



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 2017)
(Programa en trámite de aprobación)
(Presentado el 07/12/2017 11:59:38)

I - Oferta Académica

Materia	Carrera	Plan	Año	Período
BIOLOGIA MOLECULAR	LIC. EN BIOLOGIA MOLECULAR	11/06	2017	1° cuatrimestre

II - Equipo Docente

Docente	Función	Cargo	Dedicación
MARSA, SILVANA MARIEL	Prof. Responsable	P.Adj TC	30 Hs
DELLA VEDOVA, MARIA CECILIA	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
Hs	3 Hs	3 Hs	3 Hs	9 Hs

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

Duración			
Desde	Hasta	Cantidad de Semanas	Cantidad de Horas
19/03/2010	23/06/2010	14	120

IV - Fundamentación

En este curso se trabajará en la adquisición de los conocimientos y habilidades básicas de esta disciplina. Se pretende desarrollar el escepticismo crítico que permita al educando analizar contenidos, asociarlos y deducir soluciones a problemas concretos. El alumno debe profundizar los conocimientos relacionados con la replicación, transcripción de células eucarióticas, y traducción.

Los alumnos obtendrán conocimientos sobre biología molecular en plantas. Se dan las bases sobre los mecanismos moleculares que ocurren durante los procesos malignos

V - Objetivos / Resultados de Aprendizaje

- Identificar las estructuras primaria, secundaria y terciaria de ácidos nucleicos.
- Conocer la organización del genoma de los seres vivos
- Comprender e identificar los distintos procesos implicados en el mantenimiento y transferencia de la información contenida en el DNA.
- Analizar el papel de las enzimas y orgánulos implicados en estos procesos: DNA polimerasas, RNA polimerasas y Ribosomas
- Analizar los mecanismos de Transcripción y Traducción en eucariotas.
- Conocer y comprender las técnicas básicas utilizadas en el laboratorio de Biología Molecular
- Adquirir los conocimientos de Biología Molecular en plantas y Biología Molecular del Cáncer

VI - Contenidos

UNIDAD 1: ESTRUCTURA Y EMPAQUETAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

Estructura del DNA. Desnaturalización y renaturalización. Topología del DNA. Topoisomerasas I y II. Estructura del RNA. Ribozima. Plegamiento del RNA en estructuras terciarias. RNasaP. Algunos RNA como enzimas. DNA eucariota. Secuencias específicas que unen DNA a una matriz de interfase. Logotipo de secuencia de SELEX. Organización e contenido del genoma humano. Seudogenes. Cromatina. Inmunoprecipitación cromatínica. Centrómeros, origen de replicación y telómeros. Cohesinas y condensinas. El nucleosoma. Organización del octámero de histonas. Aislantes. Estructura cromatínica de orden superior. Regulación de la estructura cromatínica. Características de los cromosomas en mitosis. Interacciones DNA proteínas en los centrómeros y los telómeros. Posicionamiento nucleosómico. Organización de los genes en el genoma nuclear. Dominios de cromatina. Remodelación de la cromatina. Acetilación de histonas. Modificación de la cromatina y expresión del genoma. Fosforilación y metilación de histonas. Epigenética. Metilasas y metiltransferasas. Carabinas histónicas

UNIDAD 2: AISLAMIENTO, FRAGMENTACIÓN Y MARCADO DE ACIDOS NUCLEICOS

Métodos de obtención de ADN y ARN. Extracción ADN genómico de células y tejidos, huesos humanos, en bacterias Gram negativas, ADN plasmídico, en plantas y animales Obtención de RNA. Determinación de la concentración y pureza del ADN y ARN. Electroforesis Geles desnaturalizantes y no desnaturalizantes. Electroforesis en geles de agarosa y de poliacrilamida. Electroforesis RNA. Enzimas de restricción. Clasificación I, II y III. Mapeo de restricción. Endonucleasa Homing ADN polimerasas. Mecanismos de acción de la DNA polimerasa dependiente de molde. Fragmento de Klenow. ARN polimerasa ARN dependiente. T4 polinucleótido quinasa. Fosfatasa y quinasas Nucleasas. Desoxinucleotidil terminal transferasa. Ligasas Enzimas de modificación Terminal. Transcriptasas reversas. Preparación de sondas de ADN y ARN. Marcación no isotópica. Uso de sondas oligonucleotídicas sintéticas: síntesis, purificación y marcado.

UNIDAD 3: TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA E HIBRIDACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS

Hibridación. T melting. Transferencias a soportes sólidos e hibridaciones. Dot blot. Slot blot. Southern blot. Northern blot. Hibridación en colonias. Secuenciación de ADN; método ddNTPs (Sanger) y de nueva generación (Next Generation Sequencing; NGS). Pirosecuenciación. Mapeo y secuenciación de genomas. Estrategias “shotgun”, “clone by clone” e híbridas. Aplicación de la secuenciación masiva a genómica. Genómica funcional; estrategias masivas para el estudio funcional de los genes. Bioinformática. Caminata cromosómica. Ensamblaje de secuencias contiguas. Método de contigios de clones. Secuenciación aleatoria. Localización de genes. Determinación de las funciones de cada gen. Hibridación “in situ”. MLPA. Ms-MLPA. Microarrays. DMH-Arrays. Test de metilación. COBRA. RLGS. MeDIP. HCG. Detección de mutaciones epigenéticas.

UNIDAD 4: AMPLIFICACIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y SUS APLICACIONES

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ADN polimerasas termoestables. Principios y estrategias de optimización de protocolos de PCR. Primers. Diseño de primers. Los nucleótidos. Las polimerasas. Identificación de los productos de PCR. RT PCR. Long PCR. Hot Start. RT-PCR in situ. Nested PCR. PCR asimétrica. PCR reversa. PCR inversa. PCR- Colony. PCR multiplex, cuantitativa, competitiva. PCR Real Time. Clonación de productos de PCR. Mutagénesis por PCR. Detección directa de mutaciones por PCR. PCR ASO. Detección de mutaciones inestable. PCR SSCP. Tetra primers ARMS PCR. PCR con primers degenerados. PCR SSP. PCR SBT. RACE PCR. PCR RFLP. PCR Booster. PCR-3SR. NASBA PCR. Reacción en cadena de la ligasa. Emulsión PCR. Branched DNA. Amplificación de sondas de RNA con la QB replicasa. Reacción SRA. PCR-SSO. PCR-Real Time. Aplicaciones. Emulsion-PCR. MSP-PCR. MS-Q-PCR. MSP+ASO-PCR. DMH-Arrays. MS-SSCA

UNIDAD 5: MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares clásicos. Isoenzimas. Marcadores moleculares basados en hibridación, en amplificación y en secuenciación. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Amplificación al azar de ADN polimórfico (RADP). Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados por PCR (AFLPs). VNTR. Minisatélites. Microsatélites (SSRs). Polimorfismo de nucleótido simple (SNPs). Origen de la variación y comparación. QTL. Mapeo por asociación. EST. SCARS

UNIDAD 6: REPLICACIÓN EN EUKARIOTAS

Sustratos necesarios para la síntesis del DNA. Mecanismo de la DNA polimerasa Eucariota. Procesividad. Regulación de la iniciación de la replicación. Horquilla de replicación. Especialización de las DNAs polimerasa. Síntesis del DNA en la horquilla de replicación. Estructura y mecanismo de la DNA helicasa. Acción de la topoisomerasa. Iniciación de la duplicación del DNA. Intercambio de polimerasas. Unión y desenrollamiento: Selección y activación del origen por la proteína iniciadora. Inactivación de replicadores. Regulación de la actividad de las CDK en el control del ciclo celular. Elongación de la replicación. Terminación de la duplicación. Mantenimiento de los extremos de una molécula de DNA lineal. Telomerasa. Telómeros. Telosoma. TERRA. Proteínas de unión a los telómeros. La mutabilidad y la reparación del DNA. Errores de la duplicación y su reparación. Lesión del DNA. Reparación y tolerancia de las lesiones del DNA. Reparación por escisión. Corrección de errores de replicación. Reparación de roturas del DNA. Mecanismo de reparación de apareamientos incorrectos para la corrección de los errores de duplicación. Dam metilación. Direccionalidad en la reparación. Modificación de G. Reparación de oxoG:A. Reparación de DNA acoplada a la transcripción. Mecanismo de la NHEJ en mamíferos. Defensas celulares contra la lesión del DNA. Síntesis de DNA de translesión. Polimerasas de translesión

UNIDAD 7: RECOMBINACIÓN

DSB. Modelo de Holliday. Modelo para la recombinación homóloga. Máquinas proteicas de la recombinación homóloga. Recombinación homóloga en los eucariotes. Acción polar de Chi. Intercambio de cadenas RecA. Estructura de RuvA, RuvAB y RuvC. Recombinación meiótica. Mecanismos de la escisión por la Spo11. Conversión del tipo de apareamiento. SDSA. Consecuencias genéticas del mecanismo de la recombinación homóloga. Recombinación específica de sitio conservadora. Funciones biológicas de la recombinación específica de sitio. Recombinación CSSR. Serina y Tirosina recombinasas.

UNIDAD 8: TRANSCRIPCIÓN EN EUKARIOTAS

RNA polimerasas y el ciclo de la transcripción. Unión directa e indirecta de la RNA polimerasa. Reposicionamiento de nucleosomas. Metilación de mantenimiento y de novo. Transcripción en eucariotas. Promotores. Complejo de preiniciación. Factores de transcripción. Complejo mediador. Alargamiento y terminación. Transcripción por las RNA polimerasas I y III. Química del ajuste del RNA. Maquinaria del ayustosoma. Mecanismo de ajuste. Variantes de ajuste. Ajuste alternativo. Mezcla exónica. Edición del RNA. Transporte del mRNA.

UNIDAD 9: TRADUCCIÓN

RNA mensajero. RNA de transferencia. Unión de los aminoácidos al tRNA. El ribosoma. Iniciación de la traducción. Prolongación y terminación de la traducción. Marcos de lectura abiertos. Modificaciones del mRNA. Código genético. Bamboleo. Regulación de la traducción. Regulación dependiente de la traducción de la estabilidad de los mRNA y las proteínas

UNIDAD 10: MODIFICACIONES POST TRADUCCIONALES

Direccionamiento de proteínas hacia de membrana del RE y a través de estas. Inserción de las proteínas de membrana dentro del RE. Modificaciones, plegamiento y control de calidad de las proteínas en el RE. Posicionamiento de las proteínas tipo I, II y III. Inserción de las proteínas ancladas por la cola. Secuencias topogénicas. Proteínas ancladas a GPI. Perfiles hidropáticos. Biosíntesis del precursor de oligosacáridos. Oligosacáridos N-ligados. PDI. Estructura de la partícula de reconocimiento de la señal (PRS). Direccionamiento de las proteínas hacia las mitocondrias (matriz, membrana interna, espacio inter membranas). Chaperonas y chaperoninas. Transporte de proteínas hacia los tilacoides. Proteomas. Síntesis de proteínas para peroxisomas y mecanismo de llegada a destino. Modelo de biogénesis y división de peroxisomas. Transporte hacia el interior y el exterior del núcleo. Técnicas para el estudio de la vía secretora. Mecanismos moleculares de formación y fusión de las vesículas. Etapas iniciales de la vía secretora. Etapas finales de la vía secretora. Endocitosis mediada por receptora. Direccionamiento de las proteínas de membrana y materiales citosólicos al lisosoma. Procesamiento de las cadenas de oligosacáridos. Estructura de las cubiertas de clatrina. Clasificación de señales luminal y citoplasmáticas. Procesamiento proteolítico de proproteínas en las vías de secreción constitutiva y regulada. Ciclo de la transferrina. Formación de endosomas multivesiculados. Vía autofágica

UNIDAD 11: BIOLOGÍA MOLECULAR EN PLANTAS

Cultivo de tejidos vegetales. Morfogénesis. Citogenética molecular e inmunocitogenética

en el estudio de los genomas vegetales. FISH y GISH en vegetales. Mapeo por amplificación directa de secuencias de interés por PCR in situ (PRINS). Análisis de la expresión génica en tejidos por ARN-ISH. QUISH. Polinización y Fertilización In-vitro. Hibridación somática. Métodos de Fusión. Identificación de plantas híbridas. Epigenética y evolución en vegetales. Variación Somaclonal. Aplicación en el mejoramiento genético. Usos del silenciamiento génico para el análisis funcional de genes candidatos. Silenciamiento post-transcripcional. Regulación génica por microRNAs. Metodologías para el análisis de genes candidatos que implican transgénesis. Silenciamiento génicos inducido por virus. Métodos para acelerar programas de mejoramiento e identificación varietal. Aplicaciones de los marcadores moleculares. Banco de germoplasma. Mapas genéticos. Selección asistida por marcadores moleculares. Retrocruzas. Diseño de genotipos y germoplasma.

UNIDAD 12: CANCER

Células tumorales y aparición del cáncer. Metástasis. Bases genéticas del cáncer. Cáncer y alteración de las vías reguladoras del crecimiento y proliferación celular. Cáncer y mutaciones de los reguladores de la división celular y de puntos de control. Cánceres asociados a defectos en la reparación del DNA. Carcinógenos y genes cuidadores en el cáncer. Producción de energía en células cancerosas aeróbicas. Usos de las micromatrices de DNA para predicción de pronóstico. Pérdida de Heterocigosidad. Control START. Vías de detención en G1. Pérdida de telómeros

VII - Plan de Trabajos Prácticos

TP de Aula:

- Estructura del ADN
- Enzimas de restricción, Diseño de primers y Secuenciación
- Marcadores Moleculares
- Replicación
- Transcripción
- Traducción
- Biología Molecular de plantas
- Biología Molecular del cáncer

Trabajos prácticos de laboratorio:

- Extracción y cuantificación de ADN bucal y de plantas . Electroforesis

- PCR Alelo Específica (PCR-ASO)
- VNTRs
- ARMS - PCR. Electroforesis
- RFLP.: Amplificación por PCR y digestión de los productos mediante enzimas de restricción

VIII - Regimen de Aprobación

Régimen de Regularidad

1. Resultan alumnos de un curso aquellos que están en condiciones de incorporarse al mismo de acuerdo al régimen de correlatividades establecido en el plan de estudio de la carrera y que hayan registrado su inscripción en el periodo establecido (2do año aprobado).
2. La fundamentación teórica de los Trabajos Prácticos se dará en clases y se indicara la bibliografía adecuada, antes de la realización de los mismos.
3. La bibliografía de cada uno de los temas a desarrollar estará a disposición de los alumnos de la Cátedra y conocerán la que se encuentra en biblioteca para su consulta.
4. Previo a la realización de los trabajos prácticos, durante o al final de su desarrollo, los alumnos serán realizados cuestionarios por el personal docente para evaluar sus conocimientos sobre la fundamentación teórica de los Trabajos.
5. Para la aprobación de los Trabajos Prácticos y para considerarse regulares, los alumnos deben obtener resultados adecuados, responder satisfactoriamente a los interrogatorios y aprobar los Exámenes Parciales de cada tanda de Trabajos Prácticos.
6. En referencia a los seminarios: el alumno debe asistir en carácter de obligatorio al 100% de los mismos, en caso de inasistencias justificadas (las cuales no deberán ser mayores del 20%) deberá recuperarlo. Se consideran seminarios tanto los realizados por los alumnos como así también las defensas de las tesis de grado de la Lic. en Biología Molecular que se desarrollen durante la cursada de la materia.
7. De acuerdo con la reglamentación vigente (Ord. N° 13/03) los alumnos deberán aprobar el ciento por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos y de la Examinaciones Parciales sobre los mismos.
8. Por la misma reglamentación los alumnos deben aprobar, en primera instancia, el setenta y cinco por ciento (75%) o su fracción entera menor, de los Trabajos Prácticos de Laboratorio y de aula, completando el 90% o su fracción entera menor, en la primera recuperación. En la segunda recuperación deberá totalizar la aprobación del cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos de Laboratorio y de aula.
9. Para poder rendir cada Examen Parcial sobre los temas de Trabajos Prácticos, los alumnos deberán tener aprobado el cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos cuyo contenidos se evalúan en dicha examinación. Estas evaluaciones podrán ser escritas u orales.
10. Teniendo en cuenta la misma reglamentación, cada parcial tendrá al menos una recuperación y no mas de dos.
11. El alumno que trabaja y la alumna madre con hijos de hasta seis años, tendrán derecho a una recuperación mas de Exámenes parciales sobre el total de los mismos. (Resol. N° 371/85).
12. La condición de Regular será mantenida por el término de 2 (dos) años a partir de la finalización de su cursado. Vencido dicho plazo podrá optar por rendir en carácter de libre, (siempre que esta condición este contemplada en el régimen de aprobación del programa correspondiente) o cursar nuevamente.
13. Los alumnos que no logren aprobar el curso en cuatro (4) exámenes finales, perderán la condición de alumno regular del mismo.
14. La pérdida de regularidad en un curso, significara la suspensión de la regularidad hasta tanto el alumno normalice su situación académica.

Reglamento General Para Alumno con Promoción Sin Examen

1. Inscripción: Para la inscripción como alumno promocional se deberá cumplir con las exigencias de correlatividades dadas para esta condición o bien, si ella no existiera en el respectivo plan de Estudio, la establecida para examen final en el curso correspondiente.
2. Clases Teóricas: Para mantener la condición de alumno promocional se deberá cumplir como mínimo con una asistencia del ochenta por ciento (80%) de las actividades teóricas programadas.
3. Trabajos Prácticos y Seminarios: El alumno deberá aprobar, cuestionario de la parte teórica del tema correspondiente a cada práctico en primera instancia el ochenta por ciento (80%) de las actividades practicas, debiendo tener el ciento por

ciento (100%) de las mismas aprobadas al finalizar el curso, para lo cual tendrá derecho a solo una recuperación por T.P desaprobadado o ausente. En referencia a los seminarios, el alumno debe asistir en carácter de obligatorio al 100% de los mismos, en caso de inasistencias justificadas (las cuales no deberán ser mayores del 20%) deberá recuperarlo. Se consideran seminarios tanto los realizados por los alumnos como así también las defensas de las tesis de grado de la Lic. en Biología Molecular que se desarrollen durante la cursada de la materia.

4. Evaluaciones y Recuperaciones: Se realizaran evaluaciones parciales de la totalidad de los temas del programa teórico y de T. P de la asignatura, mas una evaluación integradora final que relacione los principales temas. Cada evaluación será escrita u oral, según lo disponga la cátedra. Las evaluaciones se clasificaran con una nota, en la escala del 1 (uno) al

10 (diez). Para aprobar se requerirá un mínimo de siete puntos. El alumno tendrá derecho a recuperar 1(una) de las exámenes parciales en una única instancia. Si el alumno no pudiera concurrir a algún parcial (no mas de uno), en la fecha indicada, deberá justificar adecuadamente su ausencia (24- 48hs antes). Si así no lo hiciera, en la correspondiente recuperación se le considerara un diez por ciento menos (10 %) menos del puntaje alcanzado.

5. Perdida de la Promoción: En el caso de no satisfacerse algunas de las condiciones establecidas en este reglamento, el alumno automáticamente pasara ala condición de regular.

6. Nota Final: La nota final de la materia será igual al promedio de las calificaciones obtenidas en todos los parciales, incluyendo los no aprobados y ausentes no justificados. Asimismo se considerara para dicho promedio una nota conceptual del equipo de Cátedra respecto del desempeño del alumno en el transcurso del cuatrimestre.

IX - Bibliografía Básica

- [1] - Biología Molecular del Gen: Watson, Baker, Bell, Gann, Levine y Losick. 7ta Edición. 2017
- [2] - Genomas: Brown T., 3ra edición, 2007
- [3] - Biotecnología y mejoramiento Vegetal II, Levitus G., Echenique V., Rubistein C., Hopp E. y Mrogirski L. Editorial: INTA
- [4] - Biología Celular y Molecular: Lodish, Berk, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky y Darnell. 7ta Edición. 2017
- [5] - Molecular Biology of the gene. Tomo I y II: JD Watson, N Hopkins and R Jeffrey. 4ed. 1987.
- [6] - The Biochemistry of Plants. PK Stumpf and E E Conn. 1989. Academic Press
- [7] - PCR Primer. Dieffenbach c. and Diveksler G. 1995. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- [8] - DNA Synthesis. Arthur Kornberg. 2da ed. 1974
- [9] - Nonradiative labeling and detection of Biomolecules. Kessler C. 1992. Springer Verlag Berlin Heidelberg

X - Bibliografía Complementaria

- [1] 1- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM):
- [2] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Limits&DB=omim>
- [3] 2-National Center for Biotechnology Information (NCBI):
- [4] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [5] 3- Ensembl Genome Data Resources (The Wellcome Trust Sanger Institute):
- [6] <http://www.ensembl.org/>
- [7] 4- UCSC Genome Bioinformatic Site:
- [8] <http://genome.ucsc.edu/>
- [9] 5- Glosario de términos de genética molecular (Human Genome Project Information):
- [10] http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/glossary/
- [11] 6- Genetics Education Center University of Kansas Medical Center. (Incluye glosarios
- [12] de genética):
- [13] <http://www.kumc.edu/gec/>
- [14] 7- Recursos en torno al Proyecto Genoma Humano:
- [15] <http://www.gdb.org/gdb/hgpResources.html>
- [16] 8- Diccionarios médicos On-line:
- [17] <http://www.tirgan.com/glossary.htm>
- [18] 9- Kimball's Biology Pages:
- [19] <http://www.ultranet.com/~jkimball/BiologyPages/>
- [20] 10- Recursos de Citogenética Humana:
- [21] <http://www.slh.wisc.edu/cytogenetics/index.htmlx>

XI - Resumen de Objetivos

Resumen de objetivos

- Identificar las estructuras de ácidos nucleicos.
- Conocer la organización del genoma
- Comprender e identificar los distintos procesos implicados en el mantenimiento y transferencia de la información contenida en el DNA.
- Analizar los mecanismos de Transcripción y Traducción en eucariotas.
- Conocer y comprender las técnicas básicas utilizadas en el laboratorio de Biología Molecular
- Adquirir los conocimientos de Biología Molecular en plantas y Biología Molecular del Cáncer

XII - Resumen del Programa

UNIDAD 1: EMPAQUETAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

UNIDAD 2: AISLAMIENTO, FRAGMENTACIÓN Y MARCADO DE ACIDOS NUCLEICOS

UNIDAD 3: TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA E HIBRIDACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS Y SECUENCIACION

UNIDAD 4: AMPLIFICACIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y SUS APLICACIONES

UNIDAD 5: MARCADORES MOLECULARES

UNIDAD 6: REPLICACIÓN EN EUCARIOTAS

UNIDAD 7: RECOMBINACIÓN

UNIDAD 8: TRANSCRIPCIÓN EN EUCARIOTAS

UNIDAD 9: TRADUCCIÓN EN EUCARIOTAS

UNIDAD 10: MODIFICACIONES POST TRADUCCIONALES

UNIDAD 11: BIOLOGÍA MOLECULAR EN PLANTAS

UNIDAD 12: CANCER

XIII - Imprevistos

Los trabajos prácticos de laboratorios podrán ser realizados solo si se cuenta con los reactivos equipamientos necesarios para los mismos

XIV - Otros

ELEVACIÓN y APROBACIÓN DE ESTE PROGRAMA**Profesor Responsable**

Firma:

Aclaración:

Fecha: