



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **Facultad de Ciencias de la Vida**

“DETERMINACIÓN DEL GEN DE LA METALOTIONEÍNA (MT)  
EN DOS ESPECIES DE BIVALVOS (*Mytella guyanensis* y  
*Crassostrea columbiensis*)”

## **INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR**

Previa a la obtención del Título de:

**BIÓLOGA**

**SANDY GABRIELA PONCE CAICEDO**

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**AÑO: 2016**



## **AGRADECIMIENTOS**

Mis más sinceros agradecimientos a mi tutora la Dra. Ana Tirapé por su guía durante la realización de este proyecto, a mi profesor de la materia integradora MS.c. César Bedoya por su apoyo y guía durante el curso, y al Dr. Washington Cárdenas por permitirme realizar mi proyecto en su laboratorio.

## **DEDICATORIA**

El presente proyecto lo dedico a mis padres por su apoyo en todo este proceso y a mi segunda mamá Lilian Gavilanez que desde el cielo me guía.

## EVALUADOR DEL PROYECTO

---

**Dra. Ana Tirapè**

Tutor Proyecto Integrador

---

**MS.c. César Bedoya**

Profesor Materia Integradora

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, me corresponde exclusivamente; y doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

---

Sandy Ponce

## RESUMEN

Debido a la alta contaminación que se presenta Ecuador, cada vez son más los lugares contaminados por metales pesados y materia orgánica que se observa ausencia de flora y fauna en estas zonas. Es por esto que se estudiará dos especies de bivalvos los cuales se ha reportado la presencia de ellos en zonas contaminadas.

La razón por la que estos organismos toleran este tipo de contaminación es gracias a la expresión de un gen llamado metalotioneína, este gen tiene como función detoxificar metales o iones de metales, su alto contenido en cisteína hace que estos metales se adhieran a su organismo.

Se determinará el gen de la Metalotioneína en *Mytella guyanensis* y *Crassostrea columbiensis*, mediante la evaluación de los primers, comparación de dos métodos de extracción de ADN (Método fenol-cloroformo y por calentamiento), y finalmente una amplificación, para así poder utilizar esta información a futuro para medir la expresión de este gen y poder utilizar estas dos especies como bioindicadores en la contaminación por metales pesados.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
EVALUADOR DEL PROYECTO.....	v
DECLARACIÓN EXPRESA.....	vi
RESUMEN.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	1
ABREVIATURA.....	2
ÍNDICE DE FIGURA.....	3
ÍNDICE DE ANEXOS.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO 1 INFORMACIÓN GENERAL.....	8
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
CAPÍTULO 3 RESULTADOS.....	23
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXOS.....	35



## ABREVIATURA

MT: Metalotioneína

mm: Milímetros

kDa: Unidad de masa atómica

µg: Microgramo

µl: Microlitro

rpm: revoluciones por minuto

PCR: Polymerase Chain Reaction

ml: Mililitro

## ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1.1.....	10
Figura 2.1.....	11
Figura 3.1.....	13
Figura 4.1.....	16
Figura 1.3.....	23
Figura 2.3.....	24
Figura 3.3.....	25

## ÍNDICE DE ANEXOS

Figura 1.2.....	35
Figura 2.2.....	36
Figura 3.2.....	36
Figura 4.2.....	37
Figura 5.2.....	37

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo industrial de los países alrededor del mundo, ha provocado graves daños en el ecosistema marino, debido al incremento de sustancias contaminantes de todo tipo (orgánicas e inorgánicas) [1]. Los ecosistemas acuáticos sufren contaminación principalmente por metales pesados como lo son: Mercurio (Hg), Cadmio (Cd), Zinc (Zn), etc., por este motivo se ha elevado el interés por evaluar el efecto de la contaminación en el medio acuático, muchas especies de vertebrados e invertebrados han sido objeto de estudio en investigaciones vinculadas con la contaminación ambiental [2].

Sin embargo, no existe una amplia información sobre este tema, sobre todo en las zonas tropicales a la cual pertenece Ecuador, y cada día se vuelve fundamental, el empleo de organismos acuáticos, que permitan cuantificar el impacto ambiental, causado por la contaminación en los ecosistemas marinos [3]. Para determinar contaminación por metales pesados, se emplean organismos modelo como bioindicadores, los cuales podrían ser especies vegetales o animales, estos organismos nos brindan información sobre ciertas características ecológicas, físico-químicas, micro-climáticas, biológicas y funcionales del medio ambiente [4].

Es por esto que, se ha estudiado a los bivalvos como organismos bioindicadores, ya que estos pueden acumular diferentes metales a altas concentraciones, y esto va a reflejar el impacto químico a lo que esta expuestos los procesos biológicos, las especies mayormente estudiadas son: *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis* [2]. Además, se ha demostrado que en las especies mencionadas anteriormente cuando están expuestas a metales pesados, a situaciones estresantes por contaminantes, patógenos y condiciones ambientales adversas, producen una respuesta a nivel molecular tal como la síntesis de proteínas, ejemplo la síntesis de las Metalotioneínas [5]–[7].

Las metalotioneínas son proteínas no enzimáticas, pequeñas, intracelulares, ubicuas, capaces de metabolizar metales, unir iones minerales y de naturaleza orgánica [8]–[10], en las últimas décadas, se ha generado un amplio interés en estas proteínas, ya que juegan un rol importante en la detoxificación de metales tanto esenciales como no esenciales[8], por ende, tiene un papel ecotoxicológico importante, ya que al ser sintetizadas otorga una respuesta específica a elevadas concentraciones de metales, es por esto, que se las utiliza como un potencial biomarcador de contaminación [9], [11].

De acuerdo a todo lo mencionado anteriormente, este proyecto integrador propone analizar el gen de las metalotioneínas (MTs),

para detectar la presencia de esta proteína en *Mytella guanensis* y *Crassostrea columbiensis* mediante la expresión del gen, cuya información servirá en investigaciones futuras para determinar el uso de esta proteína como un potencial bioindicador en el Ecuador.

## **CAPÍTULO 1**

### **INFORMACIÓN GENERAL**

#### **1. METALOTIONEÍNAS.**

##### **1.1. Contaminación**

El crecimiento de la producción industrial, la agricultura, el crecimiento poblacional y los asentamientos urbanos en las zonas costeras, son los principales factores que hacen crecer la contaminación a nivel mundial, dejando sin hábitat a muchas especies, incluso a la población humana. Debido a la descarga de desechos en los ríos, estos transportan toda esa materia orgánica e inorgánica hacia el mar [12].

Uno de los principales contaminantes inorgánicos que está causando daños en el ecosistema marino, son los metales pesados, en el mar existe altos niveles de concentración de este contaminante. La presencia de los metales en el ecosistema marino indica la presencia de fuentes antropogénicas, afluentes industriales, minería y refinería, drenaje de los cultivos agrícolas, descargas de aguas residuales y deposición atmosférica [12].

Una solución estratégica para poder identificar las zonas contaminadas con metales, es la utilización de bioindicadores como los bivalvos [12].

## 1.2. Bivalvos

En el medio marino se están estudiando organismos para detectar la contaminación por metales, y se ha elevado el interés por los moluscos, ya que ellos acumulan metales, a niveles altos, del agua, alimento, y partículas del material inorgánico. Estos metales se acumulan en diferentes órganos y tejidos, este proceso se lleva a cabo ya que son organismos filtradores [13]–[16].

Otras características que hace llamativos a los bivalvos en estudios de contaminación marina, es que poseen una amplia distribución y abundancia geográfica, longevidad relativa, y su sedentarismo, lo cual facilita hacer mediciones bioquímicas y fisiológicas [16].

De acuerdo a lo antes mencionado se utilizarán las siguientes especies para cumplir con los objetivos propuestos.

- ***Mytella guyanensis***

Es un molusco que habita en el ecosistema de manglar desde Baja California hasta Perú. Estos organismos se los encuentra dentro del fango, las raíces del mangle o semienterrados en el fango [17]. Posee un ciclo continuo de reproducción dependiendo de la temperatura, es tolerante a variación de salinidades y contaminantes [18].



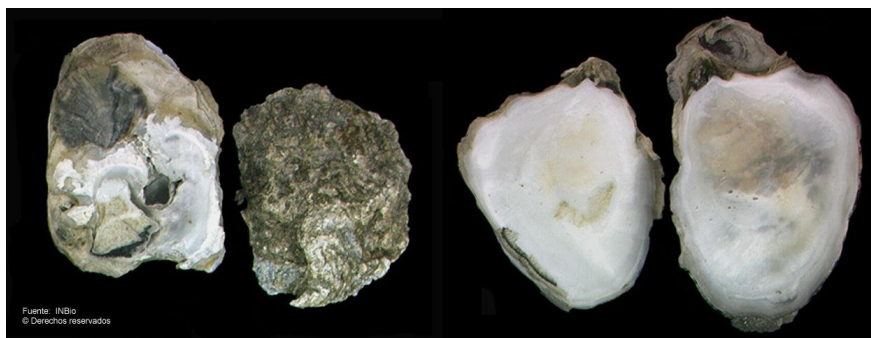


**Figura 1.1: *Mytella guyanensis* [19]**

Presenta una concha ovalada, relativamente delgada. En la mayoría de los mejillones el umbo se encuentra en el extremo de la concha, en esta especie no es así. El periostraco es delgado, este mejillón presenta dos zonas identificadas por colores, uno casi negro en la zona ventral y otro con tono verdoso en la parte posterior. Presenta muchas líneas concéntricas en la parte posterior de la concha en los ejemplares adultos. Tiene longitud de 58mm, ancho 28mm y diámetro de 25mm [20].

- ***Crassostrea columbiensis***

Se encuentra distribuido desde el golfo de California hasta Ecuador, incluyendo a las Islas Galápagos. Su hábitat regular se encuentra adheridas a sustratos rocosos en la zona estuarina y también sobre las raíces de *Rhizophora sp.* En la parte externa del manglar, son tolerantes a contaminante [21].



**Figura 2.1: *Crassostrea columbiensis* [22]**

Presenta valvas irregulares de color blanco, con variables, que cambian según el espacio disponible y la velocidad de las corrientes. Tiene el umbo opistogiro [21], [23], margen ondulado de color púrpura que es liso internamente, la valva inferior tiene forma de copa y la superior es pequeña y aplanada. Esta especie puede tolerar fluctuaciones considerables de salinidad cercanas a 2 ppm [21].

### 1.3. Metalotioneínas

Las metalotioneínas son proteínas no enzimáticas, pequeñas, intracelulares, ubicuas, capaces de metabolizar metales, unir iones minerales y de naturaleza orgánica[24]–[27]. Poseen bajo peso molecular (7-9 kDa) [26], alto contenido en cisteína (20 cisteínas de un total de 60-62 aminoácidos) [26], un aminoácido no aromático y estabilidad térmica, esto hace que se diferencien de otras proteínas [28], [29].

Fueron aisladas por primera vez Margoshes y Vallee en 1957 en un riñón de caballo, tenía altos niveles en iones de  $\text{Cd}^{2+}$  principalmente, también  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  [26]. Se encuentra presente en todo el reino animal, algunos hongos,

plantas y cianobacterias, así como en los humanos. En 1990 mediante cristalografía de X-ray y espectroscopia NMR se descubrió que posee una estructura tridimensional, [30].

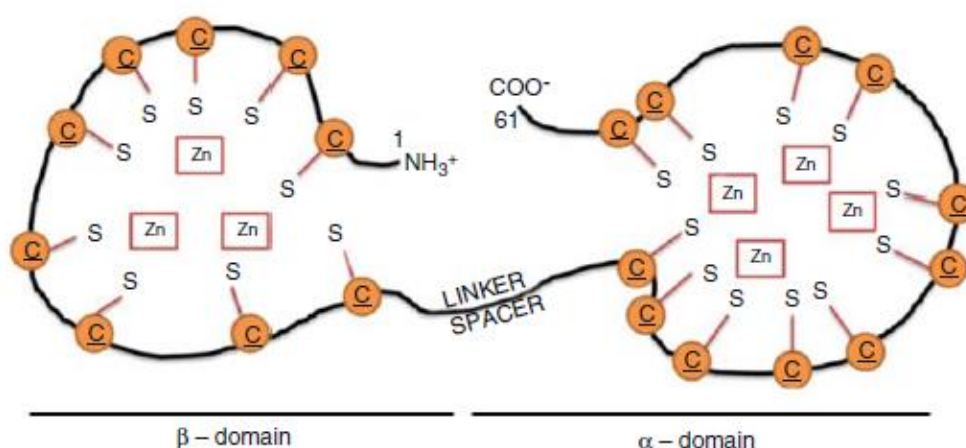
En los mamíferos estas proteínas se encuentran en mayor porción en hígado, riñón, páncreas e intestino, su concentración varía ampliamente en las diferentes especies y tejidos, también varía de acuerdo a la edad, el estado de desarrollo embrionario, régimen dietético, la exposición a metales pesados y agentes estresantes, etc. [27], [31].

#### **1.4. Estructura y Polimorfismo**

Las metalotioneínas poseen una estructura tridimensional, pero al ser secuenciadas se puede observar una sencilla cadena de polipéptidos, en las cuales los residuos de cisteínas están organizados en secuencias Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys y Cys-Cys, donde en "X y Y" hace referencia a un aminoácido distinto a Cys [32], [33]. Los residuos Cys son los dominios a los cuales se unen los metales a la molécula de MT, formando clusters de metal-tiolato llamados dominio  $\alpha$  y  $\beta$  [32]–[34].

El dominio  $\alpha$  está formado por 31-68 aminoácidos y está localizado en el C-terminal, mientras que el dominio  $\beta$  contiene 1-30 aminoácidos. Se ha demostrado que el dominio  $\alpha$  es capaz de unirse a cuatro metales divalentes y el dominio  $\beta$  puede unirse a tres metales divalentes como el zinc, cadmio, mercurio o plomo [32], [35], [36] esto en cuanto a vertebrados, en los invertebrados se ha descrito la existencia de dos clusters con tres átomos de metal cada uno que serían equivalentes a los dominios  $\beta$  [25].

Existe otra parte de la proteína que no se une a iones metálicos y se la denomina apo-metalotioneína o tioneína, sin embargo se ha identificado que existe una muy baja afinidad del  $\text{Fe}^{+2}$  hacia esta zona [32], [34].



**Figura 3.1: Unión de los metales en la molécula de metalotioneína. Dominio  $\alpha$  es capaz de unirse hasta cuatro metales y el dominio  $\beta$  es capaz de unirse hasta tres metales [32]**

Las metalotioneínas de la clase I presentan pequeñas diferencias en su estructura primaria que la diferencia de las otras clases, es decir presenta polimorfismo genético o isoformas, usualmente en mamíferos. La nomenclatura de estas proteínas depende a la secuencia de elución de las resinas de intercambio iónico (MT-1, MT-2, MT-3, etc.) y las subisoformas son representadas por letras (MT-1a, MT-1b, etc.). El polimorfismo más complejo en el cual se expresan 10 genes de isometalotioneínas se encuentra en los seres humanos [25], [31], [37], [38].

## 1.5. Clasificación

Ya que no existe una función enzimática conocida en las metalotioneínas se las han clasificado en tres clases de acuerdo a sus características estructurales [31], [38], [39].

La clase I se encuentran presentes como cadena sencilla, comprende a las MTs aisladas de los mamíferos algunos moluscos y crustáceos ostras, cangrejos y langostas [31], [39], e incluye a todos aquellos polipéptidos que tengan: alto contenido en metales pesados (4-12 átomos/mol), presentan solamente enlaces "Triol" y forman dos agrupamientos metálicos, alto contenido en cisteínas (típicamente del 23 al 33%), ausencia de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, baja masa molecular (menor a 10,000 daltones) y homología estructural relacionada con las MT aisladas de mamíferos [31].

La clase II presentan cierta similitud con las de la clase I ya que también se encuentran presentes en cadena sencilla y su diferencia radica en la secuencia de aminoácidos que las MTs aisladas de los mamíferos. La distribución de los aminoácidos cisteína en esta clase no corresponden a la localización de las cisteínas en las MTs de clase I.

Estas proteínas han podido ser encontradas levaduras, cianobacterias, hongos, insectos, nematodos y erizos de mar [14], [38], [40]. Y finalmente tenemos el último grupo que son las de la clase III, se encuentran presentes en plantas y algunas levaduras [14]. Son polipéptidos formados por la repetición de 2 a 11 unidades glutamil-cisteinil. Se las conoce con el nombre de fitoquelatinas cuando el aminoácido carboxilo terminal corresponde a la glicina, u homofitoquelatinas cuando el aminoácido terminal corresponde a la beta-alanina.

Estas MTs tienen una estructura oligomérica formada por 2 o más cadenas polipeptídicas de longitud variable [31], [38], [39].

## 1.6. Gen de la Metalotioneína en Bivalvos

Los genes de las MTs en los moluscos presenta en su genoma 3 exones y 2 intrones [41]. En las especies de los bivalvos se han identificado dos isoformas o genes de metalotioneínas que son: MT-10 y MT-20. MT-10 es monomérico y MT-20 es dimérico, estos dos genes presentan una masa atómica de 10 kDa (MT-10) y 20 kDa (MT-20) [41]–[43].

Otra diferencia en estos dos genes es la MT-10 contiene 73 aminoácidos (21 cisteínas) y la MT-20 contiene 72 aminoácidos (23 cisteínas). Los residuos de las cisteínas en MT-20 pueden mejorar su propiedad de quelación o crear ligaciones intermoleculares entre dos unidades monoméricas [41], [43].

Los genes podrían tener estructuras específicas que favorecen su rápida transcripción en respuesta a la exposición a un metal o metales pesados [41], [44].

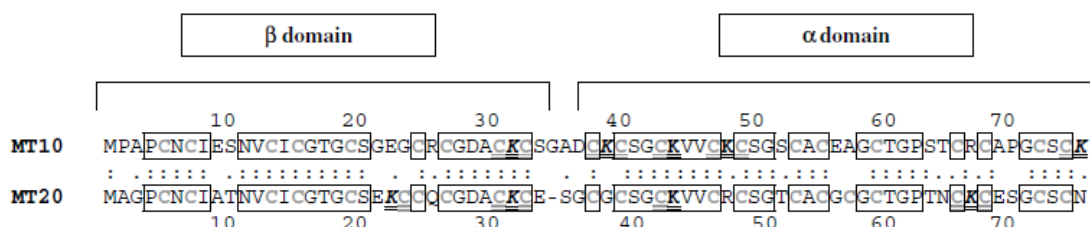


Figura 4.1: Alineamiento de las secuencias de las proteínas MT-10 y MT-20. Se indican los dominios  $\alpha$  y  $\beta$  [43].

## 1.7. Función

Existen algunas funciones de las metalotioneínas, como la homeostasis de metales esenciales, protección frente al estrés oxidativo, proliferación celular y apoptosis, regulación del metabolismo energético y en la regeneración y protección del sistema nervioso. Pero la función mayormente estudiada y mejor establecida es la detoxificación de metales no esenciales [27], [45]–[47].

La detoxificación de metales no esenciales hace referencia a la acumulación de metales pesados en el organismo y que estos metales no afecten a este organismo, en los humanos este proceso de retención de metales es específica de cada tejido, pero causa patologías. En crustáceos y moluscos es un proceso fisiológico normal conocido como bioacumulación, gracias a esta función se utiliza a estos organismos como indicadores de la contaminación ambiental [27], [31], [48].

## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Recolección de muestras.

Las muestras se las tomaron de la zona de Puerto Hondo, se encuentra ubicada en el kilómetro 17 de la vía Guayaquil – Santa Elena [49]. Puerto Hondo es una zona de manglar perteneciente al Estero salado, cuenta con 2000 hectáreas<sup>2</sup> [50]. Las muestras se recolectaron de forma manual, cerca de las raíces del manglar y algunas enterradas en el fango aproximadamente a 20 cm de profundidad, se recolectaron aproximadamente 30 organismos de cada especie.

#### 2.2. Extracción de ADN

Se utilizaron dos protocolos para la extracción de ADN uno con Lysis Buffer o Calentamiento y el otro método llamado Fenol-Cloroformo, a continuación, se describe el primer método:

- **Método Lysis Buffer o Calentamiento**

Se tomaron las muestras obtenidas en Puerto Hondo, se las abrió con un bisturí, se localizó la región de la hepatopáncreas, se colocaron las muestras en diferentes cajas Petri separando los organismos *Mytella guyanensis* de *Crassostrea columbiensis*.



Se cortó en pedazos pequeños con el bisturí las hepatopáncreas de los organismos, se pesaron 500 µg de muestra de cada organismo, se los colocó en tubos con solución de Lysis Buffer y se los dejó durante 10 minutos en baño maría.

Después se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos, una vez terminado este proceso se tomó una muestra de 150 µl de cada tubo y se los colocó con 300 ml de Etanol helado al 95% en cada tubo, se los llevó a centrifugar nuevamente a 13000 rpm durante 5 minutos.

Una vez finalizada la centrifugación se descartó todo el Etanol de los tubos y se colocó 100 µl en cada tubo de Etanol helado al 70%. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, finalizado el proceso se descartó el Etanol de los tubos y se los dejó secar. Al finalizar el secado se re suspende el ADN en 50 µl de Agua Utrapura.

- **Método Fenol-Cloroformo**

Después de cortar la hepatopáncreas con el bisturí tomamos 100 gr de muestra en un tubo junto a 500 µl de Buffer (tris-HCl 50mM ph 8,25; EDTA 50mM; NaCl 50mM; SDS 1%), se las deja por 10 minutos y después se realiza un vortex para que homogenice [51].

Se lleva a centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos, después que termine la centrifugación se coloca el sobrenadante de la muestra con 500 µl de fenol: cloroformo: isoamil alcohol en una proporción aproximada de (25:24:1), se

deja con frío durante 10 minutos y después se centrifuga a 14000 rpm por 10 minutos [51].

Se recupera la fase acuosa sin tocar la fase intermedia, a un nuevo tubo con el mismo volumen de cloroformo isoamil alcohol a una proporción de (24:1), se lleva a centrifugar durante 5 minutos a 14000 rpm [51].

Se toma 500 µl de la fase acuosa a un nuevo tubo con 2 volúmenes de etanol absoluto, se centrifuga a 14000 rpm por 10 minutos. Después se descarta el sobrenadante y se observa el pellet en el tubo [51].

Se agrega el mismo volumen de etanol 70%, se centrifuga a 14000 rpm por 5 minutos. Terminado el proceso de centrifugación se desecha el etanol 70% y se deja secar. Finalmente, se resuspende el pellet de ADN con 50 µl de agua UltraPura [51].

### **2.3. Cuantificación y Pureza de ADN**

Para asegurarse que existe la cantidad suficiente de ADN para obtener la proteína deseada realizamos una cuantificación con Nanodrop 2000 Program. Esta máquina junto con el programa en una computadora me permitió medir la cantidad de ADN en mis muestras.

Como primer paso en el programa seleccionamos la opción de Nucleic Acid, se colocó nombre al proceso (Sample ID) y primero se blanqueó la máquina, se utilizó 5 µl de Agua Ultrapura para estandarizar.

Después se configuró la máquina, el proceso consiste en que al realizar la medición con 2 µl de Agua Ultrapura, previamente se limpió con una servilleta el agua utilizada anteriormente, los valores que obtenga deben ser de -0,2 a +0,2 o valores menores a este.

Si obtenemos valores superiores se debe realizar el procedimiento anterior las veces que sean requeridas hasta obtener los valores deseados caso contrario no se puede continuar con la medición del ADN.

Una vez obtenidos estos valores, se colocó 2 µl de muestra de ADN primero de *Mytella guyanensis* y después de *Cassotrea columbiensis*, no puedo realizar la medición de las muestras simultáneamente y vez que coloque la muestra seleccionamos medir o measure y observamos los resultados en la computadora.

Debemos considerar que siempre que coloquemos una muestra se debe limpiar el sitio donde va la muestra, también debemos considerar que la cantidad mínima de ADN para realizar el proceso de PCR y observar la proteína es de 10 ng/ µl.

## **2.4. Evaluación de Primers**

Para evaluar los primers utilizamos el programa Ugene, en el cual tomamos la secuencia de *Mytella guyanensis* y *Crassostrea columbiensis*, la colocamos en el programa, también colocamos nuestros primers forward y reverse para así observe si estos funcionan y proceder a realizar la amplificación.

## 2.5. PCR

Para el procedimiento de PCR se preparó un Mix para 18 tubos incluyendo mis controles negativos que contenía lo siguiente: Agua Ultrapura 316.8  $\mu$ l, Buffer a 5x 45  $\mu$ l,  $Cl_2Mg$  a 25 mM 13.5  $\mu$ l, Dntp's 9  $\mu$ l, Taq 2.7  $\mu$ l, se colocó 21.5  $\mu$ l del Mix en cada uno de los 18 tubos, se adicionó los Primers Forward y Reverse del gen de Metalotioneína, se colocó 1.25  $\mu$ l de cada primer en cada tubo y finalmente se adicionó 1  $\mu$ l de ADN a cada tubo, teniendo así una solución de 25  $\mu$ l.

Una vez terminado el procedimiento se llevó los tubos a un multiciclador, en el cual los valores fueron: 94°C por 3 minutos, 94°C por 30 segundos, los tubos de *Mytella guyanensis* se colocaron a 52°C y los de *Crassostrea columbiensis* a 51°C, 72°C por un minuto, 72°C por 5 minutos, esto se realizó durante 35 ciclos. El proceso tardó 1 hora 39 minutos.

## 2.6. Electroforesis

Para la electroforesis se preparó un gel con Agarosa al 1% con 50 ml de 1xTae esto se colocó en un frasco, se calentó durante 1 minuto 30 segundos en un horno microondas.

Después se agitó y se colocó 5  $\mu$ l de colorante, se lo llevó al molde para la electroforesis, se lo colocó gradillas para poder hacer agujeros en los que se colocó la solución de los tubos una vez terminado el proceso del multiciclador, y se dejó enfriar.

Cuando tuvimos listos los tubos tomamos 20  $\mu\text{l}$  de muestra y se los colocó en el gel desde el segundo agujero primero el control negativo, después el control positivo. Se colocó 4  $\mu\text{l}$  de marcador de peso molecular en el primer orificio. Se realizó la electroforesis a 150 v durante 30 minutos.

## **2.7. Observación del gel**

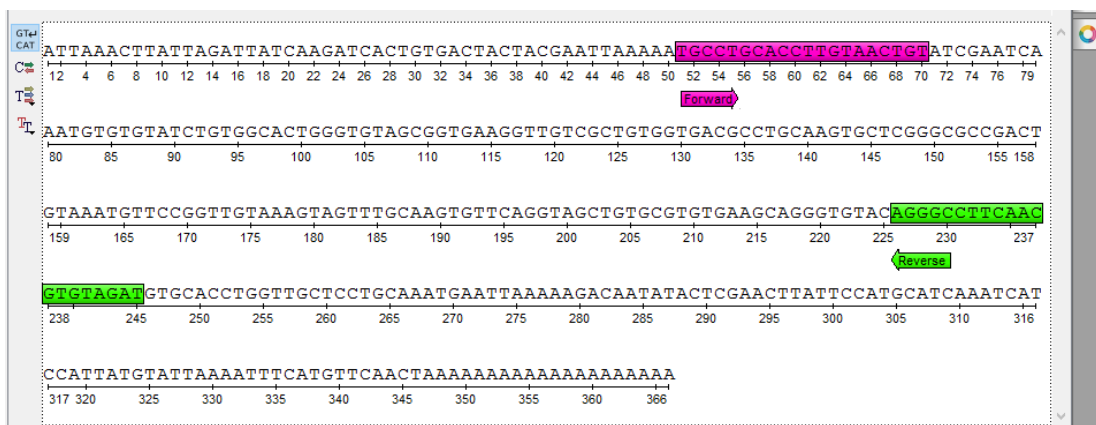
Cuando finalizó la electroforesis, se llevó el gel hacia una cámara UV y se observó las bandas obtenidas después del procedimiento antes mencionado, mediante una fotografía.

## CAPÍTULO 3

### ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1. Evaluación de Primers.

Después de haber analizado con el programa Ugene obtuvimos que nuestros primers se encontraban listos para ser incluidos en la amplificación.



**Figura 1.3: Región de los primers en la cadena de ADN de *Mytella guyanensis* mediante el programa Ugene.**

En la figura 1.3 podemos observar la región en la que los primers se complementaron a la cadena de ADN de *Mytella guyanensis*, estos nos indica que se encuentran presentes en el genoma de la especie de interés. Además, se realizó una evaluación en la cual obtuvimos los siguientes resultados:

Template strand	Length	Start	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Plus.	20	51	59.82	50.00	4.00	3.00
Minus.	20	226	60.25	55.00	6.00	2.00

**Tabla: 1.3 Evaluación de primers de *Mytella guyanensis***

En el caso de *Crassostrea columbiensis* los resultados obtenidos fueron los siguientes:



**Figura 2.3: Región de los primers en la cadena de ADN de *Crassostrea columbiensis* mediante el programa Ugene.**

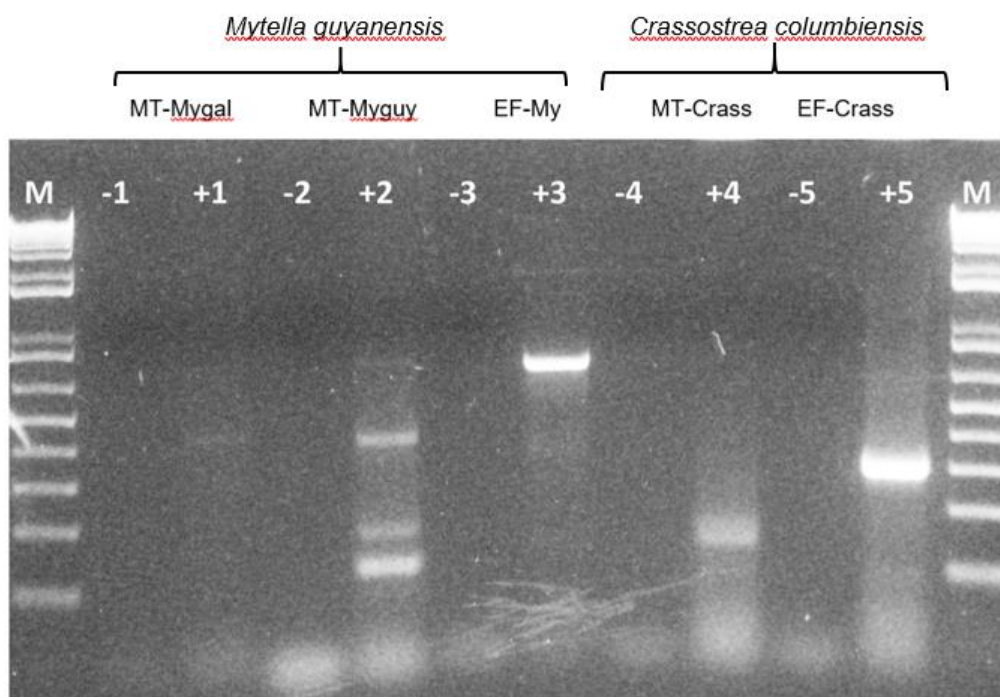
En la figura 2.3 se observa cómo se complementa los primers en la cadena de ADN en el cual el color morado indica el primer forward y el color verde el primer reverse.

Template strand	Length	Start	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Plus.	20	50	60.32	50.00	6.00	2.00
Minus.	20	168	59.96	55.00	4.00	2.00

**Tabla: 2.3. Evaluación de primers de *Crassostrea columbiensis***

Es importante conocer los resultados mostrados en la tabla 1.3 y 2.3 ya que sin estos no se podría garantizar el correcto diseño y la viabilidad de los primers.

Después de la amplificación se obtuvo los siguientes resultados:



**Figura 3.3: Amplificación del gen de Metalotioneína**



En la figura 3.3 observamos la letra M el marcador utilizado que va en múltiplos de 100 de abajo hacia arriba y en control positivo +2 de *Mytella guyanensis* (MT-Myguy) observamos que entre la primera y la segunda banda que muestra el marcador (M) se observa una banda que esta aproximadamente a 175 bp y en el control positivo de *Crassostrea columbiensis* (MT-Crass) +4 observamos una banda que está en 200 bp. También se observa bandas en EF-My y EF-Crass esto es un ADN de referencia llamado elongación factor y no influye en nuestros resultados.

### 3.2. Comparación de Métodos de extracción de ADN

Utilizando los métodos fenol cloroformo y por calentamiento se obtuvieron los siguientes resultados:

ORGANISMO	CONCENTRACIÓN DE ADN (ng/μl)	PUREZA 260/280	
MEJILLONES	7.547	1.9	
OSTIONES	5.341	1,8	

Tabla: 3.3. Resultados obtenidos con la extracción con el método fenol-cloroformo

<b>ORGANISMO</b>	<b>CONCENTRACIÓN DE ADN (ng/μl)</b>	<b>PUREZA 260/280</b>	
<b>MEJILLONES</b>	39	1.7	
<b>OSTIONES</b>	2.625	1,8	

**Tabla: 4.3. Resultados obtenidos con la extracción con el método por calentamiento**

Como se muestra en las tablas 3.3 y 4.3 el método que dio mejores resultados fue el método fenol cloroforma ya que se obtuvo mayor concentración de ADN y una mejor pureza.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

1. Se comprobó que el método fenol-cloroformo fue más efectivo que el método por calentamiento.
2. Los primers están correctamente diseñados fueron viables para la amplificación.
3. Se determinó la presencia del gen de la metalotioneína en *Mytella guyanensis* y *Crassostrea columbiensis*.

### Recomendaciones

1. Realizar la amplificación de ADN un día después de la extracción.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Laurent and others, “Variación Estacional de Metalotioneinas en la Pepitona Arca zebra (Bivalvia: Arcidae) y su Relación con los Niveles de Metales y el Índice de Condición en la Localidad de Guayacán. Edo. Sucre, Venezuela.,” 2014.
- [2] T. T. Y. Le, S. Zimmermann, and B. Sures, “How does the metallothionein induction in bivalves meet the criteria for biomarkers of metal exposure?,” *Environ. Pollut. Barking Essex 1987*, vol. 212, pp. 257–268, May 2016.
- [3] Acosta, V y Lodeiros, C. «Evaluación del efecto del cobre sobre juveniles de mejillón verde Perna Viridis mediante la concentración de ADN y la relación ARN/ADN en el músculo abductor». 2001, Revista científica FCV-LUZ/ Vol. XI, N°6, 485-490.
- [4] Quiroga,R., “Indicadores ambientales y de desarrollo sostenibles: avances y perspectivas para América Latina y el Caribe”. 2007. CEPAL Serie 55.
- [5] R. Scudiero, P. Creti, F. Trinchella, and M. Grazia Esposito, “Evaluation of cadmium, lead and metallothionein contents in the tissues of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Campania coast (Italy): Levels and seasonal trends,” *C. R. Biol.*, vol. 337, no. 7–8, pp. 451–458, Jul. 2014.
- [6] Hernandez-Hernandez, F.M.; Ansuategui, J.; Connesa, M., “Concentraciones de Metales pesados en algunos organismos marinos del mar Mediterráneo Catellon.” s.n., 1990.
- [7] V. Mićović, A. Bulog, N. Kučić, H. Jakovac, and B. Radošević-Stašić, “Metallothioneins and heat shock proteins 70 in marine mussels as sensors of environmental pollution in Northern Adriatic Sea,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 28, no. 3, pp. 439–447, Nov. 2009.
- [8] R. Ureña Robles, “Metalotioneínas en peces y gasterópodos: su aplicación en la evaluación de la contaminación.,” 2006.

- [9] M. Lemus, N. Rojas, L. Rojas-Astudillo, and K. Chung, "Metalotioninas en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae): variación estacional y su relación con la biología reproductiva," *Rev Biol Trop.*, vol. 61, no. 2, pp. 701–709, 2013.
- [10] B. R. Ozonas, "Metalotioneína y algunos elementos minerales como bioindicadores en toxicología y clínica," *Monogr. Real Acad. Nac. Farm.*, 2010.
- [11] E. Figueira, D. Branco, S. C. Antunes, F. Gonçalves, and R. Freitas, "Are metallothioneins equally good biomarkers of metal and oxidative stress?," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 84, pp. 185–190, Oct. 2012.
- [12] E. Goretti, M. Pallottini, M. I. Ricciarini, R. Selvaggi, and D. Cappelletti, "Heavy metals bioaccumulation in selected tissues of red swamp crayfish: An easy tool for monitoring environmental contamination levels," *Sci. Total Environ.*, vol. 559, pp. 339–346, Jul. 2016.
- [13] S. Fasulo, A. Mauceri, A. Giannetto, M. Maisano, N. Bianchi, and V. Parrino, "Expression of metallothionein mRNAs by in situ hybridization in the gills of *Mytilus galloprovincialis*, from natural polluted environments," *Aquat. Toxicol.*, vol. 88, no. 1, pp. 62–68, Jun. 2008.
- [14] V. Leignel and M. Laulier, "Isolation and characterization of *Mytilus edulis* metallothionein genes," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 142, no. 1–2, pp. 12–18, Jan. 2006.
- [15] G. Andreani, E. Carpenè, G. Capranico, and G. Isani, "Metallothionein cDNA cloning, metallothionein expression and heavy metals in *Scapharca inaequivalvis* along the Northern Adriatic coast of Italy," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 74, no. 3, pp. 366–372, Mar. 2011.
- [16] T. T. Y. Le, S. Zimmermann, and B. Sures, "How does the metallothionein induction in bivalves meet the criteria for biomarkers of metal exposure?," *Environ. Pollut.*, vol. 212, pp. 257–268, May 2016.
- [17] R. A. Cruz and C. R. Villalobos, "Shell length at sexual maturity and spawning cycle of *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) from Costa

- Rica,” *Rev. Biol. Trop. J. Trop. Biol. Conserv.*, vol. 41, no. 1, pp. 89–92, 1993.
- [18] A. K. Nishida and R. M. V. Leonel, “Occurrence, population dynamics and habitat characterization of *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819)(Mollusca, Bivalvia) in the Paraíba do Norte river estuary,” *Bol. Inst. Ocean.*, vol. 43, no. 1, pp. 49–57, 1995.
- [19] “*Mytella guyanensis* - shell valve internal view,” *Encyclopedia of Life*. [Online]. Available: [http://eol.org/data\\_objects/26485901](http://eol.org/data_objects/26485901). [Accessed: 08-Sep-2016].
- [20] “*Mytella guyanensis*,” *NaturaLista*. [Online]. Available: <http://naturalista.conabio.gob.mx/taxa/470497-Mytella-guyanensis>. [Accessed: 08-Jul-2016].
- [21] “*Crassostrea columbiensis*,” *NaturaLista*. [Online]. Available: <http://naturalista.conabio.gob.mx/taxa/196207-Crassostrea-columbiensis>. [Accessed: 08-Jul-2016].
- [22] “Image of *Crassostrea columbiensis*,” *Encyclopedia of Life*. [Online]. Available: [http://eol.org/data\\_objects/13123566](http://eol.org/data_objects/13123566). [Accessed: 09-Sep-2016].
- [23] M. Cruz, “Malacofauna bentónica existente en los alrededores de la ciudad de guayaquil (Estero Salado y Río Guayas), durante 2003.” *Acta oceanográfica del Pacífico*, 2003.
- [24] M. Lemus, N. Rojas, L. Rojas-Astudillo, and K. Chung, “Metalotioninas en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae): variación estacional y su relación con la biología reproductiva,” *Rev Biol Trop.*, vol. 61, no. 2, pp. 701–709, 2013.
- [25] R. Ureña Robles, “Metalotioneínas en peces y gasterópodos: su aplicación en la evaluación de la contaminación.” 2006.
- [26] B. R. Ozonas, “Metalotioneína y algunos elementos minerales como bioindicadores en toxicología y clínica,” *Monogr. Real Acad. Nac. Farm.*, 2010.

- [27] E. Moltó, “Clonaje, Expresión y Caracterización estructural de una nueva metalotioneína en crustáceos, a partir de la langosta *Panulirus argus*,” Doctorado, Universidad de Castilla-La Mancha, España, 2005.
- [28] J. Amiard, C. Amiardtriquet, S. Barka, J. Pellerin, and P. Rainbow, “Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 76, no. 2, pp. 160–202, Feb. 2006.
- [29] G. Roesijadi, “Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 22, no. 2, pp. 81–113, 1992.
- [30] N. Sakulsak, “Metallothionein: an overview on its metal homeostatic regulation in mammals,” *Int J Morphol*, vol. 30, no. 3, pp. 1007–1012, 2012.
- [31] E. Brambila and E. González, “Las Metalotioneinas ¿Cestos de basura o proteínas clave en el metabolismo celular?,” *Elementos*, vol. 3, no. 19, pp. 3–9, 1993.
- [32] P. Dziegiel, B. Pula, C. Kobierzycki, M. Stasiolek, and M. Podhorska-Okolow, “Metallothioneins: Structure and Functions,” in *Metallothioneins in Normal and Cancer Cells*, vol. 218, Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 3–20.
- [33] L. Vergani, M. Gattarola, F. Dondero, and A. Viarengo, “Expression, Purification and Characterization of Metallothionein-A from rainbow trout,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 27, pp. 338–345, 2003.
- [34] J. H. Beattie and I. Bremner, “Metallothioneins,” in *Trace Elements in Man and Animals 10*, Springer, 2002, pp. 961–967.
- [35] S. Aceto, G. Formisano, F. Carella, G. De Vico, and L. Gaudio, “The metallothionein genes of *Mytilus galloprovincialis*: Genomic organization, tissue expression and evolution,” *Mar. Genomics*, vol. 4, no. 1, pp. 61–68, Mar. 2011.

- [36] B. Raspor and J. Pavicic, "Electrochemical methods for quantification and characterization of metallothioneins induced in *Mytilus galloprovincialis*," *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 354, no. 5–6, pp. 529–534, 1996.
- [37] P.-A. Binz and J. H. Kägi, "Metallothionein: molecular evolution and classification," in *Metallothionein Iv*, Springer, 1999, pp. 7–13.
- [38] E. Brambila and P. Lozano, "Metalotioneínas, Bioquímica y Funciones propuestas," *BEB*, vol. 17, pp. 21–27.
- [39] J. Amiard, C. Amiardtriquet, S. Barka, J. Pellerin, and P. Rainbow, "Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers," *Aquat. Toxicol.*, vol. 76, no. 2, pp. 160–202, Feb. 2006.
- [40] S. Aceto, G. Formisano, F. Carella, G. De Vico, and L. Gaudio, "The metallothionein genes of *Mytilus galloprovincialis*: Genomic organization, tissue expression and evolution," *Mar. Genomics*, vol. 4, no. 1, pp. 61–68, Mar. 2011.
- [41] V. Leignel, Y. Hardivillier, and M. Laulier, "Small Metallothionein MT-10 Genes in Coastal and Hydrothermal Mussels," *Mar. Biotechnol.*, vol. 7, no. 3, pp. 236–244, Jun. 2005.
- [42] D. Ivanković, J. Pavičić, S. Kozar, and B. Raspor, "Multiple forms of metallothionein from the digestive gland of naturally occurring and cadmium-exposed mussels, *Mytilus galloprovincialis*," *Helgol. Mar. Res.*, vol. 56, no. 2, pp. 95–101, Jun. 2002.
- [43] L. Vergani, M. Grattarola, E. Grasselli, F. Dondero, and A. Viarengo, "Molecular characterization and function analysis of MT-10 and MT-20 metallothionein isoforms from *Mytilus galloprovincialis*," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 465, no. 1, pp. 247–253, Sep. 2007.
- [44] R. Orihuela, J. Domènech, R. Bofill, C. You, E. A. Mackay, J. H. R. Kägi, M. Capdevila, and S. Atrian, "The metal-binding features of the recombinant mussel *Mytilus edulis* MT-10-IV metallothionein," *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 13, no. 5, pp. 801–812, Jun. 2008.



- [45] R. Ladhar-Chaabouni, M. Machreki-Ajmi, and A. Hamza-Chaffai, "Use of metallothioneins as biomarkers for environmental quality assessment in the Gulf of Gabès (Tunisia)," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 184, no. 4, pp. 2177–2192, Apr. 2012.
- [46] L. Wang, L. Song, D. Ni, H. Zhang, and W. Liu, "Alteration of metallothionein mRNA in bay scallop *Argopecten irradians* under cadmium exposure and bacteria challenge," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 149, no. 1, pp. 50–57, Jan. 2009.
- [47] P. de Francisco, L. M. Melgar, S. Díaz, A. Martín-González, and J. C. Gutiérrez, "The Tetrahymena metallothionein gene family: twenty-one new cDNAs, molecular characterization, phylogenetic study and comparative analysis of the gene expression under different abiotic stressors," *BMC Genomics*, vol. 17, no. 1, Dec. 2016.
- [48] W. Khati, K. Ouali, C. Mouneyrac, and A. Banaoui, "Metallothioneins in Aquatic Invertebrates: Their Role in Metal Detoxification and their Use in Biomonitoring," *Energy Procedia*, vol. 18, pp. 784–794, 2012.
- [49] S. Arias and C. Del Rocio, "Proyecto recreacional Puerto Hondo y su ecoturismo como factor de desarrollo económico en la ciudad de Guayaquil 2006-2009," 2011.
- [50] L. Moserrate, J. F. Medina, and P. Calle, "Estudio de Condiciones Físicas, Químicas y Biológicas en la Zona Intermareal de Dos Sectores del Estero Salado con Diferente Desarrollo Urbano," Universidad de Guayaquil, Guayaquil, 2011.
- [51] J. Fraga Nodarse, J. Rodríguez, O. Fuentes, M. Castex, and A. Fernández-Calienes, "Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)," *Rev. Cubana Med. Trop.*, vol. 56, no. 3, pp. 203–207, 2004.

## **ANEXOS**



Figura 1.2: Termociclador para PCR



Figura 2.2: Tubos después de la PCR para electroforesis

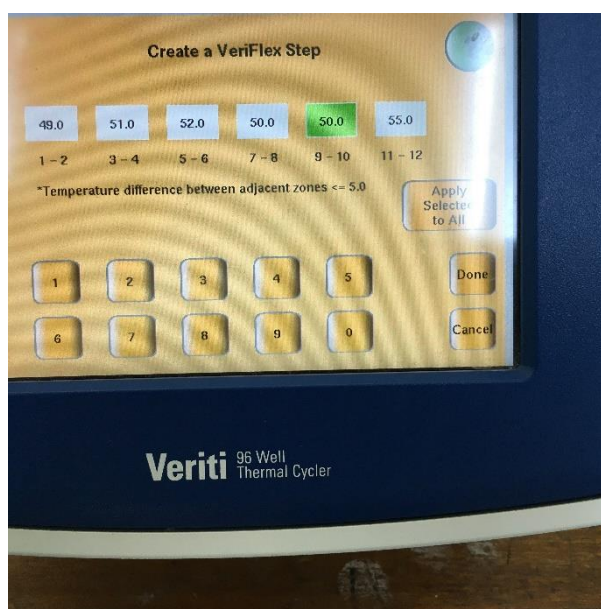


Figura 3.2: Temperaturas utilizadas en el termociclador para PCR

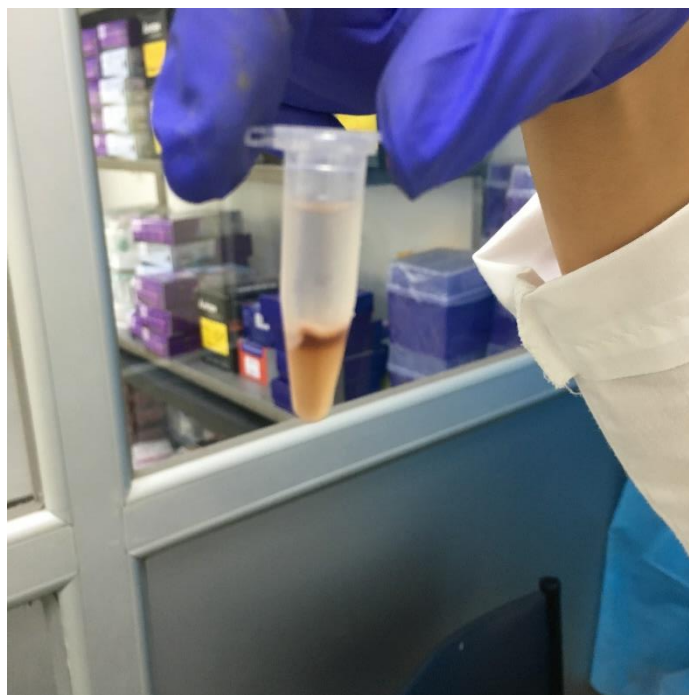


Figura 4.2: Extracción de ADN con el método fenol clorforma después de agregar fenol-cloroformo



Figura 5.2: Nanodrop 2000 utilizado para cuantificar la concentración y pureza de ADN