

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

Facultad de Ingeniería Marítima Ciencias Biológicas, Oceanográficas y

Recursos Naturales



## **“ANÁLISIS DEL GEN DE METALOTIONEÍNAS EN LA FAMILIA MYTILIDAE PARA EL DISEÑO DE PRIMERS PARA PCR”**

**Proyecto Integrador**

Previo a la obtención del Título de:

**BIÓLOGO**

Presentado por:

Edison Geovanny Valencia Bravo

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**2015**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco infinitamente a Dios y a mi familia, también a mi tutora del proyecto Dra. Ana Tirapé Bajaña por sus enseñanzas, paciencia y sobre todo por sus consejos y a todos los que me han ayudado.

## **DEDICATORIA**

Dedicado a mi familia y a todos lo que me han ayudado, a mi abuelita que falleció.

## DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido  
de este Proyecto Integrador  
me corresponde exclusivamente;  
y el patrimonio intelectual de la misma  
a la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Edison Valencia

Edison Valencia Bravo

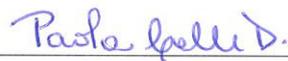
## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



---

Ana Tirape Bajaña, Ph. D.

Tutora del Proyecto Integrador



---

Katuska Calle Delgao, Ph. D.

Presidenta del Tribunal

## RESUMEN

Este proyecto integrador, consiste en analizar el gen de metalotioneínas (MTs) en bivalvos, para el diseño de *primers*. Dentro de los bivalvos, tenemos las especies *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis* moluscos filtradores que pertenecen a la familia Mytilidae, estos representan organismos modelos, debido a que son especies que han sido estudiadas y publicadas. Las mismas que han servido como punto de referencia para poder estudiar a una especie reportada en Ecuador como lo es *Mytella guayanensis*.

Utilizamos estos individuos en el presente proyecto para realizar el diseño de *primer*, a partir de alineamientos de secuencias conservadas, con el fin de que en un futuro este proyecto sea una referencia en investigación del estudio de la expresión del gen de metalotioneínas en bivalvos, a través de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polimerase Chain Reaction).

En consecuencia, este estudio constituye un primer aporte en el diseño de *primers* para las MTs en la especie de mejillones *Mytella guyanensis* especie que se encuentran en el Ecuador a diferencia de *Mytilus galloprovincialis* que es una especie que no se encuentra en el país. De igual manera, es importante mencionar el empleo de organismos modelos, los mismos que han sido designados en este contexto debido a los amplios estudios efectuados en diversos países y la basta información referente a su estructura molecular y funcional, nos facilitan la búsqueda de las secuencias de nucleótidos necesarias para analizar el gen de las MT dentro de su genoma.

Cabe recalcar, el uso correcto de la base de datos, para la búsqueda de secuencias de nucleótidos, que es importante para el diseño de los *primers*.

**Palabras claves:** metalotioneinas, diseño de *primers*, base de datos, diseño, secuencias de ADN, GenBank.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE ANEXOS.....	X
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPITULO I. NFORMACIÓN GENERAL .....	3
CAPITULO II. MATERIALES YMÉTODOS.....	17
CAPITULO III. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS .....	21
CONCLUSIONES .....	30
RECOMENDACIONES .....	31
ANEXOS .....	32
BIBLIOGRAFÍA .....	35

## **ABREVIATURAS**

**MTs:** Metalotioneina.

**PCR:** (Reaction Chain Polimerase) Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**NCBI:** (National Center for Biotechnology Information) Centro Nacional para la información Biotecnológica

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de la metalotioneína en mamíferos dividida en dos dominios.....	5
<b>Figura 2.</b> La comparación de secuencias y las características estructurales de las proteínas MT.....	9
<b>Figura 3.</b> Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de la MT vertebrado .....	10
<b>Figura 4.</b> Árbol de consenso obtenido por la filogenia bayesiana de la interferencia de las secuencias de nucleótidos .....	11
<b>Figura 5.</b> <i>Mytella guyanensis</i> .....	18
<b>Figura 6.</b> Búsqueda en NCBI .....	19
<b>Figura 7.</b> Obtención de secuencia de nucleótidos.....	22
<b>Figura 8:</b> Resultados de la búsqueda de secuencias.....	23
<b>Figura 9:</b> Formato Fasta de la secuencia AY566248.....	24
<b>Figura 10:</b> Observación de la página para elaborar el diseño de primer.....	25
<b>Figura 11:</b> Insertando secuencia de referencia.....	26
<b>Figura 12:</b> Pasos para la obtención de <i>Primers</i> .....	26
<b>Figura 13:</b> Obtención de los <i>primers</i> .....	27
<b>Figura 14:</b> Resultados sobre los parámetros.....	29

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A.....	33
ANEXO B .....	34

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha elevado el interés por evaluar el efecto de la contaminación en el medio marino. Muchos invertebrados y vertebrados han sido objeto de estudio en investigaciones relacionadas con la contaminación ambiental, sobre todo cuando los ecosistemas acuáticos sufren contaminación por la presencia de metales pesados principalmente en zonas templadas. Sin embargo, pocos estudios se han realizado al respecto, en las zonas tropicales a la cual pertenece nuestro país y cada vez más se hace necesario, el empleo de organismos acuáticos, que permitan cuantificar el impacto ambiental, causado por la contaminación en los ecosistemas marinos (1). Los organismos modelos empleados en este tipo de estudios toman el nombre de bioindicador, los cuales son especies vegetales, o animales; que nos brindan información sobre ciertas características ecológicas, físico-químicas, microclimáticas, biológicas y funcionales del medio ambiente, o sobre el impacto de ciertas prácticas en el medio (2). En este contexto, dentro de los bivalvos, las especies *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis*, que pertenecen a la familia Mytilidae, han

sido muy estudiadas y publicadas en países europeos, por lo que se han convertido en organismos modelos de bioindicadores ambientales (3).Adicionalmente, 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 (4).

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas pequeñas capaces de unirse a iones metálicos, su estudio ha sido de gran interés en los últimos 10 años, principalmente debido a su capacidad de enlazarse con metales pesados, así como por ser indicadores de toxicidad celular y claves para la respuesta ante situaciones de estrés fisiológico en diversos organismos. Las MTs tienen un rol ecotoxicológico a considerar, ya que su síntesis constituye una respuesta específica a elevadas concentraciones de metales; razón para ser empleadas como potencial biomarcador de contaminación ambiental tanto en vertebrados como en invertebrados (3, 4, 5,).

En el presente proyecto integrador se propone el análisis de secuencias del gen de las MTs, para diseñar *primers* (secuencias genéticas cortas no mayores a 25 nucleótidos que dan la señal de inicio y de terminación de una determinada región de un gen que se amplifica por PCR), los cuales serán utilizados para futuros estudios de la expresión de este gen en la especie de *Mytella guyanensis* que se encuentran en el Ecuador.

# **CAPITULO I**

## **INFORMACIÓN GENERAL**

### **1.1. Metalotioneínas:**

#### **1.1.1. Características**

Las MTs son proteínas intracelulares no enzimáticas termoestables, solubles en agua y poseen varios grupos de cisteína. Se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza, formando parte tanto del reino animal como vegetal. Fueron descubiertas por Margoshes y Valle en 1957, al identificar una proteína que se unía al cadmio en el riñón del caballo (6,7). Diversos estudios realizados, atribuyen a las MTs funciones como: destoxificación de metales no esenciales, protección de la célula frente al estrés oxidativo, suministro de metales esenciales al interior celular en el control homeostático de la absorción, metabolismo de cobre y zinc, entre otras (7).

Las MTs se distinguen del resto de proteínas por tener características y propiedades únicas, dentro de las cuales se encuentran bajo peso molecular de 6 a 10 kD, una

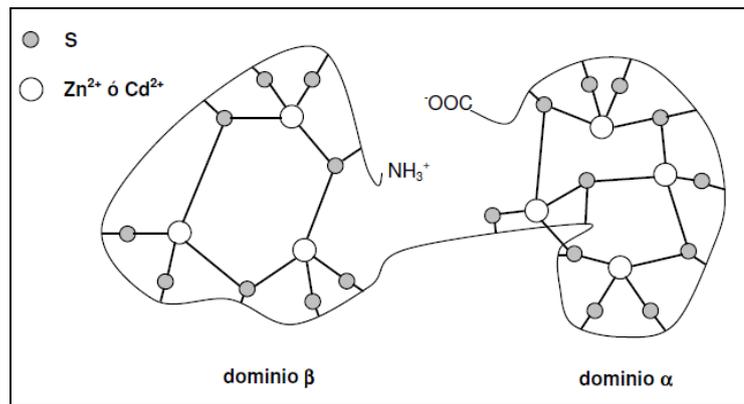
secuencia de 61 o 62 aminoácidos con una elevada porción de cisteínas (20 aminoácidos) y su capacidad de unir cationes de  $\text{Cu}^{+1}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  entre otros, mediante átomos de azufre elemental (8). A nivel celular se encuentran en el citoplasma, núcleo y lisosomas. Predominan en el hígado y riñón de los vertebrados; y en la glándula digestiva e intestinos de los invertebrados (7).

### **1.1.2. Estructura**

A través de la difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear la estructura tridimensional de las MTs ha sido esclarecida en numerosas especies (5).

En mamíferos están organizadas espacialmente en dos dominios o *clusters* ( $\alpha$  y  $\beta$ ), el dominio  $\alpha$  (C-terminal) formado por 11 residuos de cisteína capaces de captar 4 átomos de metal y el dominio  $\beta$  (N-terminal) formado por 9 residuos de cisteínas, que captan 3 átomos de metal. Estos dominios también se presentan en la estructura de la MT del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (5) (Figura 1).

Sin embargo, en distintos invertebrados se ha descrito la existencia de dos dominios con 9 residuos de cisteína cada uno, correspondiente a 2 *cluster*  $\beta$  por molécula (7); mostrando una proteína monomérica con capacidad de captar 6 átomos de metal en total.



**Figura 1.** Estructura de la metalotioneína en mamíferos dividida en dos dominios  
**Fuente:** Molto Perez, E. Clonaje expresión y caracterización de MTs. 2005 (5).

Pese a la diferencia enunciada anteriormente, las MTs comparten características que han permitido agruparlas en familias, subfamilias y subgrupos, en donde la inclusión de una MT en particular, está determinada por la alineación de su secuencia de aminoácidos (5). En la actualidad existen 15 familias de MTs (Anexo A) que poseen un patrón específico de secuencia, las mismas que guardan una relación intrínseca con la escala evolutiva de los organismos donde han sido identificadas, desde organismos unicelulares hasta vertebrados superiores y ejemplares del reino vegetal (7,8).

### 1.1.3. Clasificación y Polimorfismo.

En base a sus características estructurales, las MT están clasificadas en tres clases:

Clase I: Polipéptidos de 61 a 62 aminoácidos con residuos de cisteínas en forma similar a las MTs descritas en el riñón del caballo (11). Poseen alto contenido de metales pesados (4-12 átomos/M) y de cisteínas (22–33%), homología estructural y/o funcional con las MTs de mamíferos. Las MTs de Clase I han sido reportadas; en peces: *Salmo gairdneri*, *Pleuronecte splatessa*, *Pseudo pleuronectes americanus*; en el bivalvo *Mytilus edulis*, el cangrejo *Scylla serrata* y en la langosta *Homarus americanu*, por nombrar algunas (8).

Clase II: Polipéptidos de secuencias de aminoácidos con poca homología a las MTs aisladas en mamíferos, la posición de residuos de cisteínas no corresponde con la distribución de cisteínas de las MTs que comprenden las de la Clase I.

Se las ha encontrado en ciertos eucariotes unicelulares (levaduras), procariotes (bacterias); en el erizo de mar *Strongylocentrus purpuratus* y el nematodo *Caenorhabditis elegans* (6).

Todas las MTs correspondientes a la Clase I y II, se caracterizan por ser proteínas de cadena sencilla, codificadas por genes estructurales para su síntesis; los cuales han sido secuenciados en varios organismos.

Clase III: Polipéptidos de secuencia corta y atípica a las MTs de Clase I y II; constituidos por la repetición de 2 a 11 unidades de glutaimil-cisteinil. Reciben el nombre de fitoquelatinas cuando el aminoácido del carboxilo terminal es glicina, u

homofitoquelatinas cuando el aminoácido terminal es  $\beta$ -alanina. Poseen la capacidad de formar compuestos intracelulares estables para unir iones metálicos (9). Estas metaloproteínas están formadas por 2 o más cadenas polipeptídicas de longitud variable; su síntesis no está asociada a genes estructurales. Han sido identificadas en algas, levaduras y plantas superiores (6,10).

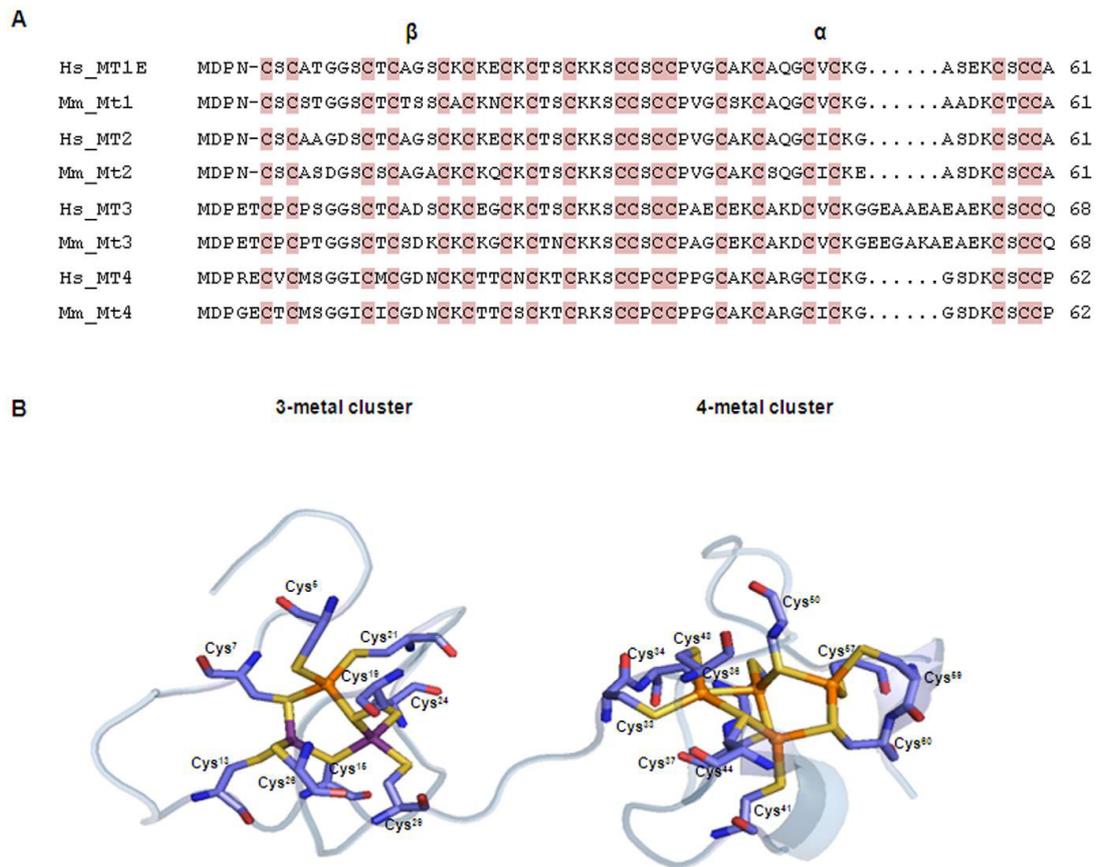
Es conocido que en algunos organismos existen diferencias en la estructura primaria de las MTs que sintetizan; Un ejemplo clave de este caso se da en la mayoría de los tejidos de mamíferos, en donde expresan dos o más formas moleculares o isoformas de clase MTI y MTIII mientras que, al ser sometidas a cromatografía líquida de alta resolución, se separan en formas moleculares adicionales: MTIa, MTIb, MTIc, MTIIa, entre otras (8). Cada isoforma muestra una afinidad diferente de unión para cada metal en particular o aún por un mismo metal, característica que se presume puede estar vinculada a las funciones biológicas de las MTs.

El polimorfismo más complejo de las MTs se lo conoce en el ser humano, en donde se ha descrito 12 genes de isoformas de metalotioneínas, algunos de ellos característicos de algún tejido en particular (11).

#### **1.1.4. Evolución de las MTs**

Las MTs cumplen un amplio rango de funciones como: desintoxicación de metales tóxicos de mercurio y cadmio, son versátiles porque se las han encontrado desde las bacterias hasta en los hongos, protistas, plantas, y en grupos animales (5,6). A pesar de los estudios en las MTs, se conoce muy poco sobre su origen, evolución y diversificación. La evolución todavía es desconocida en estas proteínas de unión a

metales tóxicos. Los miembros de la superfamilia de proteína MTs han evolucionado a través de rondas de eventos de duplicación y pérdida de secuencias de ADN que llevan al escenario heterogéneo actual (15). Las dificultades en la elaboración de las relaciones evolutivas en parte podrían atribuirse a la falta de estudios comparativos detallados (13, 14, 15). En mamíferos se han encontrado hasta cuatro genes codificantes de metalotioneínas (isoformas MTI, MTII, MTIII, MTIV). Estos genes se encierran todos en una misma región cromosómica, creando el cluster de metalotioneínas que se aclara evolutivamente como consecuencia de conocimientos de duplicación génica. En la especie humana, alguna familia (MTI) presenta todavía un grado superior de duplicidad, con subformas (MTIa, MTIb, etc), de las cuales se desconoce globalmente el significado funcional. En otras especies de mamífero, como el roedor, sólo se ha descrito la existencia de un miembro de cada familia (MTI a MTIV). Existe una gran similitud entre las diferentes isoformas de MT de una misma especie: en ratón las diferencias aminoacídicas van entre 15 aa (MTI-MTII) y 27 aa (MTI-MTIV). Esta similitud se recalca entre una misma proteína de diferentes especies (entre la MTIV de ratón y la humana hay únicamente 4 substituciones de aa). Contrariamente, existen grandes divergencias en el ámbito de los patrones de expresión de esta (15).



**Figura2:** La comparación de secuencias y las características estructurales de las proteínas MT. **Fuente:** Moleirinho Ana. Diversificación de Familia MT. Abril, 2011

(A) Secuencia de la alineación para el ser humano (Hs) y ratón (Mm) las proteínas. Las secuencias fueron alineadas con ClustalW.

(B) la representación estructural de la MT2 ratón (AP4 mt2) Listado de los dos grupos, se unen a metales y la organización espacial detallada, de los residuos con las cisteínas-S Átomos orientadas a iones metálicos. Los elementos de los siguientes colores: S (amarillo), O (rojo), N (azul oscuro), Zn (púrpura) y Cd (naranja) (15).

- **Las MTs en Invertebrados**

En los invertebrados las MTs han sido estudiadas por su diferencia entre secuencias de nucleótidos y por su estructura, se ha descrito la existencia de dos dominios con 9 residuos de cisteína cada uno, correspondiente a 2 cluster  $\beta$  por molécula (10); mostrando una proteína monomérica con capacidad de captar 6 átomos de metal en total. En la siguiente imagen se puede observar Diferentes Genes de MTs en varias especies de invertebrados examinadas en el GenBank.

**Table 1**

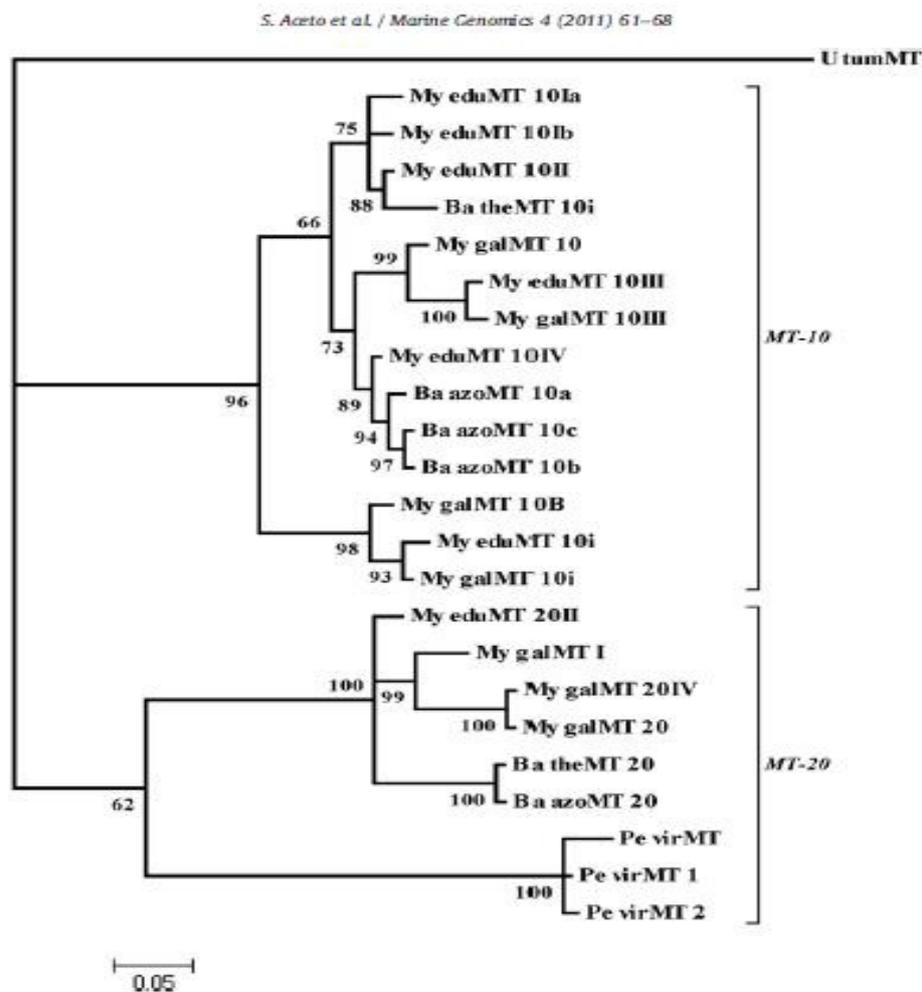
Species, gene name, accession number, and abbreviation of the nucleotide sequences examined. Asterisk indicates the sequences obtained in this work.

Species	Accession number	Gene	Abbreviation
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	AJ630215.1	MT-10	Ba_azoMT_10a
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	AJ630216.1	MT-10	Ba_azoMT_10b
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	AJ630217.1	MT-10	Ba_azoMT_10c
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	AJ630218.1	MT-20	Ba_azoMT_20
<i>Bathymodiolus thermophilus</i>	AJ577128.1	MT-10	Ba_theMT_10i
<i>Bathymodiolus thermophilus</i>	AJ630219.1	MT-20	Ba_theMT_20
<i>Mytilus edulis</i>	AJ005451.1	MT-10 Ia	My_eduMT_10Ia
<i>Mytilus edulis</i>	AJ005452.1	MT-10 Ib	My_eduMT_10Ib
<i>Mytilus edulis</i>	AJ005453.1	MT-10 II	My_eduMT_10II
<i>Mytilus edulis</i>	AJ005454.1	MT-10 III	My_eduMT_10III
<i>Mytilus edulis</i>	AJ007506.1	MT-10 IV	My_eduMT_10IV
<i>Mytilus edulis</i>	AJ577126.1	MT-10 B	My_eduMT_10i
<i>Mytilus edulis</i>	AJ005456.1	MT-20 II	My_eduMT_20II
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AY566248.1	MT-10 III	My_galMT_10III
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	DQ848984.1	MT-10 B	My_galMT_10B
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	HQ681034*	MT-10	My_galMT_10
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	HQ681035*	MT-10	My_galMT_10i
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AY566247.1	MT-20 IV	My_galMT_20IV
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	HQ681036*	MT-20	My_galMT_20
<i>Perna viridis</i>	AF036904.1	MT	Pe_virMT
<i>Perna viridis</i>	6652817	MT-2	Pe_virMT_2
<i>Perna viridis</i>	6652815	MT-1	Pe_virMT_1
<i>Unio tumidus</i>	EF185127.1	MT	U_tumMT

**Fuente 3:** S. Aceto et al. / Marine Genomics 4 (2011) 61-68

Así mismo, se han realizado análisis para verificar la correspondencia de los fragmentos clonados a genes MT. Las secuencias de nucleótidos eran en comparación

con las regiones genómicas de MT-10 y MT-20 genes de *M. edulis*, al gen MT-I de *M. galloprovincialis*, y para el MT-1 y MT-2 genes de *P. viridis* presentes en el GenBank(10).



**Figura 4:** Árbol de consenso obtenido por la filogenia bayesiana de la interferencia de las secuencias de nucleótidos que codifica MT de las especies enumeradas en la tabla 1. Números Mytilidae indica las probabilidades posteriores. **Fuente:** S. Aceto et al. / Marine Genomics 4 (2011) 61-68.

## **1. 2.Base de datos para el análisis de secuencias.**

Las bases de datos para el análisis de secuencias son colecciones que contiene información de áreas de investigación incluyendo genómica, proteómica, metabolómica, expresión génica mediante microarrays y filogenética, las cuales están disponibles en sitios web. El acceso a la información en estas bases de datos se realiza mediante números de acceso: identificadores únicos de registros de secuencias de proteínas o ADN (17,18).

Las bases de datos para analizar las secuencias de nucleótidos deben ser fuentes confiables entre ellas tenemos las siguientes:

- EMBL-BANK en el Instituto europeo de Bioinformática (EBI)
- DNA Data Bank of Japan (DDBJ) en el Centro de Información Biológica (CIB)
- GenBank en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI)

Aunque estas bases son mantenidas por distintos organismos en diferentes países, existe una cooperación y coordinación entre mismas. Es decir, una secuencia puede ser enviada a cualquiera de las bases, y una semana más tarde se verá reflejada en las otras dos. Por este motivo es indistinto que base se use para enviar nuevas secuencias, aunque normalmente los europeos utilizan EMBL-BANK y los americanos GenBank. (17). Para el diseño de los *primers* que se propondrán en este trabajo, se usaran secuencias presentes en la base de NCBI, debido a la disponibilidad en el uso.

### 1. 2. 1. Programas para diseñar *Primers*

Los *primers* de la PCR también denominados cebadores o iniciadores, son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con la región, complementaria al ADN molde, que se desea amplificar en el momento de realizar la PCR y dan el inicio de la reacción de elongación por la Taq ADN polimerasa (18). El diseño de los *primers* es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa, de este paso depende el éxito en el laboratorio. Para realizar este diseño existen herramientas claves, que consisten en diversos programas de Bioinformática, algunos de los cuales se encuentran disponibles en la web de forma gratuita. A continuación se explican diversos programas para el diseño de *Primers*:

- **Primers3Plus:** Es una interfaz web para una variante mejorada de primer3
- **PriFi:** Es una herramienta que se utiliza también en el diseño de *primers* a partir de un alineamiento múltiple de nucleótidos.
- **ICODEHOP:** Aplicación web para diseñar *primers* degenerados a partir de alineamientos múltiples de proteínas.
- **BatchPrimer3:** Realiza el diseño de los *primers* a partir de lotes de secuencias (16).

### **1. 2. 2. Criterios para el diseño de los *Primers***

Dentro de los criterios principales para un correcto diseño de *primers*, diversos factores deben ser tomados a consideración, los mismos que son enunciados a continuación:

- **Especificidad**

La longitud de los *primers* está directamente relacionada con la especificidad de los mismos, esta debería estar entre 20 y 25 pares de bases. Los *primers* deben ser seleccionados de tal modo que tengan una secuencia única dentro del DNA que será amplificado, con el fin de no dar lugar a productos no deseados (17).

- **Secuencias Complementarias**

Se debe evitar la auto-complementariedad entre los *primers*, puesto que se conoce que secuencias complementarias entre ellos podrían dar lugar a estructuras secundarias y formación de dímeros de *primers*. Para evitar este fenómeno el diseño debe considerar menos de 3 pares de bases de homología entre ellos. Si un primer tiene regiones homologas, se formarán estructuras parciales de doble cadena que interferirán con el alineamiento y (16). (Ver Anexo B).

- **Contenido de G/C**

La composición en la base de los *primers* debe mantener una relación entre el 45% y el 55% de Guaninas y Citosinas (G/C). El fin de esta relación es para impedir el reconocimiento no específico, así como evitar que existan interferencias entre el

primer y el molde de ADN, lo que puede causar una disminución de la eficacia en el momento de la amplificación (17).

- **Secuencia de los extremos 3'**

Está establecido que la posición terminal 3' en *primers* de PCR es esencial para el control de “mispriming”, que son amplificaciones específicas o no específicas durante una reacción de PCR. La inclusión de un residuo de G o de C en el extremo 3' de los *primers* ayuda a asegurar el correcto enlace en el extremo terminal 3' debido al enlace de hidrógeno más fuerte de los residuos G/C. También ayuda a mejorar la eficacia de la reacción (16,17).

- **Temperatura de Asociación**

La temperatura de asociación es uno de los factores más importantes dentro del correcto diseño de un *primer*. Para dichos efectos, es recomendado que se emplee como temperatura de asociación, la temperatura de fusión -5°C, aproximadamente. Existen diferentes métodos para calcular la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) por ejemplo:

- Para secuencias de 20 bp o menos, existe la siguiente aproximación:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} (A + T) + 4^{\circ}\text{C} (G + C)$$

Asumiendo que la concentración de sal es de 0.9M, típica en ensayos de hibridación.

- Para secuencias polinucleotídicas largas la fórmula a aplicar es:

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 500/L + 16.6 \log [M],$$

En donde L = Representa a la longitud del oligonucleótido y [M] = Es la concentración de cationes monovalentes.

El cálculo de estas temperaturas es referencial. Este tiene que ser validado a través pruebas de laboratorio, con diferentes temperaturas de asociación, cercanas a la temperatura de fusión, hasta lograr establecer la temperatura óptima para cada reacción (17).

## CAPITULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### **2.1. Material Biológico: *Mytella guyanensis***

En este proyecto se utilizará la especie *Mytella guyanensis*, que es un organismo que se encuentra reportado en el Ecuador, y que además cumple con las características para ser considerada una especie bioindicadora, tales como: abundancia, son organismos sésiles, son tolerantes a contaminantes y condiciones atmosféricas particulares.

- ***Mytella guyanensis*: Descripción**

Concha de forma acuñada, frágil, con el margen dorsal y ventral casi recto. Estructura finamente concéntrica, con periostraco de color pardo negruzco y opaco sobre el lado dorsal-posterior y café brillante en el lado ventral. Umbos no terminales. Talla media 53.00mm de longitud total (20).

- **Habitad y Distribución en el Ecuador**

Esta especie vive en ecosistemas de manglar, formando extensos bancos en un fango duro hasta 20 cm de profundidad. En Ecuador, su distribución es en las provincias de: Esmeralda, en el estuario interior del Golfo de Guayaquil, Puná, Puerto El Morro, Puerto Bolívar (19,20).

- **Taxonomía de la especie: *Mytella guyanensis***

**Reino:** Animalia

**Phylum:** Mollusca

**Clase:** Bivalvia

**Orden:** Mytiloidea

**Familia:** Mytilidae

**Género:** *Mytella*

**Especie:** *guyanensis*



**Figura 5:** *Mytella guyanensis*

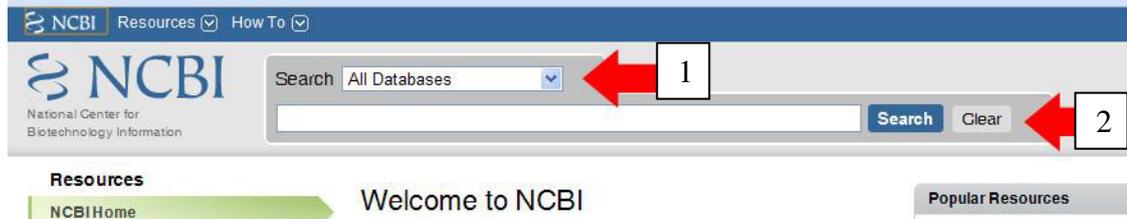
**Fuente:** INOCAR, 2015

## 2.2. Búsqueda de Secuencia de nucleótidos.

Como se describió en el punto 1.2 de la Información General existen varias bases de datos con información sobre secuencias de nucleótidos, pero nuestra fuente primaria será Genbank a través de la página web del NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/>). Esta es una base de datos primaria, es decir, un repositorio de todas las secuencias de nucleótidos disponibles.

### 2.3. Búsqueda en NCBI

La parte superior de la primera página del NCBI tiene una lista desplegable (1) y una casilla donde entrar los términos de la búsqueda (2), representados con flechas de color rojas:



**Figura 6.** Búsqueda en NCBI **Fuente:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>  
Por ejemplo, en la casilla de bases de datos seleccionamos **nucleótidos** y en la casilla de texto escribimos: **metalotioneínas**.

Al hacer click en "Go" y después de unos segundos obtenemos una salida, que contendrá un listado de secuencias de nucleótidos de metalotioneínas de varias especies. Esto está bien para una búsqueda preliminar, pero al refinar la búsqueda podemos introducir la especie que queremos estudiar o en su defecto una especie relacionada. Posteriormente, también nos va a interesar guardar las secuencias, para lo cual, nuestros próximos pasos van a ser:

- Analizar la salida para una secuencia y ver algunos formatos de secuencias.
- Descargar los resultados o guardarlos en una cuenta en el NCBI.
- Refinar una búsqueda para obtener resultados más específicos (16).

## **2.4. Alineamiento de Secuencia**

Luego de obtener la secuencia de nucleótidos referentes al gen a estudiar; se realiza un comparación con la cadena de nucleótidos que se desea alinear para que no se existan repeticiones de nucleótidos y/o regiones no complementarias. En caso de que la complementariedad no sea absoluta o significativa, empleando las diversas aplicaciones provistas en la página web de la NCBI, se fuerza o ajusta la secuencia de nucleótidos deseada con la cadena madre a la cual se va a alinear; para evitar la generación de regiones que no se complementen (21).

## **2.5. Diseño de *Primers***

Como ya se ha dicho con antelación existen varios programas para diseñar *primers*, pero Primer-BLAST que es uno de los programas más utilizados para el diseño de *primers* para PCR, es el que se empleará en este proyecto. El cual es un software de acceso gratuito, que está disponible en la página web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Aunque existen otros servidores web desde donde se puede correr, también viene incluido en varias aplicaciones y paquetes de bioinformática y además hay una versión Windows para ejecutar el programa directamente en una PC.

## CAPITULO III

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

A fin de desarrollar el presente proyecto, la búsqueda de información sobre las secuencias de nucleótidos del gen de MTs se realizó en la bases de datos del GenBank. Como en este proyecto se pretende diseñar *primers* para el bivalvo *Mytella guyanensis* (del cual no se dispone secuencias nucleotídicas en las bases de datos mundiales) se realizó una búsqueda en la que se planteó analizar secuencias de nucleótidos que representen el gen de Metalotioneínas en especies cercanas específicamente: *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis* que pertenecen a la familia Mytilidae. Los mismos que han sido ampliamente estudiados en diferentes tipos de investigaciones, y que, debido a su vasto conocimiento en relación a su morfología, fisiología y composición molecular son considerados organismos modelos para su estudio comparativo (22).

En primer término, es necesario entrar a las bases de datos o GenBank de la NCBI, escogiendo la opción “nucleotide”. Una vez seleccionada esta opción es necesario escribir, dentro de una barra que aparece, el nombre del gen (MTs) y del organismo, en inglés, para así obtener la secuencia de nucleótido requerido. Posterior a dicha actividad, dentro de la ventana mostrada, se referenciarán múltiples títulos de las investigaciones que se han reportado para el diseño de los *primers*.

2. Escribir en inglés “metallothioneim mussel” *mytelus galloprovincialis*

3. Presionar o dar clic en “search”

1. Seleccionar *Nucleotide*

The image shows a screenshot of the NCBI website. On the left, a navigation menu is visible with 'Nucleotide' highlighted. A red arrow points from the text box '1. Seleccionar Nucleotide' to this menu item. At the top right, there is a search bar with a 'Search' button. A red arrow points from the text box '3. Presionar o dar clic en "search"' to this button. In the center, there is a search bar with the text '2. Escribir en inglés "metallothioneim mussel" mytelus galloprovincialis' and a red arrow pointing to it.

**Figura 7:** Obtención de secuencia de nucleótidos

**Fuente:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide  [Advanced](#)

Display Settings:  GenBank [Ser](#)

## Mytilus galloprovincialis metallothionein 10-III (MT-10-III) mRNA, MT-10-III-a allele, complete cds

GenBank: AY566248.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

---

[Go to:](#)

LOCUS AY566248 112 bp mRNA linear INV 16-NOV-2005

DEFINITION *Mytilus galloprovincialis* metallothionein 10-III (MT-10-III) mRNA, MT-10-III-a allele, complete cds.

ACCESSION [AY566248](#) REGION: 102..213

VERSION AY566248.1 GI:50295112

KEYWORDS .

SOURCE *Mytilus galloprovincialis* (Mediterranean mussel)

ORGANISM [Mytilus galloprovincialis](#)  
Eukaryota; Metazoa; Lophotrochozoa; Mollusca; Bivalvia;  
Pteriomorpha; Mytiloidea; Mytiloidea; Mytilidae; Mytilinae;  
Mytilus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 112)

AUTHORS Dondero,F., Piacentini,L., Banni,M., Rebelo,M., Burlando,B. and Viarengo,A.

TITLE Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation

JOURNAL Gene 345 (2), 259-270 (2005)

PUBMED [15716106](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 112)

AUTHORS Vergani,L., Grattarola,M., Borghi,C., Dondero,F. and Viarengo,A.

TITLE Fish and molluscan metallothioneins

JOURNAL FEBS J. 272 (23), 6014-6023 (2005)

PUBMED [16302966](#)

REFERENCE 3 (bases 1 to 112)

AUTHORS Dondero,F., Piacentini,L., Banni,M., Rebelo,M., Burlando,B. and Viarengo,A.

TITLE Direct Submission

**Figura 8:** Resultados de la búsqueda de secuencias

Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide Advanced

Display Settings: FASTA Sen

**Mytilus galloprovincialis metallothionein 10-III (MT-10-III) mRNA, MT-10-III-a allele, complete cds**

GenBank: AY566248.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>gb|AY566248.1|:102-213 Mytilus galloprovincialis metallothionein 10-III (MT-10-III)
mRNA, MT-10-III-a allele, complete cds
GGTGTAGCGGTGAAGGTTGTCGCTGTGGTGACGCTGCAAGTGCTCGGGCGCCGACTGTAAATGTTCCGG
TTGTAAAGTAGTTGCAAGTGTTCAGGTAGCTGTGCGTGTGA
```

**Figura 9:** Formato Fasta de la secuencia AY566248.1

**Fuente:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Para la elaboración virtual de los *primers*, paso primordial a efectuar previo a la síntesis de los mismos, es necesario el uso de un software que permita establecer los mínimos requerimientos descritos anteriormente en el ítem **1. 2. 2** Criterios para el diseño de *primers*, para la estructuración de los mismos. Para este efecto, el uso de Primers-BLAST, como software gratuito disponible en la página web del NCBI, permite diseñar nuevos pares de bases de cebadores, introduciendo la plantilla de ADN solo o a través de la inserción de la plantilla de ADN y otro primer preexistente. *Primer-BLAST* puede comprobar la especificidad de los *primers* con o sin plantilla. La plantilla de PCR puede ser una secuencia de ADN en bruto en formato FASTA (que es un formato basado en texto, empleado para representar secuencias de pares de bases y aminoácidos, representados en letras) o una adhesión de NCBI como RefSeq, adhesión altamente empleada debido a que lleva más información para establecer la secuencia y permitir una comprobación rápida de cualquier secuencia en bruto (21,

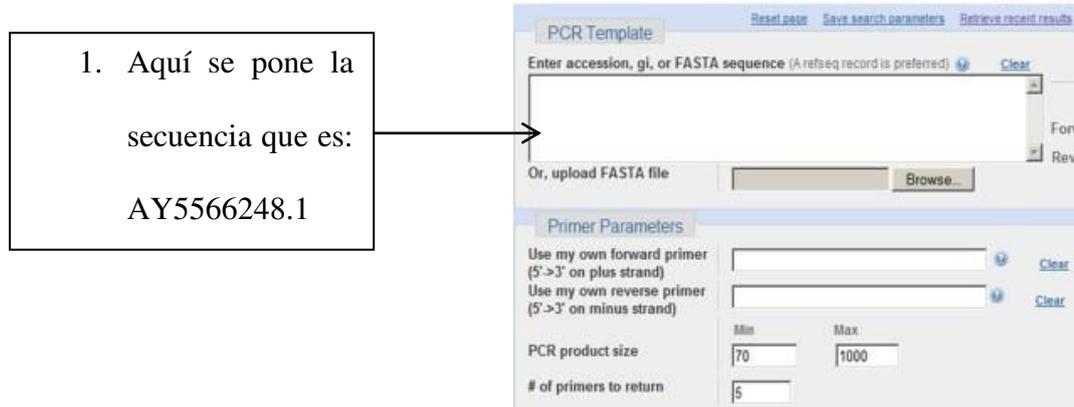
22). A continuación podemos observar la hoja que aparece cuando vamos a utilizar el software.

The image shows the NCBI Primer3 web interface. At the top, there are links for "Reset/Load", "Save search parameters", and "Retrieve recent results". The main section is titled "PCR Template" and includes a text input field for "Enter accession, gi, or FASTA sequence (A Refseq record is preferred)", a "Clear" button, and a "Range" section with "From" and "To" input fields. Below this is a "Browse..." button for uploading a FASTA file. The "Primer Parameters" section contains fields for "Use my own forward primer (5->3' on plus strand)", "Use my own reverse primer (5->3' on minus strand)", "PCR product size" (Min: 70, Max: 1000), "# of primers to return" (5), and "Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>)" (Min: 57.0, Opt: 60.0, Max: 63.0, Max T<sub>m</sub> difference: 3). The "Exon/intron selection" section includes "Exon junction span" (No preference), "Exon junction match" (Exon at 5' side: 7, Exon at 3' side: 4), "Intron inclusion" (checkbox), and "Intron length range" (Min: 1000, Max: 1000000). The "Primer Pair Specificity Checking Parameters" section has "Specificity check" (checked), "Database" (Refseq mRNA), "Organism" (Homo sapiens), "Exclusion" (optional), "Entrez query" (optional), "Primer specificity stringency" (Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end), "Misprimed product size deviation" (4000), and "Splice variant handling" (checkbox). At the bottom, there is a "Get Primers" button, "Show results in a new window" checkbox, "Use new graphic view" checkbox, and a link to "Advanced parameters".

**Figura 10:** Observación de la página para elaborar el diseño de primer.

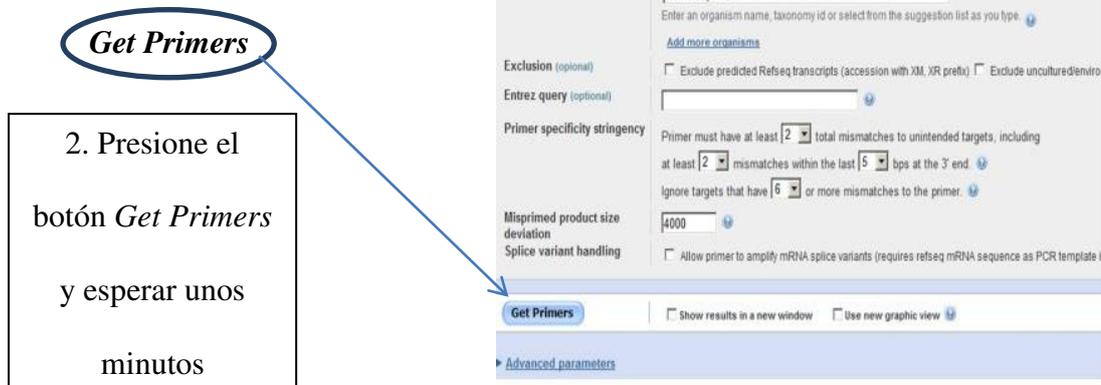
**Fuente:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Empleamos la secuencia AY566248.1 de la especie *Mytellus galloprovincialis*, se copia la secuencia en la parte superior del lado izquierdo, como está señalado en la figura y se le da “clic derecho”



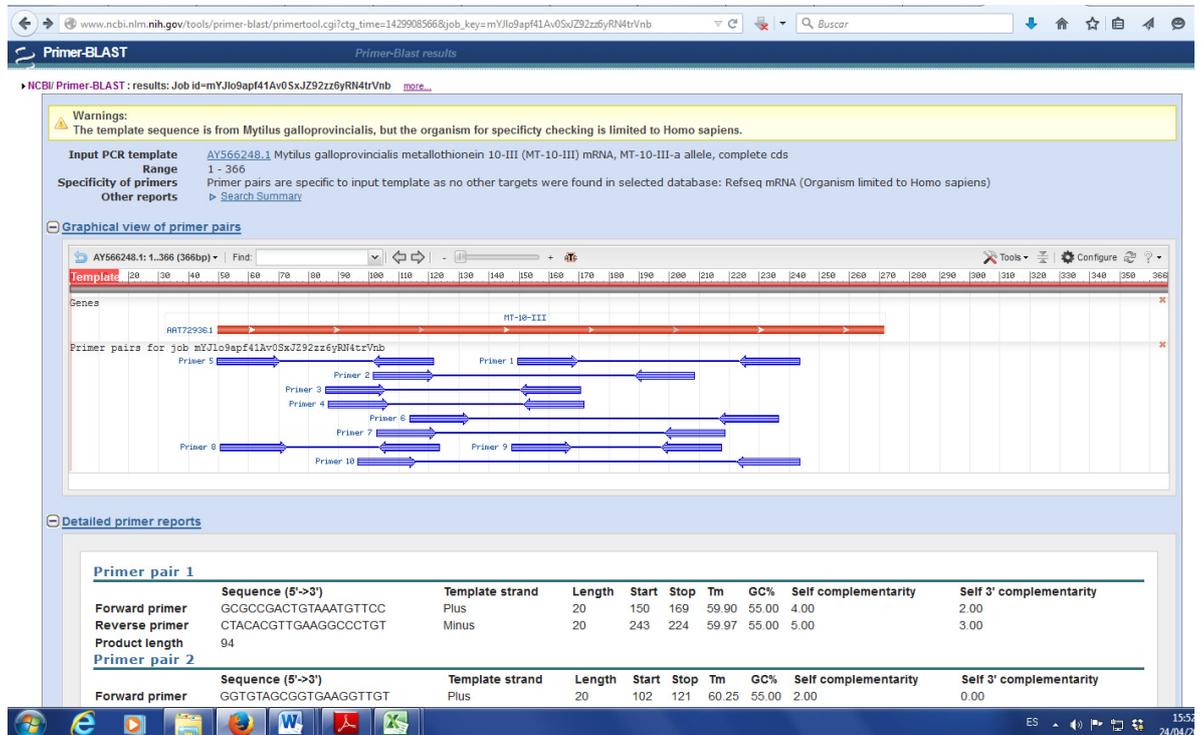
**Figura 11:** Insertando secuencia de referencia.  
**Fuente:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Luego al final de la página de *Primers-BLAST*, existe un recuadro que dice



**Figura 12:** Pasos para la obtención de Primers  
**Fuente:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Con esta secuencia de referencia: AY566248.1 *Mytilus galloprovincialis* metallothionein, Obtuvimos el diseño de los *primers* que se pueden observar a continuación:



**Figura 13:** Obtención de los primers  
**Fuente:** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

De una lista de aproximadamente 10 juegos de *primers* se trata de escoger los mejores, basándose en las los criterios de diseño, en este trabajo se seleccionaron los siguientes:

**Primer pair 2 Sequence (5'->3')**

**Forward primer:** TGCCTGCACCTTGTAAGTGT

**Reverse primer:** TGTACACCCTGCTTCACACG

**Product length:** 176

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



Estos datos son importantes, para el diseño de los *primers*, el tamaño y el inicio del *primers*, el porcentaje de GC%, las temperaturas de Tm y la complementariedad son datos que deben estar en los rangos correctos para que estos *primers* sean viables.

Los parámetros de búsqueda y otros detalles nos dan un resumen de los resultados obtenidos en la elaboración de los *primers*, como el número de secuencias analizadas, las temperaturas óptimas de “melting” o llamadas (Tm) que deben ser similares y el mínimo el máximo tamaño producto de la PCR. Esperamos que este diseño de iniciadores obtenidos por homología de secuencias una vez, sirvan para poder realizar estudios de expresión del gen de la Metalotioneinas en la especie *Mytella guyanensis*.

**Primer-BLAST** *Primer-Blast results*

BV/ Primer-BLAST : results: Job id=ztUy4MLqs85U\_FDyMdxjCrXUJ057k2Y [more...](#)

**Warnings:**  
 The template sequence is from *Mytilus galloprovincialis*, but the organism for specificity checking is limited to *Homo sapiens*.

**Input PCR template** [AY566248.1](#) *Mytilus galloprovincialis* metallothionein 10-III (MT-10-III) mRNA, MT-10-III-a allele, complete cds  
 Range 1 - 366

**Specificity of primers** Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism li  
 Other reports [Search Summary](#)

Search parameters and other details	
Number of Blast hits analyzed	139583
Entrez query	
Min total mismatches	2
Min 3' end mismatches	2
Defined 3' end region length	5
Mismatch threshold to ignore targets	6
Misprimed product size deviation	4000
Max number of Blast target sequences	50000
Blast E value	30000
Blast word size	7
Max candidate primer pairs	50
Min PCR product size	70
Max PCR product size	1000
Min Primer size	15
Opt Primer size	20
Max Primer size	25
Min Tm	57
Opt Tm	60
Max Tm	63
Max Tm difference	3
Repeat filter	AUTO
Low complexity filter	Yes

[Graphical view of primer pairs](#)

**Figura 14:** Resultados sobre los parámetros de búsqueda y otros detalles  
**Fuente:** [www.ncbi.nlm.com](http://www.ncbi.nlm.com),

## CONCLUSIONES

Este proyecto Integrador es el primer aporte en el sentido de diseñar *primers* para el gen de la MTs en la especie *Mytella guyanensis*; especie que podría ser utilizada con un bioindicador, debido a su rol fundamental en ecosistemas estuarinos, ya que constituyen los primeros eslabones de la red trófica. Dicha especie, correspondiente a organismos filtradores de la familia Mytelidae, ampliamente estudiada en otros países por ser excelentes indicadores del estado de salud del ecosistema debido a su captación de nutrientes disponibles en el cuerpo de agua. Sobre todo se han realizado varias investigaciones en donde se estudia el efecto ante la presencia de metales pesados contaminantes en el medio (9,11).

## RECOMENDACIONES

- Es recomendable que cada *primers* individual tengan una longitud de 20 a 25 bp.
- El contenido de G/C (Guanina: Citosina) debe estar alrededor del 50-60%.
- Se deben evitar secuencias de 3 o más Cs o Gs en las regiones terminales 3'.
- Las terminaciones 3' no deben ser complementarias, ya que esto puede llevar a la formación de dímeros.
- Los *primers* Forward y Reverse deben de tener temperatura de fusión “Tm” cercanos.
- También se recomienda, emplear los *primers* diseñados para determinar la expresión de este gen de interés en los bivalvos, que puede ser usado, como un biomarcador, para estudios futuros de contaminación ambiental.

## **ANEXOS**

## Anexo A

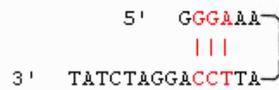
Familia MT	aa <sup>3</sup>	MM (kDa)	%Cys	CCC <sup>4</sup>	arom <sup>6</sup>	His <sup>7</sup>	Estructura 3D (Nter → Cter)	Ejemplos
Vertebrados	60-68	6-7	32-34	SI <sup>3</sup>	0	0-1	Dominio β + Dominio α	RnorMT2, HsapMT2,1
Moluscos	64-87	7-9	28-30	SI <sup>3</sup>	0	0-4	Similares a vertebrados. Algunas isoformas pueden tener más de 2 dominios	MedMT10a, CvirMT4
Crustáceos	58-64	8-8,2	31-33	SI <sup>3</sup>	0	0	Dominio β + Dominio β	HamelMTH, Csap
Equinodermos	64-67	6-7	29-31	NO	SI	0	Dominio α + Dominio β	SpurMTA Sgra
Dipteros	40-43	3,9	25	NO	0	0	Un dominio <sup>2</sup>	DmelMT1, DmelMT2
Nemátodos	62-74	6,6-8	25-28	NO	SI	1-4	Un dominio	CmelMT1, Cele
Ciliados	99-181	10-19,6	22-30	SI	SI	0-2	Dominio β + Dominio α	TpigMT-1, TpyrMT-1,
Hongos 1	25-27	2,5	27	NO	0	0	Un dominio	NcraMT, Abis
Hongos 2	63	6,4	28,6	NO	0	3	Un dominio	<sup>1</sup> CglaMT2;
Hongos 3	51	5,3	30,8	NO	SI	1	Un dominio	<sup>1</sup> CglaMT1
Hongos 4	54-55	5,8	16-17	SI <sup>3</sup>	SI	1-2	Un dominio	YlipMT1/MT2/MT
Hongos 5	61	6,7	19,7	NO	SI	1	Un dominio	<sup>1</sup> ScerCUP1
Hongos 6	69	7,3	27,5	NO	0	2	Un dominio	<sup>1</sup> ScerCRS5
Bacterias	53-58	6-8	17-19	NO	SI	SI	Un solo dominio que contiene una α-hélice.	SynSmtA, Tvu1
Plantas Tipo1	45-75	4,6-7	16-29	NO	SI	0-1	Dos dominios separados por un	AthaMT1a, Psat
Plantas Tipo2	77-81	7,6-8	17-18	NO	SI	0-1	segmento de 40 aminoácidos	AthaMT2a, Osa
Plantas Tipo3	60-69	6,4-8	15-17	NO	SI	0-1		AthaMT3, Ozat
Plantas Tipo4	76-81	7,8-8	19-21	NO	SI	0-1		AthaMT4, Zmay

1. Clasificación de las MTs en distintas familias de acuerdo a su estructura primaria (Binz y Kägi 1999). La clasificación interna de las MTs de plantas ha sido sustituida por Ibbett y Goldsbrough (2002). Se muestran algunos ejemplos de MTs pertenecientes a cada una de las familias. La familia actualmente está formada por una sola MT. <sup>2</sup>IP1 de *S. cerevisiae* se ha supuesto que la estructura 3D esté formada por un solo dominio. <sup>3</sup>aa: número de aminoácidos que presenta la proteína. <sup>4</sup>CCC: motivos Cys-Cytridado una isoforma que contiene un motivo CCC en su secuencia. <sup>5</sup>arom: se indica si alguna isoforma de la familia contiene aa aromáticos. <sup>7</sup>His: se indica el número de r que pueden presentar las isoformas de la familia. Estructura 3D: estructura tridimensional o terciaria. MT: metalotioneína. MM: masa molecular. Abis: *Agaricus bisporus*. Atha: *A. thaliana*. Cele: *C. elegans*. Cgla: *C. glabrata*. Csap: *Callinectes sapidus*. Cvir: *Crossostrea virginica*. Dmel1: *Drosophila melanogaster*. Hame: *Homarus americanus*. Hpom: *Helix pomatia*. Hsap: *Humanus pictus*. Medu: *Mytilus edulis*. Mmus: *Mus musculus*. Ncra: *Neurospora crassa*. Ozat: *Oryza sativa*. Psat: *Pisum sativum*. Rnor: *Rattus norvegicus*. Scer: *S. cerevisiae*. Spur: *Spurium*. Syn: *Synechococcus* sp. Tpig: *T. pigmentosus*. Tpyr: *T. pyriformis*. The: *T. thermophilus*. Tvu1: *Thermosynechococcus vulcanus*. Zmay: *Zea mays*.

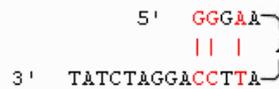
## ANEXO B-

### Hairpin

Oligo, 3 bp (Loop=4), delta G = -0.1 kc/m



Oligo, 2 bp (Loop=3), delta G = 2.1 kc/m



### Self-Dimer

4 bp, delta G = -6.6 kc/m (bad!) (worst= -36.6)



4 bp, delta G = -5.4 kc/m (bad!) (worst= -36.6)



**Link de donde saque las figuras:**

[https://bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/seq\\_anal/primer\\_design/primer\\_design.](https://bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/seq_anal/primer_design/primer_design.)

htm

## BIBLIOGRAFÍA

1. **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.
2. **Quiroga, R.,** Indicadores ambientales y de desarrollo sostenible: avances y perspectivas para América Latina y el Caribe. 2007. CEPAL Serie 55.
3. **Sureda, A., y otros.** Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill. Eivissa Island : s.n., 2011, Aquat. Toxicol, Vol. 101, págs. 540-560.
4. **Hernández-Hernández, F.M.; Ansuategui, J.; Conesa, M.** Concentraciones de Metales pesados en algunos organismos marinos del mar Mediterráneo. Castellon : s.n., 1990.

5. **Molto, E.** Clonaje, expresión y caracterización estructural de una nueva metalotioneína de crustáceo a partir de la langosta *Panulirus argus*. Estudios de su función en la mitocondria. Cuenca : s.n., 2005
6. **Reyes, R.** 6, Caracas : s.n., Diciembre de 1999, Las metalotioneínas como biomarcadores moleculares de la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos. Interciencia , Vol. 24, págs. 335-336.
7. **Torres Amaro, F.** La familia de las metalotioneínas en *Tetrahymena* su aplicación en el desarrollo de biosensores celulares para la detección de metales pesados., 2009
8. **Hamer, D. H.** 55, 1985, *Metallothionein*. Ann Rev Biochen, págs. 913-951.
9. **Ureña Robles, Rocío.** *Metalotioneínas en peces y gasterópodos: su aplicación a la evaluación de la contaminación*. Burjassot : s.n., 2006.
- 10 **Serena Aceto, Giulia Formisano, Francesca Carella, Gionata De Vico, Luciano Gaudio** . The Metallothionein genes of *Mytilus galloprovincialis*: Genomic organization, tissue, expression and evolution. Department of Biological Sciences, University of Naples Federico II, 80134 Napoli, Italy
11. **Roesijadi, G.** 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals., Aquatic Toxicology, págs. 81-114.
12. **Lemus, M., N., Rojas y Rojas-Astudillo, L. & Chung, K.** Metalotioneínas en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae): variación estacional y su relación con la biología reproductiva. Cumaná : s.n., 2012.
- 10 **Kägi, J.H.R. y Kojima, Y.** Basel : s.n., 1987, **Birkhäuser Verlag**. Chemistry and Biochemistry of metallothionein. Metallothionein II.

- 13 **Trinchela, F. Esposito, M. Scudiero, R.** Junio 2012, Metallothionein primary structure in amphibians: Insights from comparative evolutionary analysis in vertebrates. C.R. Biologies, Vol.335, pag 480-487
14. **Hamer, D. H.** 55, 1985, *Metallothionein*. Ann Rev Biochen, págs. 913-951.
15. **Moleirinho, A. Carneiro, J. Matthiesen. Ru, Silva, R. Amorim, A. Azebedo, L.** Abril, 2011. Gains, Losses and Changes of Function after Gene Duplication: Study of the Metallothionein Family. Instituto de Patología Molecular e Immunología de Universidad de Porto, Portugal. De la Universidad de Ciencia Porto, Portugal.
16. **Soria, Marcelo.** Curso Introducción a la Bioinformática. Aplicaciones en Agricultura. [En línea] [Citado el: 17 de Abril de 2015.]
17. **Cortázar Martínez Silva, Rincón Elsa Patricia.** MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS EN BIOTECNOLOGÍA PCR. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México: s.n., JUNIO, 2004
18. Integrated DNA Technologies. Calculation of Tm for Oligonucleotides [En línea] [Citado el: 17 de Abril de 2015.] (<http://www.idtdna.com/html/tech/tmcalc.html>)
19. **Camacho Garcia, Yolanda.** Biodiversidad de Costa Rica. [En línea] Instituto Nacional de Biodiversidad , 4 de Abril de 2011. [Citado el: 16 de Enero de 2015.] <http://atta2.inbio.ac.cr/neoportal-web/species/mytella%20guyanensis>.
20. **Instituto Oceanográfico de la Armada.** Instituto Oceanográfico de la Armada. *INOCAR*. [En línea] [Citado el: 16 de 01 de 2015.] [http://www.inocar.mil.ec/biologia/catalogo\\_moluscos/main\\_map.htm](http://www.inocar.mil.ec/biologia/catalogo_moluscos/main_map.htm).

21. Human Genome Mapping Project. Primer Desing

(<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/MANUAL/faq/faq-primers.html>)

[En línea] [Citado el: 17 de Abril de 2015.]

(<http://www.idtdna.com/html/tech/tmcalc.html>)

22. **National Center for Biotechnology Information.** National Center for Biotechnology Information. [En línea] 2000. [Citado el: 1 de Abril de 2015.]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>