. Control dual de la adenilato ciclasa. Acoplamiento a la adenilato ciclasa vía la subunidad  $\alpha_s$  (estimuladora) o  $\alpha_i$  (inhibitoria). Activación de proteína quinasa A (PKA).

TEMA 7. Modelos de receptor. Modelo de dos estados del receptor y modelo de tres estados. Mutantes CAM: mutantes constitutivamente activadas. Significado biológico de las mismas. Situaciones patológicas. Resolución de problemas. Regulación 'up' y 'down' del número de receptores. Desensibilización.

TEMA 8. Mensajeros intracelulares: formas de acoplamiento, señalización intracelular y sus métodos de estudio. Ensayos in vitro o in vivo para el estudio de la respuesta biológica. Metabolismo de inositol fosfato como respuesta a la activación de receptores. Recambio de fosfolípidos. Proteínas G involucradas. Diferentes niveles de regulación. Activación de proteínas quinasas por DAG (diacilglicerol). Movilización de iones  $Ca^{++}$  y activación de proteína quinasa C. Mecanismos asociados a proliferación: PI3K y AKT.

TEMA 9. Receptores autocatalíticos. Autofosforilación y proteínas tirosina quinasas. Mecanismos de fosforilación y defosforilación de proteínas. Activación de tirosina quinasas. Estructura del dominio catalítico. Proteínas tirosina fosfatasas. Cascadas de proteínas fosforiladas y activación de MAP quinasas. Dominios de unión a fosfoproteínas. Mutantes constitutivamente activos y dominantes negativos. Cross-talk entre receptores.

TEMA 10. Receptores asociados a enzimas. Receptores de citoquinas y activación de la vía JAK-STAT. Receptores de TGF $\beta$  y las proteínas Smad. Relación con procesos de desarrollo y regulación génica. Interacción en la activación de diferentes proteínas quinasas. Receptores de histidina quinasa en plantas.

TEMA 11. Muerte celular programada: Apoptosis. Necrosis vs apoptosis. Morfología. Mecanismos intrínsecos y extrínsecos. Señalización: Caspasas; citocromo C. Métodos de estudio. Anexina-Ioduro de propidio.

TEMA 12: Estrés oxidativo. Especies reactivas: ¿cómo se generan?. Peroxidasa, NADPH oxidasa. Antioxidantes: Superoxido dismutasa, catalasa, glutatión. Peroxidación de macromoléculas: lípidos, DNA y proteínas. Relación con diversos procesos fisiopatológicos: apoptosis, cáncer, hipoxia. El NO como intermediario en la transducción de señales. Interrelación entre distintas células mediada por la formación de NO. Estrés del retículo endoplásmico. Especies reactivas y enfermedades inflamatorias. Métodos para detectar radicales libres.

TEMA 13: Cáncer e inflamación. Características básicas. El factor NF- $\kappa$ B como regulador de ambos procesos. Vía clásica vs

vía alternativa. Ubiquitinación. Métodos de estudio. Microambiente tumoral. Mecanismos de resistencia: paradoja de las MAPK.

## VII - Plan de Trabajos Prácticos

La guía de Trab. Pcos. contiene las medidas de seguridad para trabajar en el laboratorio.

1. Ensayo de binding- Práctico demostrativo con soluciones simuladas.
2. Práctico de Bioinformática: búsqueda bibliográfica a través de la Medline.
3. Ultrafiltración: Filtros microcon
4. Preparación de membranas a partir de tejido de rata.
5. Solubilización de proteínas.
6. Determinación de la concentración de proteínas mediante absorbancia a 280 nm y mediante la metodología de Bradford.
7. Ensayos de fosforilación de proteínas
8. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE.
9. Transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF.
10. Reconocimiento de proteínas tirosin fosforiladas mediante Western blot.

SEMINARIOS: se propondrán seminarios de discusión de trabajos de reciente publicación sobre los temas desarrollados durante el curso de las revistas Cell, J.Biol. Chem., Nature u otros de interés para el desarrollo del curso.

## VIII - Regimen de Aprobación

EVALUACION: Se propone una evaluación continua del curso con posibilidad de Promoción sin examen, para lo cual se deben cumplir los siguientes requerimientos:

- a. Se requiere una asistencia del 80 % a las clases teórico-prácticas.
- b. Se realizará una evaluación continua del alumno a través de su participación en clase, evaluaciones y mediante seminarios a presentar por los alumnos.
- c. Aprobación de tres evaluaciones parciales, con carácter teórico- práctico. Incluye resolución e interpretación de figuras y problemas combinada con preguntas de opción múltiple.
- d. Para mantener la condición de alumno promocional, los parciales deben ser aprobados en primera instancia.
- e. Aprobación de los trabajos prácticos de laboratorio, los cuales tienen el carácter de irrecuperables por sus características y el costo de los mismos.
- f. Evaluación integradora que puede consistir en un seminario final, investigación bibliográfica o propuesta de un plan de trabajo y seminario, determinado por el profesor oportunamente.

Para alumnos regulares:

Se deben cumplir los requisitos anteriores, a excepción del f, con las siguientes modificaciones:

- a. Asistencia requerida 70%.
- b. Régimen de recuperaciones: de acuerdo a las ordenanzas vigentes.

## IX - Bibliografía Básica

- [1] 1. Biología Molecular de la Célula - 3ra. Edición. Autores: Albert y col.
- [2] 2. Recombinant -DNA- 2nd. Edition. Autores: Watson, J.D, Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, L Editorial: Scientific American Books-.
- [3] 3. Biología Celular y Molecular- Lodish, y col. 4ta. Ed. 2003.
- [4] 4. G-proteins as mediators of cellular signalling processes. M.D. Houslay and G. Milligan.
- [5] 5. Receptor-effector coupling. Hulme E.C.(Ed.). IRL Press
- [6] 6. Receptor-Ligand interactions. A practical approach. Hulme E.C. (Ed.)IRL Press
- [7] 7. Protein purification. A practical approach. IRL Press
- [8] 8. Affinity Chromatography. Pharmacia.

## X - Bibliografía Complementaria

- [1] 1. Phosphatases in Cell metabolism and signal transduction. Vincent J.B.y Crowder, M.W. Springer-Verlag, Germany.

1995.

[2] 2. Revistas como Cell, Nature, J. Biol. Cell, Science y PNAS entre otras. Publicaciones periódicas de donde se elegirán los seminarios.

## **XI - Resumen de Objetivos**

1. Permitir que el alumno comprenda los procesos de reconocimiento y su importante rol en el funcionamiento del organismo.
2. Capacitar al alumno en el análisis y evaluación de trabajos publicados, promoviendo una actitud crítica en el análisis de los mismos.
3. Capacitación experimental del alumno en técnicas de laboratorio de uso común en el estudio de mecanismos de transducción de señal.
4. Alcanzar que el alumno integre los mecanismos moleculares dentro del contexto global de procesos fisiopatológicos importantes para el funcionamiento celular.

## **XII - Resumen del Programa**

TEMA 1. El reconocimiento molecular en procesos bioquímicos.

TEMA 2. Técnicas bioquímicas de uso común del laboratorio bioquímico.

TEMA 3. Principios de separación y aplicaciones.

TEMA 3. Receptores.

TEMA 4. Receptores de membrana.

TEMA 5. Clasificación de los receptores.

TEMA 6. Proteínas G.

TEMA 7. Modelos de receptor.

TEMA 8. Mensajeros intracelulares.

TEMA 9. Receptores autocatalíticos.

TEMA 10. Receptores asociados a enzimas.

TEMA 11. Muerte celular programada.

TEMA 12: Estrés oxidativo.

TEMA 13: Cáncer e inflamación.

## **XIII - Imprevistos**

La programación podría verse afectada en caso de huelgas o enfermedad de docentes.

La realización de los Trabajos Prácticos está condicionada a la disponibilidad de recursos.

## **XIV - Otros**