

## **Programa de BIOQUÍMICACELULAR Y MOLECULAR**

**Carrera:** *Licenciatura en Biotecnología.*

**Asignatura:** *Bioquímica Celular y Molecular.*

**Núcleo al que pertenece:** *Obligatorio(Ciclo Inicial)*

**Profesor:** Hernán G. Farina; Mariano Gabri; Giselle Ripoll; Vanina Rodríguez; Andrés Romanowski.

**Correlatividades previas:** *Biología General*

### **Objetivos:**

Desde el punto de vista teórico, impartir los conocimientos que permiten comprender cabalmente las bases moleculares y metabólicas de los procesos celulares tanto de organismos eucariotas como procariotas. Sentar las bases de conocimiento necesarias que se requerirán para cursar asignaturas bioquímicas y biológicas que profundizan aspectos más puntuales de los fenómenos celulares y moleculares. Desde el punto de vista práctico, entregar las herramientas formativas que entrenen a la/os estudiantes en el manejo del material de investigación empleado para analizar biomoléculas y células. Instruir a la/os estudiantes en los procesos de razonamiento lógico necesarios para diseñar, conducir y analizar experimentos bioquímicos generales.

### **Contenidos mínimos:**

Componentes químicos de la célula. Estructura y función de las macromoléculas. Interacciones moleculares. Compartimientos y estructuras subcelulares. Conceptos de bioenergética. Genética. Flujo de la información: replicación, transcripción y traducción. Mecanismos de regulación. Tráfico de moléculas en la célula. Técnicas de estudio y análisis a nivel celular y molecular. Técnicas histológicas.

**Carga horaria semanal:** 6 horas

### **Programa analítico:**

**Componentes químicos de las células:** Compuestos de carbono. Ácidos grasos como componentes de las membranas celulares. Aminoácidos y proteínas. Nucleótidos. Panorama general del metabolismo celular. Catabolismo y anabolismo.

**Estructura y función de las macromoléculas:** Enlaces peptídicos. Niveles estructurales de proteínas. Plegamiento, modificación y degradación de las proteínas. Purificación, detección y caracterización de las proteínas. Estructura de los ácidos nucleicos.

**Organización subcelular:** Purificación de las estructuras subcelulares. Estructura de la membrana plasmática. Funciones básicas. Organelas de la célula eucarionte. Tráfico vesicular. Citoesqueleto.

**Replicación, reparación y recombinación del ADN:** Maquinaria de replicación. Topoisomerasas. Daño y reparación del DNA – Carcinogénesis. Recombinación del DNA homólogo.

**Síntesis de ARN y proteínas:** Síntesis y procesamiento del ARN. Estructura y función de la RNA polimerasa. Estructura y función del ARN mensajero. Ribosomas. Codones y anticodones. Codones de iniciación y terminación. Código genético.

**Regulación de la transcripción:** Proteínas reguladoras. Operones. Iniciación de la transcripción bacteriana. Control de la transcripción en eucariontes. Secuencias reguladoras. Controles postranscripcionales.

**Estructura molecular de genes y cromosomas - Tecnología del DNA recombinante:** Estructura del gen. Organización cromosómica. DNA codificante y no codificante. Elementos móviles. Reordenamientos. DNA de organelas. Fragmentación, separación y secuenciación de DNA. Hibridización de ácidos nucleicos. Clonación de DNA.

**Bioenergética:** Oxidación de la glucosa y los ácidos grasos. Estructura de la mitocondria. Oxidación mitocondrial. Transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Cloroplastos y fotosíntesis. Pigmentos involucrados en la fotosíntesis. Fotosíntesis bacteriana. Metabolismo del CO<sub>2</sub> en la fotosíntesis. Genoma de cloroplastos y mitocondrias.

**Técnicas de estudio a nivel molecular:** Análisis de macromoléculas. Cromatografía. Centrifugación. Detección de proteínas por *Western Blot* y detección *in situ*, ELISA. Utilización de radioisótopos. Métodos enzimáticos. Fluorescencia.

**Señalización celular:** Proteínas receptoras. Ligandos. Receptores acoplados a Proteínas G. Receptores acoplados a enzimas. Segundos mensajeros. Rutas de señalización. Interacción y regulación.

**Ciclo celular:** Principales eventos del ciclo celular. Regulación del ciclo celular.

Trafico intracelular. Endocitosis, fagocitosis, pinocitosis y exocitosis. Distribución de los nutrientes en la célula. Intercambio vesicular entre organelas. Participación del citoesqueleto y proteínas motoras.

Sistema Nervioso. Estructura neuronal. Potenciales de acción. Generación y propagación de un potencial de acción. Impulso nervioso continuo y saltatorio. Canales de membrana dependientes de voltaje.

Inmunología. Componentes celulares y no celulares del sistema nervioso. Sistema inmune innato y adaptativo. Sistema de complemento. Anticuerpos. Elementos figurados de la sangre.

**Histología Básica:** Métodos de estudio. Preparaciones permanentes, fijación, inclusión y coloración. Congelación y fractura (Criofractura). Principios básicos de histoquímica.

### **Formación práctica en laboratorio:**

**Trabajo Práctico 1.** Purificación de lípidos: Técnicas de extracción y análisis de lípidos mediante cromatografía en capa fina.

Los objetivos de este trabajo práctico son: 1- Determinar la composición de lípidos de distintos tejidos. 2- Comparar los porcentajes de lípidos totales de los diferentes órganos. 3- Contrastar los resultados obtenidos en el laboratorio con lo reportado en bibliografía.

La dinámica de trabajo es grupal instando la participación de todos la/os alumna/os; el desarrollo del trabajo es realizado por la/os alumna/os. A partir de distintos órganos animales se procede a la extracción de lípidos utilizando la técnica de Bligh y Dyer, cuyo fundamento es la afinidad de los compuestos lipídicos por solventes orgánicos. Una vez realizada la extracción, se procede a la resolución de estos utilizando la metodología de cromatografía en capa fina donde se va a observar la separación de las distintas especies teniendo en cuenta su polaridad. A su vez, la fase orgánica restante se evapora y mediante gravimetría se calcula el porcentaje de lípidos del tejido. Para el desarrollo de este trabajo práctico se utilizan: balanza analítica, micropipetas, vástagos de teflón para disgregar el tejido, microcentrífuga, solventes orgánicos (metanol, cloroformo, éter de petróleo, éter etílico, ácido acético) y placas de sílica gel.

**Trabajo Práctico 2.** Aislamiento de ADN plasmídico a partir de bacterias. Aislamiento de ADN total de procariontes y eucariotes. Cuantificación y determinación de calidad mediante espectrofotometría UV.

Los objetivos de este trabajo práctico son: 1- Purificar ADN plasmídico de células bacterianas. 2- Analizar cualitativa y cuantitativamente las diferentes extracciones.

La dinámica de trabajo es grupal, la/os docentes proveen los cultivos de bacterias crecidas durante 18 hs a partir de las cuales realizan los demás pasos de la extracción.

Para la extracción plasmídica se utiliza la desnaturalización alcalina, descrito por Birnboim&Doly, que se fundamenta en las características físico-químicas del ADN en condiciones alcalinas y en la diferencia de tamaño existente entre el ADN plasmídico y el genómico bacteriano. Una vez aislados los plásmidos se cuantifican y se determina su calidad mediante espectrofotometría UV, dado que las bases nitrogenadas que componen los ácidos nucleicos absorben luz a longitudes de onda específica. Esta propiedad es explotada para determinar su concentración en solución utilizándose la ley de Lambert-Beer, que relaciona la concentración de un compuesto a una determinada longitud de onda con su Absorbancia. Para el desarrollo de este trabajo práctico se utilizan: micropipetas, microcentrífuga, soluciones para realizar la extracción, espectrofotómetro UV y cubetas de cuarzo.

**Trabajo Práctico 3.** Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Determinación del peso molecular y la integridad de las especies moleculares purificadas.

Los objetivos de este trabajo práctico son: 1- Identificar los productos obtenidos en el TP 2 e interpretar las bandas resueltas. 2- Comparar los resultados visualizados con el índice de pureza y cuantificación obtenido para cada muestra.

Se utiliza un único gel de agarosa, preparado por la/os docentes, para todos los grupos y las muestras obtenidas en el TP2 son sembradas por la/os alumna/os.

Para el desarrollo de este trabajo práctico se utiliza la técnica de electroforesis que se fundamenta en el desplazamiento de una molécula con una carga neta en solución por acción de un campo eléctrico, y esta migración sucede a través de una matriz que genera la separación de las moléculas de la solución en base a su tamaño o peso molecular. Una vez que sucede la separación de los componentes, los mismos son visualizados utilizando un agente intercalante que emite fluorescencia cuando se encuentra unido a los ácidos nucleicos. Para el desarrollo de este trabajo práctico se utilizan: micropipetas, cuba electroforética, fuente de poder, gel de agarosa, solución de corrida, intercalante, patrón de tamaño, transiluminador UV, cámara fotográfica de registro.

**Trabajo Práctico 4.** Extracción de proteínas: Técnicas de fraccionamiento subcelular y extracción de macromoléculas. Lisis celular y extracción de proteínas citoplasmáticas. Cuantificación de proteínas totales. Técnicas de análisis molecular (electroforesis de proteínas).

Los objetivos de este trabajo práctico son: 1- Comparar métodos de extracción de proteínas a partir de distintos organismos. 2- Cuantificar las proteínas resultantes de cada extracto.

La dinámica de trabajo es grupal; el desarrollo del trabajo es realizado por la/os alumna/os. A partir de distintos órganos animales se procede a la extracción de proteínas utilizando disgregación mecánica con vástago de teflón en presencia de una solución tampón conteniendo detergentes; mediante este procedimiento se favorece la ruptura del tejido mientras que el detergente interfiere con la estructura de las membranas celulares y la obtención del extracto crudo. A continuación, se realiza una

centrifugación para obtener fracciones subcelulares, en este caso las proteínas asociadas a membrana quedarán en el precipitado y las solubles en el sobrenadante. Una vez realizada la extracción se procede a la cuantificación de las proteínas por método colorimétrico utilizando el reactivo de Bradford, el cual reacciona con grupos funcionales de las proteínas para dar el reactivo coloreado. La intensidad del colorante correlaciona directamente con la concentración de los grupos reactivos y puede ser medida mediante espectrofotometría. Luego de realizar una curva de calibración con una proteína pura de concentración conocida se interpola la absorbancia de las muestras incógnitas en la ecuación de la recta de regresión. Para el desarrollo de este trabajo práctico se utilizan: micropipetas, vástagos de teflón para disgregar el tejido, microcentrífuga, solución tampón con detergente, reactivo de Bradford, proteína pura standard, placa de multipocillos y lector de microplacas.

**Trabajo Práctico 5.** Electroforesis de proteínas SDS-PAGE: Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes "SDS PAGE", determinación del peso molecular de proteínas.

Los objetivos de este trabajo práctico son: 1- Comparar los perfiles proteicos obtenidos mediante SDS-PAGE. 2- Calcular la movilidad electroforética de diferentes bandas proteicas.

Se utiliza un único gel de poliacrilamida, preparado por la/os docentes, para todos los grupos y las muestras son sembradas por la/os alumna/os.

Para el desarrollo de este trabajo práctico se utiliza la técnica de electroforesis similar a la utilizada en el TP3. En este caso, como las proteínas tienen distinta carga neta dependiendo de los aminoácidos que la componen y el pH de la solución, las mezclas proteicas se incuban con el detergente aniónico SDS que le brinda una carga negativa. Se utiliza como matriz la poliacrilamida ya que permite una mayor versatilidad en la separación de estos compuestos. En paralelo a la siembra de las muestras, se corre un patrón de proteínas de peso molecular conocido. Una vez que sucede la separación de los componentes los mismos son visualizados mediante tinción con el colorante *Coomasie blue*. El desplazamiento de las cadenas polipeptídicas es proporcional al logaritmo de la masa, esto nos permite estimar el peso molecular de una proteína comparándola con la distancia de migración del patrón de proteínas de peso molecular. Para el desarrollo de este trabajo práctico se utilizan: micropipetas, cuba electroforética, fuente de poder, gel de poliacrilamida, patrón de peso molecular, solución de corrida, colorante *Coomasie blue*, cámara fotográfica de registro.

**Trabajo Práctico 6.** *Western blot*: Electrotransferencia de proteínas. Inmunotinción de proteínas eucariotas. Revelado luminiscente con HRP.

El objetivo de este trabajo práctico es: 1- Determinar los niveles de la proteína inmunoglobulina (IgG). Se utiliza una única membrana de nitrocelulosa para todos los grupos y este trabajo práctico es demostrativo. Los pasos de incubación son realizados por la/os alumna/os. Para el desarrollo de este trabajo práctico se utiliza la técnica de electroforesis explicada en el TP 5, en el gel se sembrarán distintos volúmenes de la proteína pura IgG y luego de realizada la separación las proteínas, se electrotransfieren a una membrana de nitrocelulosa para proceder con las distintas etapas de incubación con las soluciones de: Bloqueo, lavado, dilución con anticuerpo anti-especie acoplado a peroxidasa. Finalmente, se revela utilizando un reactivo

quimioluminiscente en una reacción mediada por la peroxidasa. Para el desarrollo de este trabajo práctico se utilizan: micropipetas, cuba electroforética, fuente de poder, gel de poliacrilamida, patrón de peso molecular, proteína pura IgG, solución de corrida, equipo de electrotransferencia, solución de transferencia, membrana de nitrocelulosa, solución de bloqueo, solución de lavado, anticuerpo anti-especie acoplado a peroxidasa, reactivo quimioluminiscente, placas radiográficas, reactivos de revelado fotográfico, cámara fotográfica de registro.

### **Trabajo Práctico 7.** Operón Lactosa: Estudios de la regulación del operón lactosa bajo distintas condiciones experimentales.

El objetivo de este trabajo práctico es: 1- Estudiar las condiciones de inducción del operón lactosa en *Escherichacoli*.

La dinámica de trabajo es grupal, la/os docentes proveen los cultivos de bacterias crecidas durante 18 hs a partir de las cuales realizan los demás pasos.

La regulación de los procesos celulares permite a los organismos optimizar el aprovechamiento de los recursos disponibles en cada momento. En el caso particular del operón lactosa, la inducción ocurre cuando se presentan las siguientes situaciones en forma simultánea: a) el represor no actúa sobre el operador debido a la presencia del inductor (lactosa) y b) el complejo activador (CRP-ligando) se une a la secuencia regulatoria específica. Las bacterias se incuban en distintas condiciones experimentales: en presencia de lactosa, glucosa, un antibiótico que inhibe la traducción de proteínas. Luego de estas incubaciones se medirá la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa, producida por uno de los marcos de lectura abiertos regulados por el operón lactosa, como una medida de su activación utilizando el reactivo ONPG (orto-nitrofenilgalactosa). Este es hidrolizado por esta enzima, y uno de los productos de hidrólisis, el orto-nitrofenol, es de color amarillo y puede ser medido mediante espectrofotometría. La intensidad de color es proporcional a la actividad enzimática que es calculada por la ecuación de Miller.

Para el desarrollo de este trabajo práctico se utilizan: micropipetas, microcentrífuga, soluciones de lactosa, glucosa, ONPG, placa de multipocillos y lector de microplacas.

**NOTA:** Todos los trabajos prácticos que involucren animales de laboratorio contarán con la aprobación de la CICUAL-UNQ (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación).

### **Seminarios**

Los seminarios estarán orientados a la resolución de problemas experimentales aplicando las técnicas vistas y ejercitadas en los trabajos prácticos.

### **Bibliografía**

- Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Publishing; 2002

- Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. Molecular Cell Biology. 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co.; c1999.
- Salomon E P, Berg L R, Martin D W and Vilee C. Biología de Ville. 4th ed. McGraw-Hill InteramericanaEditores, S.A. 1998.
- Suzuki D T GiffithsA J F, Miller J H and Lewontin R C. Introducción al análisisgenético. 4th ed. McGraw-Hill InteramericanaEditores, S.A. 1992.
- Junqueira L C and Carneiro J. Histología Básica. 3ra Edición. Salvat Editores, S.A. 1987. Gomez, D.E. & Alonso, D.F. (1998). Introducción a la Oncología Molecular. Editorial UNQ.

La bibliografía que no se encuentra en la Biblioteca de la UNQ es suministrada por los docentes, ya sea porque se dispone de las versiones electrónicas y/o se dispone del ejemplar en el grupo de investigación asociado.

**Organización de las clases:**Las actividades de enseñanza se desarrollan a través de clases teóricas, prácticas de laboratorio, talleres metodológicos y seminarios de discusión de artículos científicos, que se alternan para dar cobertura integral a cada unidad temática.

**Modalidad de evaluación:** La asignatura prevé 3 (tres) instancias de evaluación, correspondientes a 2 (dos) parciales escritos y 1 (una) evaluación práctica en laboratorio. La nota final surge de una ponderación de estas evaluaciones. Puede ser promocionada obteniendo una nota mínima de 6 (seis) en cada evaluación y un promedio igual o mayor a 7 (siete).

**Aprobación de la asignatura según Régimen de Estudios vigente de la Universidad Nacional de Quilmes (Res. CS 04/08):**

La aprobación de la materia bajo el régimen de regularidad requerirá: Una asistencia no inferior al 75 % en las clases presenciales previstas, y cumplir con al menos una de las siguientes posibilidades:

- (a) la obtención de un promedio mínimo de 7 puntos en las instancias parciales de evaluación y de un mínimo de 6 puntos en cada una de ellas.
- (b) la obtención de un mínimo de 4 puntos en cada instancia parcial de evaluación y en el examen integrador, el que será obligatorio en estos casos. Este examen se tomará dentro de los plazos del curso.

Lo/as alumno/as que obtuvieron un mínimo de 4 puntos en cada una de las instancias parciales de evaluación y no hubieran aprobado el examen integrador mencionado en el Inc. b), deberán rendir un examen integrador, o en

su reemplazo la estrategia de evaluación integradora final que el programa del curso establezca, que el docente administrará en los lapsos estipulados por la UNQ.

**Modalidad de evaluación exámenes libres:**

En la modalidad de libre, se evaluarán los contenidos de la asignatura con un examen escrito, un examen oral e instancias de evaluación similares a las realizadas en la modalidad presencial. Los contenidos a evaluar serán los especificados anteriormente incluyendo demostraciones teóricas y problemas de aplicación.

### CRONOGRAMA TENTATIVO

| Semana | Tema/unidad   | Actividad* |                 | Evaluación |
|--------|---|------------|-----------------|------------|
|        |   | Teórico    | Práctico        |            |
| 1      | Clase Introductoria. Componentes celulares.                           | X          |                 |            |
|        | Macromoléculas - Organización subcelular                              | X          |                 |            |
| 2      | Replicación, reparación y recombinación de ADN                        | X          |                 |            |
|        | TP1 "Purificación de lípidos"   |            | X (Laboratorio) |            |
| 3      | Transcripción   | X          |                 |            |
|        | Técnicas moleculares I: "Tecnología del ADN" Intro TP2 y 3            | X          | X (Seminario)   |            |
| 4      | Traducción  | X          |                 |            |
|        | TP2 "Aislamiento de ADN"  |            | X (Laboratorio) |            |
| 5      | Estructura de genes/Regulación de la transcripción.                   | X          |                 |            |
|        | TP3 "Electroforesis de ácidos nucleicos"                              |            | X (Laboratorio) |            |
| 6      | Repaso temas 1º Parcial   | X          |                 |            |
|        | Seminario I- Problemas sobre ácidos nucleicos                         |            | X (Seminario)   |            |
| 7      | 1er PARCIAL   | X          |                 | X          |
|        | Técnicas moleculares II: "Tecnología de proteínas" Intro TP 4, 5 y 6. |            | X (Seminario)   |            |
| 8      | Bioenergética I-Bioenergética II                                      | X          |                 |            |
|        | TP4 "Extracción de proteínas"   |            | X (Laboratorio) |            |
| 9      | RECUPERATORIO 1er PARCIAL   | X          |                 |            |
|        | TP5 "Electroforesis de proteínas SDS-PAGE"                            |            | X (Laboratorio) |            |
| 10     | Citoesqueleto celular-Músculo   | X          |                 |            |
|        | TP6 "Western blot"  |            | X (Laboratorio) |            |
| 11     | Señalización celular  | X          |                 |            |

|    |   |   |                 |   |
|----|---|---|-----------------|---|
| 12 | Regulación del ciclo celular                  | X |                 |   |
|    | Seminario II-Problemas de proteínas           |   | X (Seminario)   |   |
| 13 | Tráfico intracelular. Sistema nervioso        | X |                 |   |
|    | TP7 "Operón Lactosa"                          |   | X (Laboratorio) |   |
| 14 | Parcial Práctico                              | X |                 | X |
| 15 | Histología y Cáncer ó Repaso temas 2º Parcial | X |                 |   |
|    | Seminario III-Problemas de parciales          |   | X (Seminario)   |   |
| 16 | Histología y Cáncer ó Repaso temas 2º Parcial | X |                 | X |
|    | 2do. Parcial                                  |   |                 |   |