|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO** | | | | | | | | | |
| **PERÍODO ACADÉMICO** | 2023-2S | | | | | | | | |
| **ASIGNATURA** | Biología molecular | | | | **SEMESTRE:** 6to | | | **PARALELO:** A | |
| **NOMBRE DEL DOCENTE** | Mgt. Felix Falconi Ontaneda | | | | | | | | |
| **NÚMERO DE PRÁCTICA** | 14 | **FECHA:** | | **HORA:** 17:00-20:00 | | | | | **DURACIÓN:** 2 |
| **NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES.** | **NÓMINA** | | | | | | | | |
| 1. Acosta Cáceres Melany Sarahi | | | | | 1. Pomagualli Pucha Jomayra Vanesa | | | |
| 1. Acosta Tenelema Marcela Carolina | | | | | 1. Quezada Vega Karen Vanessa | | | |
| 1. Amores Garzón Jonathan Israel | | | | | 1. Quilligana Urrutia Lorena Estefanía | | | |
| 1. Ashqui Agualsaca Kerly Graciela | | | | | 1. Raza Aulla Doménica Salome | | | |
| 1. Balladares Hidalgo Micaela Alexandra | | | | | 1. Reyes Bayas Angie Viviana | | | |
| 1. Barragán Lara Patricio Xavier | | | | | 1. Ríos Palma Heidi Lissette | | | |
| 1. Borja Coba Malena Salome | | | | | 1. Saltos Michilena Anahely Arai | | | |
| 1. Caiza Moya Sulay Maricela | | | | | 1. Samaniego Álvarez Angie Nicole | | | |
| 1. Carrasco Chiluisa Escarlet Nicole | | | | | 1. Silva Villa Cinthya Dayana | | | |
| 1. Carvajal Inca Grace Dayana | | | | | 1. Silva Hidalgo Lizbeth Estefanía | | | |
| 1. Castillo Jiménez María Belén | | | | | 1. Tapia Jacome Priscila Mikaela | | | |
| 1. Cedeño Jiménez José Andrés | | | | | 1. Tarco Tarco Mónica Esperanza | | | |
| 1. Espinoza Espinoza Tanya Aracelly | | | | | 1. Tirado Martínez Wendy Anahi | | | |
| 1. Guamán Roldan Tamia Jamilexs | | | | | 1. Tuapanta Yupa Johanna Estefanía | | | |
| 1. Hernández Grijalva Jessica Ana | | | | | 1. Vaquilema Anilema María Alicia | | | |
| 1. Iglesias Vera Axel Alexander | | | | | 1. Vargas Mites Helens Mailyn | | | |
| 1. Inguillay Guagcha Elvis Estiven | | | | | 1. Vélez Arévalo Talitacum Yolanda | | | |
| 1. Noboa Ríos Jessica Lisbed | | | | | 1. Vizuete Parra Oliver Daniel | | | |
| 1. Osorio Quinatoa Allison Nayeli | | | | | 1. Yucta Concha Erick Joel | | | |
| 1. Parra Parra Alisson Melina | | | | | 1. Zambrano Cáceres Laura Estefanía | | | |
| 1. Pinduisaca Pinta Sandra Verónica | | | | |  | | | |
| **LUGAR DE LA PRÁCTICA** | Lab E301 Laboratorio de Química, Toxicología y Forense | | | | | | | | |
| **TÍTULO DE LA UNIDAD** | BASES MOLECULARES DE LAS ENFERMEDADES | | | | | | | | |
| **TEMA DE LA PRÁCTICA** | Análisis de secuencias moleculares asociadas a enfermedad  Ejemplo de análisis de un caso | | | | | | | | |
| **RESULTADO DE APRENDIZAJE** | | | | | | | | | |
| Valora adecuadamente el conocimiento de las bases moleculares de los microorganismos mediante el análisis e interpretación de su relación con el huésped para comprender y explicar la razón de la manifestación de la enfermedad | | | | | | | | | |
| **OBJETIVO GENERAL** | Comprender la técnica de diagnóstico de enfermedad | | | | | | | | |
| OBJETIVOS ESPECÌFICOS: | | | | | | | | | |
| Aplicar la técnica de PCR en el diagnóstico de enfermedades del IDUA | | | | | | | | | |
| **MARCO TEÓRICO** | | | | | | | | | |
| Según el catálogo OMIM (Online Mendelin Inheritance in Man), en la actualidad se conocen alrededor de 8.000 enfermedades genéticas relacionadas con todas las especialidades médicas, la mayoría de ellas de tipo monogénico. Sin embargo, su base genética se conoce en 4.423 entidades patológicas, lo que representa que en el 50% de enfermedades no se ha demostrado la relación genotipo-fenotipo1. Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que estas 8.000 enfermedades afectan al 7% de la población mundial2. Según el informe de la Organización Europea de Enfermedades Raras (Eurordis), el 80% de las enfermedades raras son de origen genético3.  Las enfermedades monogénicas se heredan de forma mendeliana, siguiendo diversos patrones hereditarios conocidos: autosómico dominante, autosómico recesivo, ligados al X, ligados al cromosoma Y, disomía uniparental y trastornos de imprinting1. La mayoría están causadas por variantes patogénicas localizadas preferentemente en las regiones codificantes e intrónicas adyacentes de los genes, produciendo alteraciones de la proteína, modificando su función y provocando el fenotipo patológico. El diagnóstico genético se basa en la localización de dichas variantes en los genes asociados a las enfermedades.  Debido a la gran heterogeneidad genética que presentan las enfermedades monogénicas, el tiempo estimado para llegar al diagnóstico molecular se encuentra entre 1 y 10 años. Este retraso impide que los pacientes reciban medidas terapéuticas y de rehabilitación específica para su enfermedad, que sus familiares puedan entrar en programas preventivos dirigidos a la detección temprana de la enfermedad mediante estudios genéticos y que reciban asesoramiento genético sobre bases reales de la patología en estudio.  La estrategia actual de diagnóstico de enfermedades heterogéneas consiste en iniciar el estudio del gen más frecuentemente mutado asociado a la enfermedad mediante secuenciación Sanger. Si se detecta la variante patogénica, se confirma el diagnóstico molecular. Si no es así, se continúa con la secuenciación de los genes más frecuentemente mutados hasta detectar o no el gen y la mutación causante de la enfermedad.  La secuenciación masiva ha venido a solventar estos problemas dado que permite el análisis de todos los genes responsables de una enfermedad al mismo tiempo. Ello permite economizar tiempo y dinero, y establecer la etiología genética en la gran mayoría de las ocasiones. | | | | | | | | | |
|  | | | | | | | | | |
| **MATERIALES Y MÉTODOS** | | | | | | | | | |
| **Equipos** | **Materiales** | | | | | | **Reactivos** | | |
| Centrifuga  Congelador  Termociclador  Sistema de electroforesis | Pipetas  Puntas para pipetas  Tubos Eppendorf  Tubos para PCR | | | | | dNTPs  Primers  Tampones  Muestra de ADN | | | |
| **PROCEDIMIENTO / TÉCNICA:** | | | | | | | | | |
| El diagnóstico genético consiste en analizar el material genético, el ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ácido ribonucleico (ARN), obtenido de una muestra humana con el fin de detectar variantes de secuencia del ADN asociadas a una enfermedad. En genética médica se denominan mutaciones patogénicas a las variantes de secuencia que causan enfermedad, las cuales generalmente se encuentran en una frecuencia inferior al 1% en la población general  La mucopolisacridosis tipo I (MPS I) es una enfermedad genética de almacenamiento lisosomal con un modo de herencia autosómico recesivo. La base molecular de este desorden es la deficiencia en la actividad del biocatalizador αL-iduronidasa (EC 3.2.1.76) por afectación estructural del gen IDUA. Esta enzima forma parte de la ruta catabólica de los glicosaminoglicanos (GAGs) dermatán sulfato (DS) y heparán sulfato (HS). Esta situación metabólica provoca la acumulación progresiva intralisosomal de estos GAGs en diferentes tejidos y órganos, a lo que se atribuye en gran medida el fenotipo clínico  Obtener ADN de muestras  Preparar el master mix  1,0 µL de ADN (100 ng)   0,9 µL de cada cebador (9 pmoles/µL)   0,6 µL de cada dNTPs (2 mmol/L)   0,3 µL de la enzima ADN polimerasa Hot Start (5 UI)   2,5 µL de Buffer Hot Start (10X)   0,5 µL de MgCl2 (2 mol/L)   7,5 µL de solución Q (5X)  Usar los siguientes primers  Primers usados para la detección   |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | **Primer** | **Primer Sequence (5'-3')** | **Target** | **Amplicon (bp)** | | F | TGGCGGGGCCTGGGGACTCCTTCACCTA | IDUA |  | | R | GCGGGTGTCGTCGCTCGCGTAGAT | IDUA |  |   Programar el termociclador  Condiciones del programa de la PCR   |  |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | --- | | **Primer** | **Inicio** | **Desnaturalización Hibridación Extensión**  **35 ciclos** | | | **Ext-Final** | | 2019-nCoV\_N1-F-R | 95°C, 4min | 95°C, 30 s | 68°C, 30 s | 72°C, 60 s | 72°C, 5 min |   Analizar la amplificación en un gel de electroforesis | | | | | | | | | |
| **RESULTADO (Gráficos, cálculos, etc.)** | | | | | | | | | |
| Fig. 1 - Electroforesis en gel de agarosa al 1,8 % para análisis de digestión del producto de PCR con enzima Bfa1. Carril 1: patrón de peso molecular. Carril 2: genotipo homocigótico (bandas 110bp + 138bp). Carril 3: genotipo sin la mutación (banda 248pb) | | | | | | | | | |
| **OBSERVACIONES** | | | | | | | | | |
| Los estudiantes deben tener cuidado al momento de manejar los equipos de laboratorio ya que son muy delicados. | | | | | | | | | |
| **CONCLUSIONES** | | | | | | | | | |
| Nos enfrentaremos a la difícil definición del estado creado por la presencia de tales genes defectuosos que identifica un estado que podríamos denominar de susceptibilidad, predisposición, propensión, proclividad, riesgo potencial o probabilidad. Independientemente del término elegido para designar una situación concreta en cada individuo, la información genética implica la toma de decisiones que pueden afectar la viabilidad de un embrión con un gen deletéreo para su futuro como adulto, o cómo manejar la información que afecta a un paciente o a sus familiares, respecto al riesgo de sufrir una enfermedad discapacitante más o menos grave, en un momento u otro de su vida, con alguna probabilidad en algunos casos y en otros casos con certeza. | | | | | | | | | |
| **RECOMENDACIONES** | | | | | | | | | |
| * Utilizar la vestimenta de bioseguridad para manejar los equipos y materiales del laboratorio de biología molecular. * Hacer uso de las normas de bioseguridad para evitar contaminarse así mismo, a los demás, o al trabajo que se esté realizando. * Seguir las instrucciones dadas por el profesor y en la presente guía * Leer las instrucciones de los reactivos utilizados. | | | | | | | | | |
| **BIBLIOGRAFÍA/WEBGRAFÍA** | | | | | | | | | |
| * Biología molecular Salazar Montes Adriana Mc Graw Hill Interamericana Editores * Biología molecular Gómez Marín Jorge Enrique Corporación para Investigaciones Biológicas * Biología molecular y celular Chandart Nalini Wolters Kluwer Health * https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/, * https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic | | | | | | | | | |
| Mgs. Ximena Robalino F**.**  **DIRECTORA DE CARRERA** | | | Ing. Félix Falconí O., Mgs  **DOCENTE** | | | | | | |