



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

**(Programa del año 2016)**

### **I - Oferta Académica**

| <b>Materia</b>                                                               | <b>Carrera</b>     | <b>Plan</b> | <b>Año</b> | <b>Período</b>  |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------|------------|-----------------|
| (OPTATIVA I(L.B.11/10)) TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS EN BIOQUÍMICA CLÍNICA | LIC. EN BIOQUÍMICA | 11/10       | 2016       | 1° cuatrimestre |

### **II - Equipo Docente**

| <b>Docente</b>            | <b>Función</b>          | <b>Cargo</b> | <b>Dedicación</b> |
|---------------------------|-------------------------|--------------|-------------------|
| VARAS, SILVIA MABEL       | Prof. Responsable       | P.Adj Exc    | 40 Hs             |
| FERRAMOLA, MARIANA LUCILA | Responsable de Práctico | JTP Exc      | 40 Hs             |
| LACOSTE, MARIA GABRIELA   | Responsable de Práctico | JTP Semi     | 20 Hs             |
| ARIAS, JOSE LUIS          | Auxiliar de Práctico    | A.1ra Exc    | 40 Hs             |

### **III - Características del Curso**

| <b>Credito Horario Semanal</b> |                 |                          |                                              |              |
|--------------------------------|-----------------|--------------------------|----------------------------------------------|--------------|
| <b>Teórico/Práctico</b>        | <b>Teóricas</b> | <b>Prácticas de Aula</b> | <b>Práct. de lab/ camp/ Resid/ PIP, etc.</b> | <b>Total</b> |
| Hs                             | 10 Hs           | Hs                       | 20 Hs                                        | 30 Hs        |

| <b>Tipificación</b>                            | <b>Periodo</b>  |
|------------------------------------------------|-----------------|
| B - Teoría con prácticas de aula y laboratorio | 1° Cuatrimestre |

| <b>Duración</b> |              |                            |                          |
|-----------------|--------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>Desde</b>    | <b>Hasta</b> | <b>Cantidad de Semanas</b> | <b>Cantidad de Horas</b> |
| 26/06/2016      | 07/07/2016   | 2                          | 60                       |

### **IV - Fundamentación**

Las técnicas de biología molecular, en la actualidad, son esenciales en el laboratorio clínico. Representan una herramienta para el diagnóstico, confirmación y seguimiento de numerosas patologías neonatales, metabólicas y proliferativas. El dictado del Curso se fundamenta en la necesidad del estudiante de la Licenciatura en Bioquímica de adquirir mayores destrezas en la realización de técnicas de biología molecular aplicables al diagnóstico de distintas enfermedades humanas.

### **V - Objetivos / Resultados de Aprendizaje**

General: brindar al alumno práctica en técnicas moleculares realizables en un laboratorio clínico, que sirvan para la detección molecular de alteraciones a nivel de ADN y/o proteínas que sean origen de distintas patologías humanas.

Particulares:

- Conocer y manejar el equipamiento mínimo necesario para un laboratorio molecular.
- Diseñar y llevar a cabo un protocolo molecular en su laboratorio de bioquímica clínica.
- Detectar y resolver los problemas prácticos del uso de técnicas moleculares: reactivos, contaminación, controles, etc.
- Entrenamiento en la interpretación de geles e informe de resultados.

-Resaltar el uso de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico clínico de cáncer, enfermedades hereditarias y metabólicas.

## VI - Contenidos

### Tema N° 1

Genoma Humano. Proyecto Genoma Humano. Controversias Éticas. Mutaciones más comunes según HGMD (Human Gene Mutation Database). Deleciones y Mutaciones puntuales. Nomenclatura internacional. Polimorfismos (SNPs). Estrategias de laboratorio. Material e instrumental usado en un laboratorio de biología molecular.

### Tema N° 2

Reacción de PCR: Historia, definición, ventajas y desventajas. Eficiencia de una PCR: equilibrio entre especificidad, rendimiento y fidelidad. Requisitos para una amplificación selectiva. Variables que afectan el rendimiento. Tipos de ADN polimerasas: Taq, Tli, Pfu orígenes y características. Optimización de una reacción de PCR: elección de los iniciadores o cebadores, temperatura de annealing, concentración de magnesio y nucleótidos y número de ciclos. Fase plateau: causas.

### Tema N°3

Técnicas usadas para la determinación de deleciones e inserciones. Otras variantes de PCR: SSCP, RFLP-PCR, RT-PCR. PCR de tiempo real: bases. Usos en bioquímica clínica.

### Tema N° 4:

Conceptos básicos de Bioinformática. Diseño de oligos. Uso de herramientas del Internet para la búsqueda de secuencias de un gen en particular y diseño de oligos o iniciadores. Uso del BLAST.

### Tema N° 5

Técnicas usadas para la determinación de mutaciones puntuales. MAS-PCR, ARMS, mutagénesis mediada por PCR, Dot blot y Dot Blot reverso.

### Tema N° 6

Nuevas plataformas diagnósticas usadas en screening moleculares: Dot Blot-r (reverse dot blot hybridization), OLA (oligonucleotide ligation assay), Tepnel (Elucigene), xTAG, MOL-PCR (assay multiplex oligonucleotide ligation-PCR). Fundamentos. Discusión de seminarios.

## VII - Plan de Trabajos Prácticos

### TRABAJOS PRACTICOS DE LABORATORIO

#### Tema 1:

TP1: Diseño de oligonucleótidos: uso de programas para diseño de oligos. Chequeo de secuencias. Búsqueda de secuencias de cortes específicas de enzimas de restricción.

TP2: Extracción de sangre por punción venosa. Extracción de ADN. Determinación de índice de pureza y cuantificación.

#### Tema 2:

TP3: PCR-I: Identificación de mutaciones por mutagenesis mediada por PCR. Preparación y armado de geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.

TP4: Siembra y revelado de PCR-I. Detección de portadores de la mutación en el gen CFTR.

PCR- ER I (RFLP-PCR) Corte con enzima de restricción del producto amplificado. Armado y corrida de geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Tinción de geles. Detección de enfermos fibroquísticos. Informe.

#### Tema 3:

TP5: PCR-II: MAS-PCR: detección de 4 mutaciones con primers alelo específicos. Armado y corrida de geles de agarosa. Tinción de geles. Observación de resultados e informe.

TP6: PCR-III:ARMS-PCR. Genotipificación de Apo E.

#### Tema4:

TP7: ARMS-PCR. Genotipificación por PCR. Alelos de Apo E. Armado y corrida de geles de agarosa. Tinción de geles. Observación de resultados e informe. Polimorfismos detectados.

TP8: PCR-IV: RFLP-PCR II: Amplificación de un fragmento del exón 10, del gen GALT (Galactosa 1- Fosfato Uridil Transferasa).

Tema5:

TP9: Armado y corrida de geles de agarosa. Tinción de geles. Observación de resultados e informe. Determinación Polimorfismo N314D para detección del Alelo Duarte en Galactosémicos.

TP10: Integración final y discusión de los resultados hallados. Exposición de seminarios.

## VIII - Regimen de Aprobación

La evaluación se lleva a cabo en forma continua a través de exposición de seminarios sobre conceptos teóricos y discusión de técnicas realizadas.

Alumnos Regulares:

1-El alumno estará en condiciones de cursar “Técnicas moleculares usadas en bioquímica clínica”, cuando haya regularizado Química Biológica Patológica.

El alumno deberá aprobar el 70% del plan de Trabajos Prácticos del Curso (Ord. N° 13/03 CS Régimen Académico).

2-El alumno deberá aprobar con un 70% un único parcial final integral para regularizar.

Alumnos Promocionales:

El alumno estará en condiciones de promocionar cuando:

1- Haya asistido y aprobado el 80% de los TP.

2- Aprobado con el 80% un único parcial final integral.

## IX - Bibliografía Básica

[1] Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments Publisher: Wiley; 7 edition (2013) ISBN-13: 978-1118206737

[2] Molecular Diagnostics: Current Technology and Applications (Horizon Bioscience) by Juluri R. Roa, Colin C. Fleming, John E. Moore. 2006. ISBN-13: 978-1904933199

[3] Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. By Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns. 2012. ISBN 978-1-4160-6164-9

[4] Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory. 2010. Edited by Wayne W. Grody, Robert M. Nakamura, Frederick L. Kiechle, Charles. ISBN 978-1-12-369428-7

[5] BRS Biochemistry, Molecular Biology, and Genetics, Fifth Edition, By Todd A. Swanson M.D. Ph. D, Sandra I. Kim MD PhD, Marc J. Glucksman PhD. 2009. ISBN-13: 978-0781798754

[6] JD Watson, TA Baker, JP Bell, A Gann, M Levine & R Losick: Molecular Biology of the gene. Fifth Edition. Benjamin Cummings & Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2004.

[7] Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Tomo 1, 2 y 3. 1989 Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2nd edition. Language: English. ISBN-10: 0879693096

[8] Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May; 17(5): 405–424.

## X - Bibliografía Complementaria

[1] Jian Ye, George Coulouris, Irena Zaretskaya, Ioana Cutcutache, Steve Rozen and Thomas L Madden. 2012.

Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 13:134: 1-11

[2] Liliana C. Rossetti, Karen G. Scheps, Amanda Binaghi, María S. Abreu, Mariana T. Mansilla, Viviana Varela. 2010. Diagnóstico molecular de mutaciones beta talasémicas, genotipos complejos. HEMATOLOGIA, Vol. 14 N° 2: x-x Abril-Junio.

[3] Umair Mahmood, Muhammad Imran, Salma Iqbal Naik, Huma Arshad Cheema, Anjum Saeed, Muhammad Arshad, Saqib Mahmood: Detection of common mutations in the GALT gene through ARMS. 2012. Gene 509, 291–294

[4] Michael R. Knowles and Mitchell Drumm: The Influence of Genetics on Cystic Fibrosis Phenotypes. 2012. Cold Spring Harb Perspect Med, 1-13.

- [5] Panayiotis G. Menounos and George P. Patrinos. 2010. Mutation Detection by Single Strand Conformation Polymorphism and Heteroduplex Analysis. Book: Molecular Diagnostics. Chapter 4. Second Edition, 45-58.
- [6] Graham R. Taylor and Carol A. Delaney. 2010. Detection of Genomic Duplications and Deletions. Book: Molecular Diagnostics. Chapter 12. Second Edition, 1715-182
- [7] David M. Holtzman, Joachim Herz and Guojun Bu. 2012. Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease Cold Spring Harb Perspect Med.; 1-23.
- [8] E. Castellanos-Rizaldos, Pingfang Liu, Coren A. Milbury, Minakshi Guha, Angela Brisci, Laura Cremonesi, Maurizio Ferrari, Harvey Mamon, and G. Mike Makrigiorgos. 2012. Temperature-Tolerant COLD-PCR Reduces Temperature Stringency and Enables Robust Mutation Enrichment. Clinical Chemistry 58:7; 1130–1138
- [9] Lap-Chee Tsui and Ruslan Dorfman. 2013. The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspective. Cold Spring Harb Perspect Med; 1-16
- [10] Ramandeep Singh, Babu R. Thapa, Gurjit Kaur, Rajendra Prasad. 2012. Biochemical and molecular characterization of GALT gene from Indian galactosemia patients: Identification of 10 novel mutations and their structural and functional implications. Clinica Chimica Acta 414; 191–196
- [11] Gerard T. Berry et al. The adult galactosemic phenotype. 2012. J Inher Metab Dis. 35:279–286
- [12] Swee Lay Thein. 2013. The Molecular Basis of  $\beta$ -Thalassemia. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1-24
- [13] 2008- Single tube optimisation of APOE genotyping based on melting curve analysis.
- [14] 2009-Apolipoprotein E genotyping method by Real Time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan and FRET assays
- [15] 2010- Sequencing technologies —the next generation.
- [16] 2010-Newborn Screening for Galactosemia: A Review of 5 Years of Data and Audit of a Revised Reporting Approach.
- [17] 2013-Allele-specific polymerase chain reaction for the detection of Alzheimer's disease-related single nucleotide polymorphisms
- [18] 2013-Cost-Effective and Scalable DNA Extraction Method from Dried Blood Spots
- [19] 2013-Detection of MPL Mutations by a Novel Allele-Specific PCR-Based Strategy
- [20] 2013-The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspective
- [21] 2014-APOE and BDNF Val66Met polymorphisms combine to influence episodic memory function in older adults
- [22] 2014-Genomic Technologies and the New Era of Genomic Medicine.
- [23] 2014- Multiplexed, lateral flow, PCR techniques for biological identification

## XI - Resumen de Objetivos

Brindar al alumno de la Licenciatura en Bioquímica prácticas en técnicas moleculares realizables en un laboratorio clínico; en particular PCR y sus numerosas variantes.

## XII - Resumen del Programa

Tema 1: Genoma Humano: constitución. Mutaciones. Estrategias de diagnóstico molecular.

Tema 2: Reacción en cadena de la Polimerasa. Cinética. Componentes.

Tema 3: Técnicas moleculares para la detección de mutaciones deleciones e inserciones.

Tema 4: Diseño de oligos. Uso de Programas.

Tema 5: Técnicas moleculares para la detección de mutaciones puntuales.

Tema 6: Nuevas plataformas diagnósticas moleculares

## XIII - Imprevistos

No corresponde

## XIV - Otros