



DEDUCCION IN-Sílico DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA HEPÁTICA
METALOTIONEINA EN MUESTRAS DE *Eleutherodactylus johnstonei* EN EL
VALLE DEL CAUCA
CALI- COLOMBIA

TRABAJO DE GRADO

ANGIE MARCELA GUAÑARITA BAÑOL

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2013

**DEDUCCION IN-Sílico DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA HEPÁTICA
METALOTIONEINA EN MUESTRAS DE *Eleutherodactylus johnstonei* EN EL
VALLE DEL CAUCA
CALI- COLOMBIA**

ANGIE MARCELA GUAÑARITA BAÑOL

TRABAJO DE GRADO

**RAFAEL SANTIAGO CASTAÑO, Ph. D
ASESORES: HARRY PACHAJOA &
ANDRES CASTILLO**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2013**

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. PROBLEMA A TRATAR	14
2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	14
2.2 FORMULACIÓN Y ANÁLISIS DEL PROBLEMA	14
2.3 JUSTIFICACIÓN	15
2.4 DELIMITACIÓN.....	15
3. MARCO DE REFERENCIA	16
3.1 ANTECEDENTES.....	16
3.2. MARCO TEÓRICO.....	17
3.2.1 METALES PESADOS.....	17
3.2.2. BIOACUMULACIÓN.....	18
3.2.3. METALOTIONEINAS.....	18
3.2.4. QUELACIÓN DE METALES	19
3.2.5. <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	20
3.2.6. ÁCIDO RIBONUCLEÍCO (ARN).....	21
3.2.7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR). 22	
4. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5. METODOLOGÍA	24
5.1 NORMATIVIDAD BIOÉTICA Y DISPOSICIONES VIGENTES PARA EXPERIMENTACIÓN.	24
5.2 ÁREA DE ESTUDIO.....	24
5.3 CAPTURA Y EUTANASIA DE LAS RANAS	24
5.4 AISLAMIENTO DE LA SECUENCIA DE ADNc DE LA PROTEÍNA METALOTIONEINA HEPÁTICA DE <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	25
5.4.1 EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE TÉJIDO HEPÁTICO FRESCO.....	25
5.4.2 DISEÑO DE CEBADORES	26
5.4.3 TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE mRNA A cDNA	26
5.4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	27

5.4.5 AISLAMIENTO DE AMPLICONES.....	27
5.5 RESULTADOS ESPERADOS.....	27
6. RESULTADOS	28
6.1 CAPTURA Y EUTANASIA DE <i>E. johnstonei</i>	28
6.2 EXTRACCIÓN DE ARN APARTIR DE TEJIDO HEPÁTICO DE <i>E. johnstonei</i>	29
6.3 AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA ADN _c DE LA METALOTIONEINA DE <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	30
6.3.1 DISEÑO DE CEBADORES.....	30
6.3.2 AMPLIFICACIÓN DEL ADN _c TOTAL O PARCIAL DE METALOTIONEINA A PARTIR DE TEJIDO HEPÁTICO DE <i>E. johnstonei</i>	32
7. DISCUSIÓN	37
8. CONCLUSIONES.....	41
9. RECOMENDACIONES	42
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Zonas de muestreo y coordenadas de ubicación.....	28
Tabla 2. Peso de hígados extraídos de <i>E. johnstonei</i> por zona de muestreo.....	28
Tabla 3. Cuantificación de la concentración de ARN mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).....	29
Tabla 4. Especies con reporte en el genbank de presencia de la Metalotioneina y con mayor grado de similitud entre secuencias según alineamiento hechos por ClustalW (MEGA5.2).....	31
Tabla 5. Lista de Cebadores obtenidos mediante el uso del programa PRIMACLADÉ.....	32
Tabla 6. Programa de ciclado empleado en las reacciones de PCR.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía del anuro <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	20
Figura2. Electroforesis del ARN total extraído de <i>E. johnstonei</i>	30
Figura 3. Pantallazo del alineamiento mediante ClustalW (Mega5.2) de secuencias de metalotioneinas.	31
Figura 4. Diagrama del diseño del experimento realizado para las reacciones de RT-PCR y PCR.....	33
Figura 5. Ejemplos de electroforesis de PCR obtenidas al realizar combinaciones con los cebadores diseñados.....	34
Figura 6. Pantallazo de la búsqueda y alineamiento de BLASTN para la secuencia obtenida mediante RT-PCR Y PCR.	35
Figura 7. Pantallazo del resultado de la secuenciación realizada por la empresa MACROGENusa.....	36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de marco lógico	48
Anexo 2. Impacto ambiental.....	51
Anexo 3. Cronograma de actividades.....	52
Anexo 4. Presupuesto del Proyecto.....	53
Anexo 5. Aprobación del DAGMA.....	54
Anexo 6. Aprobación Comité de Ética CIECUAE- Universidad Icesi.....	56
Anexo 7. Pantallazo de POE: Sacrificio y disección de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	57
Anexo 8. Pantallazo de POE: Captura y mantenimiento en el laboratorio de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	58

RESUMEN

Según los reportes históricos mundiales, la presencia de metales pesados ha aumentado dramáticamente desde el advenimiento de la revolución industrial. Algunos de estos metales como Cadmio, Mercurio y Plomo son los metales que más se han relacionado con la muerte y degradación de ecosistemas por toxicidad sobre flora y fauna; y por otro lado se relacionan con las intoxicaciones humanas (tanto agudas como crónicas) que generan daños degenerativos, durante el desarrollo embrionario, juvenil y neurológico a diferentes niveles. Muchos de los focos que concentran estos metales, son los centros industriales, los centros de acopio de basura (sin manejo y reciclado adecuado) y actualmente la minería de oro. Y se hace necesario plantear sistemas de monitoreo de metales pesados, control y manejo de basuras.

El conocimiento de la proteína hepática Metalotioneína y el entendimiento de su función principal como agente quelante de metales pesados, es de gran utilidad al permitir analizar los niveles de contaminación y consecuencias que pueden resultar tras la bioacumulación en los organismos vivos. En el ambiente la presencia y los niveles de metales pesados resultan desconocidos, algunos organismos pueden contribuirnos al descubrimiento de nuevos conceptos y los patrones de contaminación a los que nos enfrentamos. Este trabajo tiene como objetivo aislar el DNA complementario de la proteína hepática Metalotioneína que se expresa en ambientes altamente perturbados y contaminados por metales pesados. Para lograr este objetivo se propone el uso de la rana invasora *Eleutherodactylus johnstonei* para analizar los aspectos moleculares en la rana que evidencie la presencia de esta proteína y así establecerla para el 2013 como un organismo bioindicador de la presencia de metales pesados en zonas de la ciudad de Cali. La metodología se encaminó a aislar ARN total, hacer transcripción reversa y amplificación de secuencias por PCR.

El aislamiento de ARN total de hígado de la rana *Eleutherodactylus johnstonei* se refinó al punto de obtener ARN de buena calidad y cualidades verificadas mediante electroforesis de geles desnaturalizantes para ARN las dos bandas características de los ARN ribosomales. Mediante entrenamiento bioinformático de alineamiento de ocho secuencias de metalotioneínas de vertebrados, el uso de una herramienta para el diseño de cebadores y el tamizaje (por búsqueda BLASTN) de los cebadores resultantes del diseño, se obtuvieron tres pares de cebadores degenerados diseñados para metalotioneínas de vertebrados no mamíferos. Las reacciones de transcripción reversa y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) hechas en este trabajo sumaron un total de 54 reacciones en las que se emplearon combinaciones con los cebadores degenerados diseñados para metalotioneína. Al verificar las reacciones de PCR mediante geles de agarosa no se evidenció (amplicones) bandas bien definidas, a excepción de la reacción en la que el ADNc se hizo empleando el cebador Poly dT, y posteriormente fue amplificado por PCR empleando los cebadores DG2F y DG1R. Sin embargo al someter la secuencia obtenida a una búsqueda BLASTN, esta no

tuvo similitud con Metalotioneinas, además de que la secuencia legible solo contó con 25 bases y la otra porción no fue dilucidable.

Para este estudio los resultados sugieren que se debe modificar las reacciones RT-PCR y las variables de temperatura de anidamiento de los cebadores o rediseñar cebadores para reforzar la estrategia de obtención de la secuencia.

Palabras claves: metalotioneina, quelación de metales, metales pesados, bioacumulación, *Eleutherodactylus johnstonei*

ABSTRACT

According to global historical reports, the presence of heavy metals has increased dramatically since the beginning of the industrial revolution. Some of these metals such as cadmium, mercury and lead, have been linked to death and degradation of ecosystems by eco- toxicity of flora and fauna, and on the other hand are related to human poisonings (acute and chronic), degenerative damage generated during embryonic development, youth and neurological at different levels. Many of the focus that concentrate these metals are industrial centers, the garbage collection centers (without proper management and recycling) and gold mining currently. It becomes necessary to propose monitoring systems of heavy metals, control and waste management.

The knowledge of hepatic protein Metallothionein and understanding its primary function as heavy metal chelating agent, is useful to allow the analysis of contamination levels and consequences that can result after bioaccumulation in living organisms. In the environment the presence and levels of heavy metals are unknown; some organisms can contribute to the discovery of new concepts and patterns of contamination that we face. This study aims to isolate the complementary DNA Metallothionein liver protein that is expressed in environments highly disturbed and contaminated by heavy metals. To achieve this objective we propose the use of invasive frog *Eleutherodactylus johnstonei* to analyze their molecular aspects, evidencing the presence of this protein and thus establish in 2013 as a bioindicator organism for the presence of heavy metals in areas of the city Cali. The methodology is routed for total RNA isolation, reverse transcription and sequence amplification by PCR.

The isolation of total RNA from liver *Eleutherodactylus johnstonei* was refined until the point of obtain good quality RNA and qualities verified by electrophoresis of denaturing gels to RNA and display the two bands characteristic of ribosomal RNA. Using bioinformatic training of eight sequences alignment of metallothionein vertebrate , the use of a tool for designing primers and the screening (by Blastn search) resulting design primers, were obtained three pairs of degenerate primers designed to vertebrate metallothioneins non-mammals. The reactions of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT -PCR) made in this study totaled 54 reactions that were employed in combination with the degenerate primers designed to metallothionein. When were verified the PCR reactions on agarose gels, did not show well defined bands (amplicons), except for the reaction in which the cDNA was carried out using poly dT primer , whose product was subsequently amplified by PCR using DG2F and DG1R primers . However the sequence obtained by subjecting a Blastn search, this had not similarity to metallothionein. Also, the sequence readable only had 25 bases and the other portion was not possible to read.

For this study, the results suggest that the RT- PCR reactions must be modified and temperature variables primers nesting or redesigning primers to reinforce the strategy of obtaining the sequence

Keywords: heavy metals, bioaccumulation, metallothionein, metal chelation, *Eleutherodactylus johnstonei*.

1. INTRODUCCIÓN

Las Metalotioneinas (MTs) son una familia extremadamente heterogénea, de bajo peso molecular, son unas proteínas ricas en cisteína (alrededor del 30% de sus aminoácidos). Fueron descubiertas por primera vez en 1957 por Margoshes y Vallee en un riñón de caballo; luego Kägi y Vallee en 1960 lograron purificar la proteína y encontraron que contiene un alto contenido de cadmio (Cd), zinc (Zn) y azufre(S), desde entonces se han hecho varios estudios que se dedican a entender su estructura, bioquímica y características funcionales, patrones tisulares y estrategias de regulación génica.

Su papel principal es quelar metales pesados en órganos como riñón e hígado, pero además se les ha atribuido otras funciones como la protección de metales tóxicos y metal fisiológico (zinc o cobre), protección contra radicales libres, contra el estrés oxidativo y las defensas antiapoptóticas, además de estar implicadas en una variedad de procesos que son específicos para el metabolismo de cada grupo de organismo. Sin embargo, actualmente hay una falta de directrices claras con respecto a la evidencia biológica de MTs, su función y diferenciación funcional a través de evolución; ya que se han encontrado presentes en levaduras, plantas, anfibios y mamíferos pero al ser aislados de estos diferentes organismos se ha encontrado distintas variedades, lo que hace más difícil identificar sus funciones principales; son familia de proteínas polimórficas con subfamilias, subgrupos e isoformas.

Los diferentes miembros de la heterogénea superfamilia de proteínas MTs, probablemente evolucionaron a través de una red de duplicación funcional, diferenciación y / o eventos que conduce a la convergencia, y esta condición hace particularmente más difícil interpretar su evolución molecular. Un evento de paralogía explicaría la aparición de estas proteínas en diferentes grupos de organismos, ya que indicaría que este evento fue el resultado de la duplicación de genes, diferentes eventos hicieron varias copias de genes en un genoma, y se sintetizaron en los organismos con diferentes isoformas de MT (Capdevila, 2011).

Para el caso de los anfibios en los que se ha encontrado Metalotioneinas, al igual que las antes descubiertas, son proteínas ricas en cisteína y se ha logrado determinar que el ADNc es 875 pb de largo y codifican proteínas de 60 aminoácidos. Sin embargo, en anfibios es típico encontrar metalotioneinas de la familia 1 (MT1). La estructura global de la proteína es única entre los vertebrados ya que tiene sólo dos residuos de aminoácidos antes de la primera cisteína en el extremo amino-terminal y al igual que en humanos, se expresa durante toda la embriogénesis.

El máximo grado de complejidad aparece en los mamíferos, donde los eventos de duplicación produjeron un racimo de cuatro miembros (MT1-MT4), con 13 veces mayor amplificación de la isoforma MT1 en los seres humanos. La diferenciación fisiológica y el perfil de expresión génica han sido analizados para los cuatro

isoproteínas correspondientes: el ubicuo MT1 y MT2, han sido relacionadas con regulación de la homeostasis, transporte, y la desintoxicación de iones metálicos; MT3 solo es sintetizado en los tejidos neuronales, y esta relacionado con el crecimiento neuronal, y para el caso de MT4 se ha relacionado en la diferenciación y estratificación de epitelios. Sin embargo, en ningún caso la duplicación y la diversificación parecen haber dado lugar a un diferenciación y especialización de unión de MTs en mamíferos, si se ha observado que exhiben un patrón de preferencias de metales de unión, por ejemplo MT1 muestra el comportamiento de mayor unión al Zinc, mientras que MT4 es más propenso a la unión de cobre (Vašák. M, 2011). MTs de mamífero son 60-68 aminoácidos de largo, que incluye un patrón conservado de cisteína, en los vertebrados, todos los genes de las MTs están divididos en una región del extremo 5' (5'UT), una región 5'no traducible, (5'UTR), 3 exones separados por 2 intrones y un extremo final 3'. Los mamíferos poseen genes para 4 subfamilias: las MTs ubicuas MT1 y MT2, la específica de cerebro MT3 y la específica de epitelio MT4. Además todos los genes se localizan solo en el cromosoma 16 y se han aislado por lo menos 10 genes que codifican para estas proteínas en humanos de los cuales sólo cinco son expresados. El nivel de expresión varía dependiendo del tipo de tejido. Los genes humanos MT1a y MT2a han sido aislados por hibridación "in situ" de genes clonados de cromosomas de células somáticas. El gen MT1a codifica para una proteína de 61 aminoácidos, su transcripción es estimulada por compuestos de Cd y concentraciones muy elevadas de Zn.

Varios estudios en animales indican que durante el desarrollo perinatal, la Metalotioneina se almacena intracelularmente y que esto ocurre bajo unos altos niveles de Zinc y Cu hepáticos, esto ocurre probablemente ya que funcionan como cofactores de las reacciones que se deben llevar a cabo como es el buen funcionamiento de las ARN polimerasas y otras enzimas que deben cumplir sus funciones, ya que facilitan la transferencia reversible de estos iones a macromoléculas celulares (Ngu. T, 2009).

2. PROBLEMA A TRATAR

2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La presencia de metales pesados luego de la revolución industrial ha aumentado dramáticamente, y en la actualidad se destacan problemáticas ambientales graves tales como, la muerte, degradación de flora y fauna, además de daños directos en el hombre.

2.2 FORMULACIÓN Y ANÁLISIS DEL PROBLEMA

Como consecuencia del aumento en los niveles de los metales pesados en el ambiente y la acumulación de estos en el organismo, se han desencadenado consecuencias dañinas sobre los seres vivos, y a nivel local se han generado graves trastornos en la dinámica vital. En el Valle del Cauca entre diciembre del 2004 y mayo del 2005 ocurrió una epidemia, en un periodo de 165 días, en el Hospital Universitario del Valle Evaristo García, pues se atendieron 4 casos de sirenomelia y 4 de ciclopía entre 20,476 nacimientos. La prevalencia de estas malformaciones durante este periodo fue de 39 casos en 100,000 nacimientos, mientras que la prevalencia esperada era de 5 en 100,000. Anteriormente estas malformaciones ocurrían según esta prevalencia, pero hoy la ciclopía se presenta con mayor frecuencia; algunos estudios indicaron que probablemente esta epidemia se provocó porque había una fuente importante de metales pesados, como los basureros a cielo abierto (García. F, 2012).

Lo que resulta muy peligroso de estos metales pesados, es que no son química ni biológicamente degradables y son capaces de interactuar con moléculas orgánicas uniéndose a ellas y posteriormente se acumulan en órganos como hígado y riñón. La bioacumulación es un proceso muy grave debido a que aquellos organismos en eslabones superiores de la cadena trófica, son los que sufren mayores efectos contaminantes ya que se biomagnifica las concentraciones de metales pesados. Pese a esta problemática en la actualidad algunos estudios se centran en entender la dinámica de estos metales y su presencia en el medio ambiente.

Se sabe que en vertebrados (como en muchísimos otros organismos invertebrados y en plantas) las Metalotioneinas son las principales proteínas “queladoras” de metales pesados y estas se bioacumulan en hígado y en riñón. El papel fundamental de las metalotioneinas es el de quelar los metales para evitar que estos actúen sobre otras enzimas y proteínas que desempeñan procesos vitales. Algunas metodologías de monitoreo de metales pesados aprovechan el concepto de bioacumulación de los metales a través de la cadena trófica en la cual los depredadores son los mayores bioacumuladores de toxinas y en este caso de

metales pesados, y lo que hacen es capturar algunos individuos (depredadores) de un ecosistema y medir la concentración y tipos de metales pesados para calcular la presencia de estos metales en el medio, aprovechando que estas concentraciones serían más fácilmente detectables por los equipos analíticos convencionales. La rana *Eleutherodactylus johnstonei* es un anuro de origen antillano (introducida) que cohabita cerca de poblaciones humanas. Su éxito reproductivo es alto y por esto, esta especie ha desarrollado grandes poblaciones en ciudades entre los 0 y los 1200 msnm; como ocurre en Cali. Por ser un anuro y depredador de artrópodos, es un excelente bioacumulador de metales pesados. En este trabajo se propone que es posible emplear esta especie como bioindicador de presencia y concentración de metales pesados, pero para lograr establecer metodologías que conduzcan a esto, se hace necesario responder varios interrogantes entre los cuales está el detectar la presencia de Metalotioneínas en la especie.

2.3 JUSTIFICACIÓN

Por ello este proyecto plantea utilizar al anfibio invasor *Eleutherodactylus johnstonei* como bioindicador de la bioacumulación de metales pesados, analizando los polimorfismos genéticos que se logren encontrar en la secuencia de la proteína hepática Metalotioneína, la cual se ha conservado durante la evolución y cuya función principal es capturar metales pesados en el organismo. El uso de un anfibio resultaría exitoso ya que este grupo taxonómico es uno de los que presentan similitud con los hábitculos humanos y en la cadena trófica se encuentran en los eslabones superiores, indicándonos que de una manera muy similar al hombre, se encuentra impactada por la acumulación de metales pesados.

2.4 DELIMITACIÓN

El proyecto “Deducción in-silico de la secuencia de la proteína hepática Metalotioneína en muestras de *Eleutherodactylus johnstonei* en el valle del Cauca (Cali- Colombia)” busca identificar la presencia de la proteína quelante de metales pesados (Metalotioneína) en tejido hepático de la rana *Eleutherodactylus johnstonei*. Durante la realización de este proyecto se analizará el ADN complementario que se obtenga del proceso de aislamiento del mismo; y se comparará la secuencia obtenida, con las secuencias reportadas de algunos vertebrados identificando de esta manera, homologías y/o polimorfismos que se logren analizar.

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1 ANTECEDENTES

A pesar de que el estudio de las Metalotioneínas ha sido objeto de numerosas publicaciones desde 1957, aún no se ha podido establecer con precisión el papel biológico de estas proteínas. Entre las múltiples funciones que se les han atribuido, las más concretas y antiguas han sido las de intervenir en la captación, distribución, almacenamiento y liberación de metales esenciales (zinc y cobre), y en la desintoxicación de metales pesados (cadmio fundamentalmente) (Hamer, 1986). Sin embargo, en los últimos años se ha encontrado que podrían estar involucradas en procesos tan diversos como la apoptosis (muerte celular programada), la regulación del crecimiento neuronal, la protección contra los radicales libres y otros agentes oxidantes, y la regulación del metabolismo energético.

Casi todos estos estudios han sido llevados a cabo en mamíferos existiendo muy pocos trabajos que hayan contribuido a esclarecer las funciones de estas proteínas en vertebrados. En cuanto a los invertebrados, los trabajos más relevantes se han efectuado en gasterópodos terrestres (*Helix pomatia*, *Arianta arbustorum*) (Dallinger y col., 1997) y en el crustáceo *C. sapidus* (Brouwer y col., 1995, 2002). Estas especies son capaces de acumular distintos metales en diferentes tejidos en los cuales se expresan diferentes isoformas de la metalotioneína. De esta forma, pueden desintoxicar eficientemente elementos trazas no esenciales, tales como el cadmio, y al mismo tiempo mantener la homeostasis de elementos trazas esenciales como el cobre. En el caso de los anfibios aunque han sido de poco objeto de estudio para el análisis de la presencia de metalotioneína, existen investigaciones que sugieren a estos organismos como excelentes bioindicadores de la calidad ambiental y organismos muy sensibles a la bioacumulación de metales pesados y componentes tóxicos expuestos en el ambiente y que trazas de estos agentes tóxicos conducen a la malformaciones congénitas de las larvas (Bacon, 2006); además, al centrarse este estudio en un organismo invasor (*E. johnstonei*), su alta adaptabilidad y capacidad de colonizar amplios lugares podría brindar mayor probabilidad de presencia en el organismo. Estos escasos ejemplos conducen a la idea de que las Metalotioneínas representan un buen modelo para entender mejor la multiplicidad de funciones de estas proteínas y su evolución dentro del reino animal.

A nivel local la preocupación por la presencia excesiva de metales pesados en el ambiente ha aumentado, producto de la revolución industrial muchos procesos técnicos industrializados hoy optimizan tiempo y costos para la obtención de su producto de interés, pero en muchos casos el impacto ambiental generado es alto y es mayor el precio sanitario, que la reducción de costos para los procesos. En Cali existe una fuerte preocupación por la presencia de trazas de metales pesados presentes en las aguas (El país, 2011), miles de atribuciones se les han dado, como la presencia de la Minería que controla poco los lixiviados que van a dar a

los ríos, o los basureros a cielo abierto como lo fue el Basurero de Navarro hace unos dos años atrás (García. F, 2012) y como lo podría ser en la actualidad el “basurero” ubicado sobre la avenida Simón Bolívar con carrera 50.

3.2. MARCO TEÓRICO

3.2.1 METALES PESADOS

Los metales son componentes esenciales de los sistemas actuales de la vida, evidencia de ello es que no hay organismo libre de metal en nuestro planeta. Tal vez esta interacción metal-organismo, más allá de ser un rasgo adquirido al final de la evolución, fue un factor determinante en las primeras entidades vivientes, ya que los iones metálicos han sido considerada como una de las fuerzas impulsoras detrás de la aparición de la vida en la Tierra (Goyer.R, 2004). Sin embargo, algunos metales denominados metales pesados son sustancias tóxicas que causan daños en los organismos, ya que no son biodegradables, por ende permanecen durante en el entorno, circulan y se acumulan en el medio y en los seres vivos son capaces de causar graves daños. Existen diversos metales pesados entre ellos el cadmio, mercurio, plomo, arsénico, berilio, bario, cobre, manganeso, níquel, estaño, vanadio, zinc; entre otros. La contaminación por metales se debe principalmente a la actividad industrial y minera, que generan aguas residuales que contienen metales tóxicos como plomo, mercurio, cadmio, arsénico y cromo, y como consecuencia estas aguas al no ser tratadas llegan a ríos, mares y contaminan las aguas superficiales y subterráneas, y se acumulan en especies de plantas y animales en tejidos orgánicos.

El hierro es el metal más abundante en humanos. Si no considerásemos la cantidad de éste enlazada a la hemoglobina, sería entonces el zinc el metal de transición más abundante (Vasak y Hasler. E, 2000). Los iones zinc han sido identificados como componentes catalíticos de muchas enzimas y juegan un papel estructural en numerosas proteínas y factores de transcripción (*dedos de zinc*) (Berg y Shi, 1996). Sin embargo, si su concentración aumenta excesivamente, podría interferir con otros procesos dependientes de metales (calcio particularmente) (Csermely y col, 1989) y desencadenar apoptosis no deseada, provocando estados patológicos.

De la misma manera puede controlarse la liberación o enlace del cobre, que además de ser un elemento catalítico de muchas enzimas, es un componente estructural y funcional de la hemocianina, la proteína responsable del transporte de oxígeno en la mayoría de los artrópodos y los moluscos (van Holde y Miller, 1995). De ahí que en estas especies exista un metabolismo activo de este metal en el que juegan un papel muy importante las cobre-metalotioneínas. Entonces, entender y magnificar su función nos podrá indicar el grado de importancia que tiene esta proteína sobre la homeostasis de los diferentes organismos.

3.2.2. BIOACUMULACIÓN

Las concentraciones excesivas de iones metálicos esenciales, como cobre y zinc, e iones metálicos no esenciales, como cadmio y mercurio, pueden ser tóxicos tanto a niveles celulares, como de tejidos o de órganos. La mayoría de los organismos usan mecanismos celulares redundantes para limitar la toxicidad de los iones metálicos. Estos mecanismos de desintoxicación no son específicos para la especie metálica en cuestión, ya que son usados para eliminar una variedad de metales. Los iones metálicos esenciales pueden ser exportados de la célula mediante la acción de ATPasas, pero los iones metálicos no esenciales no pueden ser eliminados de esta forma y se acumulan en las células enlazadas a metalotioneínas o dentro de vesículas. La retención de metales es específica de tejido. Se ha comprobado que en vertebrados este proceso puede causar patologías (Dameron y Harrison, 1998), mientras que en la mayoría de los moluscos y crustáceos es un proceso fisiológico normal de bioacumulación en el hepatopáncreas sin desencadenar daños fisiológicos.

El papel de la metalotioneína en la disposición de cadmio, ha sido examinado en ratones transgénicos que sobre expresan esta proteína y en ratones *knock-out* que no la expresan. Usando el primer modelo, se observó que la metalotioneína no inhibe la absorción intestinal de Cd (Liu y Klaassen, 1996). Por otro lado, estos ratones transgénicos que presentan unos niveles de metalotioneína en el hígado 10 veces más altos que el de los controles son resistentes a la hepatotoxicidad inducida por Cd. En contraste, los ratones *knock-out* del gen de la metalotioneína, muestran una mayor susceptibilidad, con respecto a los controles, a la letalidad y daños hepáticos inducidos con Cd (Liu y col., 1995).

3.2.3. METALOTIONEINAS

Las metalotioneínas constituyen una superfamilia de proteínas de bajo peso molecular (menos de 9 kD), ricas en residuos de cisteína, que le confieren una alta capacidad para enlazar iones metálicos. El primer miembro de esta gran familia fue descubierto en 1957, cuando Margoshes y Vallee (1957) identificaron en corteza de riñón de caballo una proteína de unión a cadmio, responsable de la acumulación natural de cadmio en este tejido. Posteriormente fue demostrado que no sólo el cadmio es uno de los componentes metálicos que *in vivo* pueden unirse a esta proteína, sino que el zinc y el cobre también pueden ser enlazados (Pulido y col., 1966). Desde entonces han sido encontradas metalotioneínas en todo el reino animal, en las plantas superiores, en los hongos, en microorganismos eucariontes e incluso en algunos procariontes (cianobacterias). Su concentración varía en las diferentes especies y tejidos, y es reflejo de diferentes factores como la edad, el estado de desarrollo embrionario, la dieta, la exposición a metales pesados y agentes estresantes, etc. Aunque es una proteína citoplasmática (Tsujiyama y col., 1994), puede acumularse en los lisosomas (Sternlieb, 1987), y

migrar al núcleo (Cherian y Apostolova, 2000) o al espacio intermembrana de la mitocondria (Ye y col, 2001). También se ha encontrado metalotioneína extracelular en el plasma de mamíferos (Bremner y Mehra, 1991), en cultivos primarios de adipocitos (Trayhurn y col, 2000).

En general en todos los organismos donde ha sido encontrada la metalotioneína, esta proteína existe en dos formas: la forma enlazada al metal u holoproteína (MT) y la forma libre de metal o apoproteína (Apo-MT). Aunque la forma holo es la mayoritaria debido a que la forma apo es más susceptible a proteólisis (Miles, 2000), esta última se ha encontrado de forma transitoria en células no tumorales bajo condiciones de deficiencia de Zn y de forma persistente en células tumorales independientemente de los niveles de Zn (Pattanaik, 1994; Theocharis, 2003). Por otro lado, se ha visto que el tiempo de vida media de las metalotioneínas, no sólo se ve afectado por la especie metálica enlazada, sino también por la edad y el estado de desarrollo del organismo. Por ejemplo, se han encontrado diferencias entre el tiempo de vida media de metalotioneínas constitutivas de ratas adultas (aproximadamente 4 horas) con respecto a neonatos (aproximadamente 49 horas) (Kershaw, 1992). Además, durante el desarrollo fetal las concentraciones de MT-1 y MT-2 cambian dramáticamente. Las concentraciones de metalotioneína en hígado de ratas recién nacidas son 20 veces más altas que las encontradas en ratas adultas (Wong y Klaassen, 1979). Una posible explicación para esta diferencia es que durante el desarrollo la metalotioneína es localizada en el núcleo y por tanto no es susceptible a ser degradada por la “maquinaria” de degradación intracelular (Klaassen, 1994).

3.2.4. QUELACIÓN DE METALES

Aunque a partir de fuentes naturales las metalotioneínas son generalmente aisladas uniendo Zn^{2+} , Cd^{2+} y Cu^{+} , se ha demostrado *in vitro* que otros iones metálicos pueden enlazarse a estas proteínas; estos son: Ag^{+} , Au^{+} , Bi^{3+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pt^{2+} y Tc^{4+} (Romero, 2002).

Existe un consenso en que la propiedad de las metalotioneínas de unir iones metálicos se debe a la presencia y distribución de residuos conservados de cisteína a lo largo de la cadena polipeptídica. Sin embargo, la sustitución de aminoácidos diferentes a la cisteína (lisina, aspártico y glutámico), en metalotioneínas recombinantes de mamíferos y en dominios sintéticos de metalotioneína de langosta, ha demostrado que dichos aminoácidos podrían contribuir en la propiedad de enlace (Cody, 1994)(Muñoz y col, 2000).

De igual forma, estudios de mutagénesis dirigida en metalotioneínas de mamíferos y en sus dominios separados, han demostrado que el cambio de cisteínas por aminoácidos no-coordinantes tiene un efecto negativo sobre las propiedades de enlace, mientras que la sustitución de cisteínas terminales por histidinas, preserva la capacidad de enlace (Romero, 1999).

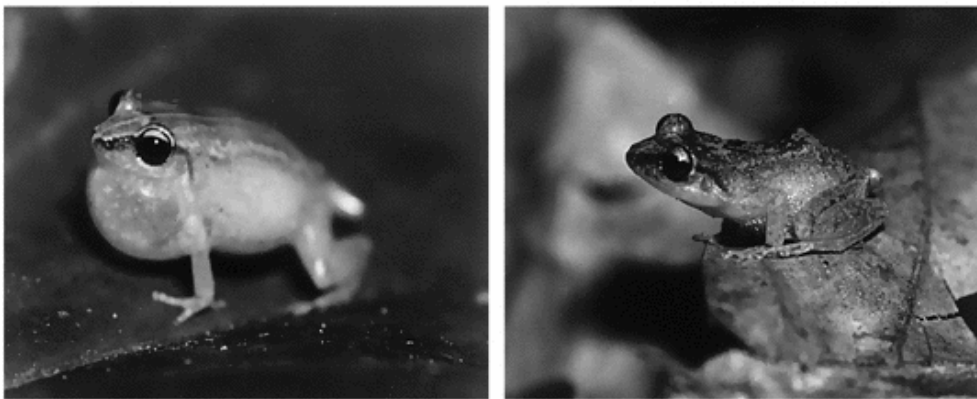
Las metalotioneínas aisladas a partir de fuentes naturales muestran una distribución no uniforme de zinc y cadmio entre los dos dominios. El zinc es unido preferentemente por el dominio N-terminal (dominio β) mientras que el cadmio se une de forma predominante al dominio C-terminal (dominio α) (Nettesheim y col., 1985; Robbins y col., 1991; Briggs y Armitage, 1982). De igual forma, Chen en 1996 demostraron que *in vitro* también el cadmio tiene preferencia por el dominio α , mientras que el cobre la tiene por el dominio β .

3.2.5. *Eleutherodactylus johnstonei*

Eleutherodactylus johnstonei es una especie nativa y endémica de las Antillas menores, con poblaciones recientemente establecidas en varias islas del Caribe, así como en América Central y América del Sur (ver figura 1).

Presenta una morfología de pequeño tamaño (1,7-3.5cm); dorso desde liso hasta débilmente tuberculado, de café a gris, frecuentemente con una línea dorsal delgada y clara o con un par de líneas gruesas; superficie superior de los muslos posteriores café oscura con manchas, vientre crema con la piel formando aureolas. Los machos adultos son 17 a 25 mm de largo y las hembras adultas 17-35 mm, Los machos llaman desde el atardecer hasta la medianoche, producen un corto y agudo sonido. (Savage, 2002)(Ver figura 1).

E. johnstonei se alimenta principalmente de hormigas, sino también de saltamontes, arañas, termitas y colémbolos (Savage, 2002). No depende de agua estancada para cualquier parte de su ciclo de vida, incluyendo la metamorfosis (Bourne, 1997). La reproducción ocurre durante todo el año, sin embargo, la reproducción es más alta durante los más húmedos meses del año.



Tomado de Kaiser. H. 1997.

Figura 1. Fotografía del anuro *Eleutherodactylus johnstonei*. Actualmente especie invasora en Colombia con una gran distribución sobre el país y con alto aislamiento de especies nativas.

Como consecuencia de su amplia distribución y ciertos rasgos como flexibilidad reproductiva, alta adaptabilidad; es considerada como una especie invasora; en la

actualidad en Colombia su distribución es muy amplia. Debido a su gran distribución y adaptabilidad y por tratarse de un anfibio se le puede otorgar importancia como bioindicadores debido a sus peculiaridades anatómicas, como piel muy permeable a los gases y líquidos; sus ciclos de vida que combinan estados larvales acuáticos con estadios adultos terrestres; su extrema especialización ecológica y marcadas preferencias en cuestión de hábitat son muy diversos; generalmente abundantes; relativamente bien conocidos taxonómicamente y activos durante horas predecibles. Además, constituyen una importante parte de la biomasa en la mayor parte de los ecosistemas, cumpliendo múltiples funciones dentro de los ecosistemas acuáticos y terrestres, lo que los transforma en valiosos indicadores de la calidad ambiental (Blaustein, 1990) (Stebbins, 1995).

3.2.6. ÁCIDO RIBONUCLEÍCO (ARN)

El ARN es una macromolécula polinucleotídica de cadena sencilla, que sigue una dirección en sentido 5'- 3' y se encuentra constituida por elementos químicos conocidos como bases nucleotídicas, que son de tipo adenina, citosina, guanina y urácilo, así como por azúcar ribosa. Se han identificado fundamentalmente tres clases de RNA, el RNA mensajero (mRNA), el cual representa el 3 a 5% del RNA total celular, el RNA de transferencia (tRNA), con un porcentaje de 5 a 7% del RNA total celular, el RNA ribosomal (rRNA), que es el más abundante y cuyo porcentaje de RNA total celular oscila entre 85 a 90%, adicionalmente, un grupo de RNA pequeños que pueden ser detectados en 1% del RNA total celular; estos últimos pueden ser de localización nuclear (snRNA), nucleolar (snoRNA) y citoplásmica (scRNA).

Los RNA son resultados de la copia o transcripción de un ADN genómico que sirve como molde; esta copia es mediada tanto en organismos procariontes y eucariontes por enzimas RNA polimerasas y algunos complejos moleculares adicionales que catalizan las reacciones en Eucariontes (Jiménez. F, 2003). Las diferentes clases de RNA en sistema eucarionte son sintetizadas a partir del DNA genómico por medio del proceso de expresión genética denominado transcripción, el cual es la generación de una sola cadena de ARN idéntica a una de las cadenas de DNA. El mecanismo de la transcripción se realiza por acción específica de los RNA-polimerasas I, II y III que se localiza en diferentes compartimientos celulares y cada una de ellas transcribe las distintas clases de RNA (Voet. D, 2004).

El RNA mensajero, ácido nucleico de mayor interés en este proyecto; varía en tamaño y composición de bases, el orden de estas refleja con precisión la información codificada en la secuencia del DNA genómico, representa de 3 a 5% del RNA total celular; por otra parte, el tamaño depende del gen transcrito. Este

RNA en eucariontes en de tipo monocistrónico, es decir, codifica para una sola proteína, es sintetizado en el núcleo y requiere de ser transportado al citoplasma para ser traducido. Posee en su región terminal 5' una caperuza (*cap*) metilada que puede ser monometilada o hipermetilada. En este proceso de metilación participan diferentes enzimas, como pueden ser la guanina-7-metil-transferasa y la 2'-O-metil-transferasa, entre otras. En la región terminal 3', el mRNA posee una cadena de poli(A) de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, la cual no es codificada por el DNA, pero su adición se debe a la acción de la poli(A)-polimerasa; la cola poli-A se asocia con su proteína de enlace, la ABP. La cadena de poli (A) le confiere estabilidad al mRNA, permitiendo que este pueda tener una vida media promedio de aproximadamente 4 horas (Jiménez, 1995).

3.2.7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR).

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es un método para amplificar de un modo eficiente y rápido fragmentos de DNA mediante Taq DNA polimerasa. Puesto que la PCR produce una amplificación, para detectar un mRNA celular bastaría con someterlo a este proceso y, por poco abundante que fuera, podría al final visualizarse con un método de tinción adecuado. Sin embargo, la Taq polimerasa sólo es capaz de sintetizar DNA a partir de un molde de DNA, y es necesario entonces generar primero una cadena de ADN complementario (ADNc) a partir del mRNA mediante una DNA polimerasa dependiente de RNA, enzima conocida como transcriptasa reversa (RT). En conjunto, el método RT-PCR llamado así por el paso de transcripción reversa previo a la PCR (sambrook, 2001).

Existen al menos tres formas de cebar la reacción: con «*random primers*» (hexanucleótidos con secuencias al azar), con oligo (*dT*) o con un *oligonucleótido específico*. El uso de un cebador específico de un mRNA se evita casi siempre, ya que el cDNA resultante no puede ser usado como molde para estudiar por PCR otros mRNAs del tejido. La utilización de oligo (*dT*) tiene la teórica desventaja de producir cDNAs menos completos en la región 5' del mRNA, ya que usualmente la transcripción no progresa hasta el final, pero su gran ventaja es que sólo produce cDNA a partir de mRNAs poli (A)+ (que son los de interés), con lo cual se evitan amplificaciones inespecíficas durante la PCR. El uso de *random primers* permite síntesis representativas tanto de regiones 5' como 3', pero generalmente es preciso purificar mRNA a partir de RNA total mediante cromatografía de afinidad (oligo *dT*). De lo contrario, la transcripción inversa de RNA total con *random primers* rinde poco cDNA, ya que el mRNA es una fracción pequeña del RNA total (Hernández, 1995).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar total o parcialmente la secuencia ADN complementaria de la proteína hepática Metalotioneina (MT) en muestras de *Eleutherodactylus johnstonei*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer una metodología que permita aislar la secuencia ADN complementaria de la proteína hepática Metalotioneina en muestras de *Eleutherodactylus johnstonei*.

Analizar la traducción In-silico de la secuencia de Metalotioneina ADNc obtenida y analizar su filogenia con otras secuencias reportadas.

5. METODOLOGÍA

5.1 NORMATIVIDAD BIOÉTICA Y DISPOSICIONES VIGENTES PARA EXPERIMENTACIÓN.

Teniendo en cuenta las disposiciones y normas en la decisión 391 de la Comunidad Andina de Naciones, se tiene en cuenta aquellas investigaciones en nuestro país cuyo estudio requiere de recursos biológicos y genéticos. Este proyecto está amparado bajo el proyecto titulado “Estudio de polimorfismos de la Proteína Hepática Metalotioneina en muestras de *Eleutherodactylus johnstonei*”, Sometido a evaluación y aprobado por parte del comité Institucional para el cuidado y uso de animales de Experimentación (CIECUAE) de la Universidad ICESI; y por el Dagma (Ver anexos).

5.2 ÁREA DE ESTUDIO

Para lograr el objetivo general, se establecieron zonas de muestreo de ranas del género *Eleutherodactylus* que fueran de fácil acceso y en las cuales se pudiera hacer el muestreo siguiendo todos los requisitos legales. Dado que estas ranas presentan una amplia distribución sobre la ciudad de Cali; se plantearon 4 zonas representativas para nuestro objetivo de búsqueda y análisis de expresión de la proteína.

Las zonas elegidas para el proyecto fueron viveros ubicados en los cuatro puntos cardinales de Cali, en el sur, norte, oriente y occidente de la ciudad, lo que permitió el fácil acceso a la zona (Ver Tabla 2).

5.3 CAPTURA Y EUTANASIA DE LAS RANAS

Para lograr los propósitos propuestos era necesario extraer los hígados de las ranas capturadas y demás los tejidos que se emplearían para diferentes propósitos de investigación. Para llevar a cabo esto, era necesario hacer la extracción cumpliendo con las siguientes condiciones:

- Infiriendo el mínimo estrés y dolor posible en las ranas, tanto para mantener el mínimo sufrimiento en el organismo como para que no exudara las secreciones tóxicas.
- Teniendo en cuenta que en algunos pasos de esta investigación se requiere extraer ARNm (molécula poco estable en tejidos muertos), entonces era necesario mantener el organismo vivo (corazón e irrigación funcionando) pero inconsciente para asegurar la estabilidad de los ARNm.

Por todo lo mencionado en los dos puntos anteriores, se propuso emplear la siguiente técnica:

Cada rana que era capturada, ésta era introducida dentro de un recipiente a baja temperatura (4°C), esto con el propósito de bajar el metabolismo. Las ranas expuestas a este procedimiento muestran aletargamiento a los 10 segundos y a los 15 segundos muestran un tipo de “parálisis por hipotermia” (en este tiempo el proceso puede ser reversado colocando la rana a temperatura ambiente y esta recupera el movimiento). Una vez la rana entraba en esta “parálisis”, entonces con un micropunzón se le hacía una incisión a nivel axial y del foramen magno, para inducir descerebración. Inmediatamente después de la “parálisis” fueron extraídos los hígados y eran depositados en RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para este trabajo se capturaron 28 ranas en total, 7 ranas por cada zona de muestreo; todas las ranas de estudio presentaban un rango de tamaño mayor o igual a 2,5cm, asegurando de este modo que se tratara de un organismo adulto.

Dicha metodología se llevó a cabo, basada en los procedimientos estandarizados para la captura, mantenimiento y disección de *E. johnstonei*; presentes en el laboratorio de investigaciones biomédicas II de la universidad Icesi (Ver anexos 7 y 8).

5.4 AISLAMIENTO DE LA SECUENCIA DE ADN_c DE LA PROTEÍNA METALOTIONEINA HEPÁTICA DE *Eleutherodactylus johnstonei*

Se propuso emplear técnicas de biología molecular para que a partir del tejido hepático de *Eleutherodactylus Johnstonei* aislando los ARN totales y empleando cebadores degenerados, para retro transcribir a ADN_c (empleando tecnología molecular RT-PCR) las secuencias Metalotioneinas encontradas. Una vez conocida la secuencia de ADN_c, mediante un programa bioinformático se analizó la(s) secuencia(s) encontrada(s) y se hizo un análisis comparativo con las secuencias ya reportadas por el Banco de Genes GENBANK, llevando a discusión la homogeneidad o heterogeneidad de la secuencia de la proteína y sus posibles implicaciones sobre su actividad Quelante de Metales pesados.

5.4.1 EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE TÉJIDO HEPÁTICO FRESCO

Para evitar la degradación del ARN de los 28 individuos de *E. johnstonei*, todo el material a emplear, fue esterilizado en autoclave y horno a 200°C por 24 horas antes. El agua utilizada para la preparación de las disoluciones se trató con Dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1% (v/v) y posteriormente fue esterilizada en autoclave.

El aislamiento de RNA total se realizó a partir de 56.9 mg de tejido, proveniente de los 28 hígados homogenizados, esta porción de tejido fue congelado en nitrógeno

liquido y macerado. El proceso de purificación de RNA fue llevado a cabo con el kit de extracción de RNA RNeasy mini kit (Quiagen # 74104).

Una vez extraído el ARN total fue precipitado y lavado con etanol al 75% (v/v) tratado con DEPC y se centrifugó a 10000rpm por 2 minutos a 4°C, posteriormente se resuspendió en 50ul de agua libre de RNAsas y se determinó su concentración mediante su absorbancia a 260nm determinada por el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) y se almacenó a -80°Celsius.

La calidad del ARN obtenido fue verificada mediante geles de agarosa con reactivo desnaturizante para ARN (formaldehído 3%) como es recomendado en el manual (Qiagen #74104).

5.4.2 DISEÑO DE CEBADORES

Para diseñar los cebadores degenerados a partir de secuencias reportadas de metalotioneinas presentes en distintos vertebrados. Se buscaron secuencias completas de ADNc o ARNm en los bancos internacionales de genes (GeneBank) que codifiquen específicamente para metalotioneinas de vertebrados como peces, anfibios y reptiles. Para diseñar los cebadores, primero se toman las secuencias y se alinean empleando el software Clustal (Subrutina del programa MEGA 5.2) y este alineamiento posteriormente se somete evaluación para diseño y construcción de cebadores mediante el empleo de un programa (on line) específico para tal fin (PRIMA-CLADE). Todo esto se hizo siguiendo los parámetros específicos para el diseño de cebadores brindado por el protocolo de RT-PCR a emplear posteriormente (Access RT-PCR System, Promega #1250).

Para probar la eficiencia de los cebadores por pares (“forward” y “reverse”), ellos fueron evaluados mediante un análisis bioinformático, haciendo una búsqueda BLASTN (NCBI) de cada una de las secuencias obtenidas mediante el programa PRIMA-CLADE y cuyos resultados mostraran afinidad para metalotioneinas.

5.4.3 TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE mRNA A cDNA

El RNA total obtenido a partir de hígado, fue tratado durante 45 minutos a 45°C con el agua libre de RNAsas, Buffer Tfl AMV 5X, la enzima transcriptasa inversa AMV (generada por el virus de la Mieloblastosis Aviar) proveniente del kit Access RT-PCR System (Promega #1250) y el oligonucleótido San poly dT. Luego de esta primera reacción se procedió a calentar la muestra a 94°C por 2 minutos, para desnaturizar la enzima AMV-RT. El cDNA generado se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5.4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

El cDNA generado se amplificó por PCR, para ello se empleó la enzima con actividad polimerasa TaKaRa LA Taq (TAKARA BIO INC, # RRO2AG), cuya función polimerasa es muy eficiente, en especial cuando se trata de secuencias con zonas de astringencia debido a un alto contenido de GC, su función es optimizada mediante el Buffer 2X GC y un Mix de dNTP diseñados exclusivamente para esta enzima.

Se emplearon los cebadores diseñados previamente y para optimizar la obtención de ADNc, se realizaron combinaciones sentido y contrasentido (Forward y Reverse). Posteriormente fueron elegidos los cebadores cuya combinación mostró amplificación verificable en geles (amplicones bien definidos, sin degradación alguna) cuya longitud teórica flaqueaban dentro del tamaño esperado.

Una vez fueron escogidos los cebadores candidatos para aislar parte o toda la metalotioneína, se tomaron los cebadores reverse (extremo 3' del amplicón) de cada par elegido, y se hicieron reacciones (independientes) de síntesis de ADNc a partir del ARN total de la muestra y posteriormente se hizo la PCR añadiendo los dos cebadores candidatos y las reacciones de PCR fueron verificadas empleando electroforesis en geles, observación de amplicones que en los geles de electroforesis mostraron gran intensidad y cuya longitud coincidió de forma aproximada con el tamaño predicho de la región amplificada (estimada de forma digital para diferentes Metalotioneínas del banco de datos).

5.4.5 AISLAMIENTO DE AMPLICONES

Los amplicones candidatos, fueron extraídos de los geles, fueron purificados mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega # A9281), amplificados de nuevo mediante PCR y enviados al servicio de secuenciación de la empresa MACROGENusa.

5.5 RESULTADOS ESPERADOS

Se espera que las muestras hepáticas del anfibio *Eleutherodactylus johnstonei*, contengan el gen de la proteína Metalotioneína como respuesta a la presión ambiental, indicándonos así que la adquisición de este gen por parte de esta especie de anfibio se debe a la necesidad de quelar metales pesados y que la especie se puede utilizar como un bioindicador de la calidad de ambiente. Además que al obtener la secuencia de la proteína y comparar con las secuencias reportadas, estas sugieran secuencias homólogas en los bancos de genes de anfibios.

6. RESULTADOS

6.1 CAPTURA Y EUTANASIA DE *E. johnstonei*.

Las zonas elegidas para la captura de las ranas fueron diferentes viveros ubicados en el sur, norte, este y oeste de la ciudad de Cali (Ver Tabla 1).

Para cada sitio de muestreo se registró su posición en coordenadas con el Sistema de Posicionamiento Global (GPS, siglas en Ingles).

Tabla 1. Zonas de muestreo y coordenadas de ubicación.

ZONA (CALI - VALLE DEL CAUCA)	LUGAR DE MUESTREO	COORDENADAS BRINDADAS POR SISTEMA UBICACIÓN GPS
Sur	Vivero Ciudad Jardín	N= 03°22' 22" W= 076°32' 25"
Norte	Vivero Típico Santiago	N= 03° 29' 18" W= 076° 30' 38"
Este	Vivero San Joaquín	N= 03° 23' 14" W= 076° 31' 24"
Oeste	Vivero Santa Rita	N= 03°22' 23" W= 076°32' 24"

Al capturarse las ranas *E. johnstonei*, se procedió a seguir el protocolo para la eutanasia sin dolor y los hígados fueron extraídos, pesados rápidamente (Ver tabla 2) y de forma inmediata fueron preservados en RNAlater para su posterior homogenización y Extracción de ARN. El pesaje se hizo con el propósito de calcular las reacciones a emplear en la extracción de ARN total.

Tabla 2. Peso de hígados extraídos de *E. johnstonei* por zona de muestreo. A pesar de capturar organismos con una longitud no menor a 2.5cm, los pesos y tamaños de hígados extraídos no eran homogéneos.

ZONA DE MUESTREO			
SUR Peso hígados (mg)	NORTE Peso hígados (mg)	ESTE Peso hígados (mg)	OESTE Peso hígados (mg)
4,3	9,8	5,0	7,2
11,0	10,1	7,8	8,2
17,3	10,6	8,0	15,9
21,5	11,2	12,6	24,9
23,6	13,2	13,0	41,3
28,2	14,0	20,7	44,8
33,0	17,0	34,8	47,3

6.2 EXTRACCIÓN DE ARN APARTIR DE TEJIDO HEPÁTICO DE *E. johnstonei*

Para verificar la integridad de las muestras y pureza, se cuantificó la concentración de ARN extraído, mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) y se pudo garantizar que el ácido nucleico (ARN) de interés fue extraído eficientemente (ver tabla 3).

Tabla 3. Cuantificación de la concentración de ARN mediante el Espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Las concentraciones cuantificadas son suficientes para verificarse en un gel de agarosa al 1% con formaldehído desnaturalizantes y tinción con bromuro de etidio la cual es capaz de detectar concentraciones de ácidos nucleicos de hasta 15ng/UL. Es importante tener en cuenta que el valor al cual debe estar aproximado un ARN puro es 2,0; que se evalúa bajo el criterio de la relación entre la absorbancia 260/280nm que indica la pureza con respecto a residuos de proteínas y demás componentes aromáticos que suelen dejar trazas en el ARN extraído.

ALICUOTA RESUSPENDIDA DE ARN	CONCENTRACIÓN (ng/uL)	RELACIÓN 260/280
1	39,4	2,01
2	85,2	2,0
3	134,6	2,0

El aislamiento del ARN total de *E. johnstonei* mostró una integridad adecuada para proseguir con los procesos de obtención de ADNc a partir de ARNm. Esta integridad fue verificada mediante la visualización de bandas de ARN en electroforesis en geles de agarosa, desnaturalizando el ARN con formaldehído. Como resultado se mostraron dos bandas intensas características (que por la literatura y la experiencia en el laboratorio) corresponden a los ARNr (18s) y ARNr (28s) (ver figura 2). Se debe tener en cuenta que un gel con ARN degradado muestra dos bandas difuminadas de baja intensidad y ausencia de banda alguna.

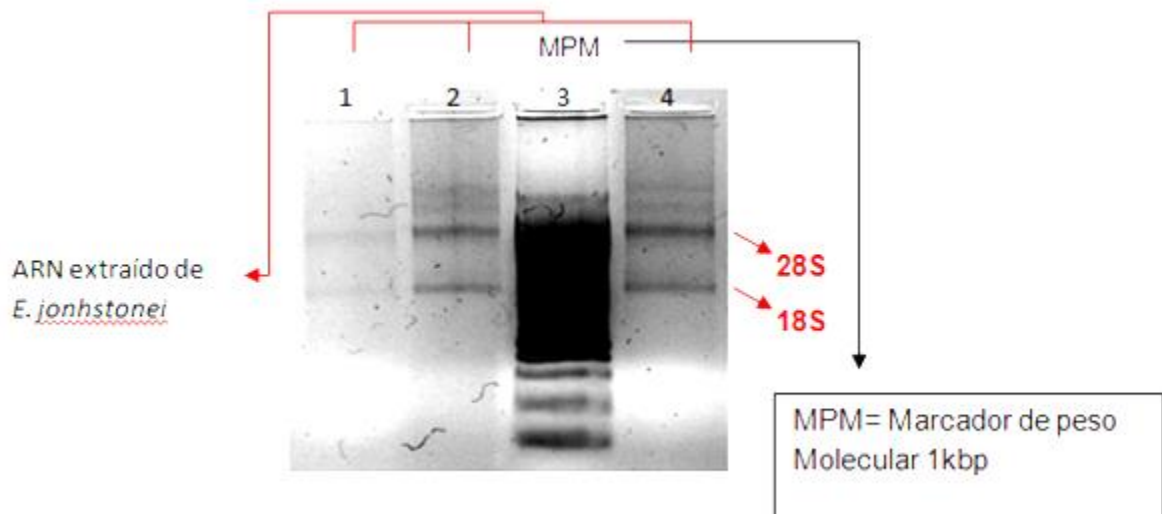


Figura 2. Electroforesis del ARN total extraído de *E. johnstonei*.

(Pozo # 1, 2 y 4) se corrieron geles de agarosa al 1%, formaldehído (desnaturalizante) y tinción con bromuro de etidio, se resuspendió en 3 diferentes alícuotas (producidas al realizar las primeras fases de la extracción en las que el peso de tejido sobrepasaba el límite establecido por el fabricante del kit) de 50uL de agua libre de RNAsas, la posición de sembrado en los pozos va de izquierda a derecha, correspondiente a la concentración (ng/uL) ascendente obtenida del ARN. Se puede observar la presencia de las dos bandas que corresponden a los ARN ribosomales indicando la integridad de las 3 muestras. El pozo número 3 contenía el marcador de peso molecular de 1kbp el cual no fue claramente visible; sin embargo la integridad del ARN es clara y marcada, para ello también se verificó su concentración y su pureza mediante espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Ver Tabla 3) y la relación de la absorbancia a 260nm y 280nm que usa comúnmente para evaluar la contaminación de ácidos nucleicos con proteínas, ya que las proteínas (en particular, los aminoácidos aromáticos) absorbe la luz a 280 nm, el valor de RNA puro $A_{260/280}$ es de ~ 2.0 (Sambrook,2001).

Una vez se verificó la calidad del ARN total aislado, este fue alicuotado y almacenado a -80°C hasta el momento que se requirió de la síntesis de ADNc. Pero primero fue necesario diseñar los cebadores degenerados y específicos para proceder con las reacciones de RT-PCR que permitan convertir el ARNm a ADNc.

6.3 AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA ADNc DE LA METALOTIONEINA DE *Eleutherodactylus johnstonei*

6.3.1 DISEÑO DE CEBADORES

El diseño de cebadores degenerados se hizo buscando secuencias ARNm de metalotioneina de anfibios, en el banco de genes NCBI, para luego alinearlas empleando el programa ClustalW (MEGA 5.2) y someter el alineamiento al

programa (PRIMA CLADE. (<http://dousta.umsl.edu/cgi-bin/primaclade.cgi>). En este banco de genes se halló reportado 3 secuencias pertenecientes a los anfibios; nuestro objetivo era obtener mayor degenerancia en los cebadores, ya que de esta manera la probabilidad de unión de los cebadores a las secuencias heterogéneas de metalotioneina se aumenta. Para ello, se buscaron también secuencias de organismos vertebrados (no mamíferos) que al hacer una análisis por alineamiento con ClustalW mostrarán sitios conservados. Después de hacer múltiples alineamientos, obtención de secuencias (cebadores) candidatas y que estas fueran específicas para secuencias de Metalotioneinas, se pudo observar que era posible alinear secuencias ARNm de ocho especies pertenecientes a diferentes Clases de vertebrados (no mamíferos) (Ver figura 3) que se listan a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Especies con reporte en el GeneBank de presencia de Metalotioneina y con mayor grado de similitud entre secuencias según alineamiento hechos por ClustalW (MEGA5.2). Estas especies pertenecientes a diferentes clases de vertebrados (No mamíferos) fueron empleadas para diseñar los cebadores degenerados que se usaron en los procedimientos posteriores de RT-PCR Y PCR para aislar el ADNc de Metalotioneina.

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMUN	CLASE	CÓDIGO GENE BANK
<i>Xenopus tropicalis</i>	Xenopus tropicalis	Anfibio	NM001171679
<i>Xenopus laevis</i>	Xenopus laevis	Anfibio	NM001087573
<i>Ambystoma mexicanum</i>	Axolote	Anfibio	AF008583
<i>Phasianus colchicus</i>	Faisán común	Ave	X62510
<i>Larus crassirostris</i>	Gaviota colinegra	Ave	JQ267799
<i>Limosa limosa</i>	Aguja colinegra	Ave	JN205794
<i>Gallus gallus</i>	Gallo	Ave	NM205275
<i>Anas platyrhynchos</i>	Pato azulón	Ave	APU34231



Figura 3. Pantallazo del alineamiento hecho mediante ClustalW (Mega5.2) de secuencias de metalotioneinas. Este análisis se hizo con base en ocho diferentes organismos vertebrados (No mamíferos) empleados para el diseño de cebadores degenerados.

De este análisis, el programa PRIMACLADe arrojó un total de 3 pares (Forward y Reverse) de secuencias “cebadoras”, las cuales se enviaron a sintetizar a la casa comercial Integrated DNA technologies (IDT; <http://www.idtdna.com/sit>). La Tabla 5 muestra las secuencias de los cebadores con sus respectivas características que se tuvieron en cuenta para las reacciones de PCR.

Tabla 5. Lista de Cebadores obtenidos mediante el uso del programa PRIMACLADe

El programa fue configurado para que escogiera secuencias de oligos con temperaturas de melting entre el rango de 55 a 65 °C y una longitud en secuencia de bases mayor a 18 bases. En esta tabla se exponen las secuencias con contenido %GC más alto y que al ser buscadas empleando la herramienta BLASTN (NCBI), esta arrojó similitud de secuencias de metalotioneinas reportadas. La sustituciones para el diseño óptimo de los cebadores (oligos) se da como sigue R = A, G; Y = C,T. (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

NOMBRE DEL CEBADOR	SECUENCIA DEL CEBADOR SENTIDO (5' → 3')	Tm(°C)	%GC	LONGITUD (pb)
DG1Forward	AARAGYTGCTGYTCCTGCTG	60.87	55	20
DG1Reverse	CAGCAGGARCAGCARCTYTT	60.87	55	20
DG2Forward	ARAGYTGCTGYTCCTGCTG	59.46	57.89	19
DG2Reverse	CAGCAGGARCAGCARCTYT	59.46	57.89	19
DG3Forward	AGYTGCTGYTCCTGCTGY	60.46	61.11	18
DG3Reverse	RCAGCAGGARCAGCARCT	60.46	61.11	18

6.3.2 AMPLIFICACIÓN DEL ADNc TOTAL O PARCIAL DE METALOTIONEINA A PARTIR DE TEJIDO HEPÁTICO DE *E. jnhstonei*.

Como ya se mencionó previamente en la metodología, se empleó el método de RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) para obtener la secuencia de ADNc total o parcial de la Metalotioneina a partir del tejido hepático extraído.

Como primera reacción se generó la primera cadena de ADNc mediante el buffer AMV, enzima AMV provenientes del Kit Access RT-PCR System (Promega #1250) y el oligo Poly-dT (IDT) bajo una temperatura de 45°C durante 1 hora y 94°C por 2 minutos para desactivar la enzima Transcriptasa reversa AMV, posteriormente se agregaron los reactivos para un PCR que generará copias del ADNc generado en la primera reacción.

Algunas de las reacciones de transcripción reversa para obtener la cadena simple se hicieron con el cebador poly dT mientras otras tres reacciones se hicieron con

los cebadores DG1R, DG2R y DG3R (Ver Figura 4). Estas reacciones generaron plantillas que luego fueron usadas para las reacciones de PCR empleando combinaciones de los cebadores degenerados y cuyas combinaciones dan un total de 18 reacciones independientes. Estas reacciones se hicieron empleando la enzima TaKaRa, siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando el buffer GC.

El estado del Kit de RT-PCR fue probado empleando los controles ofertados en el kit.

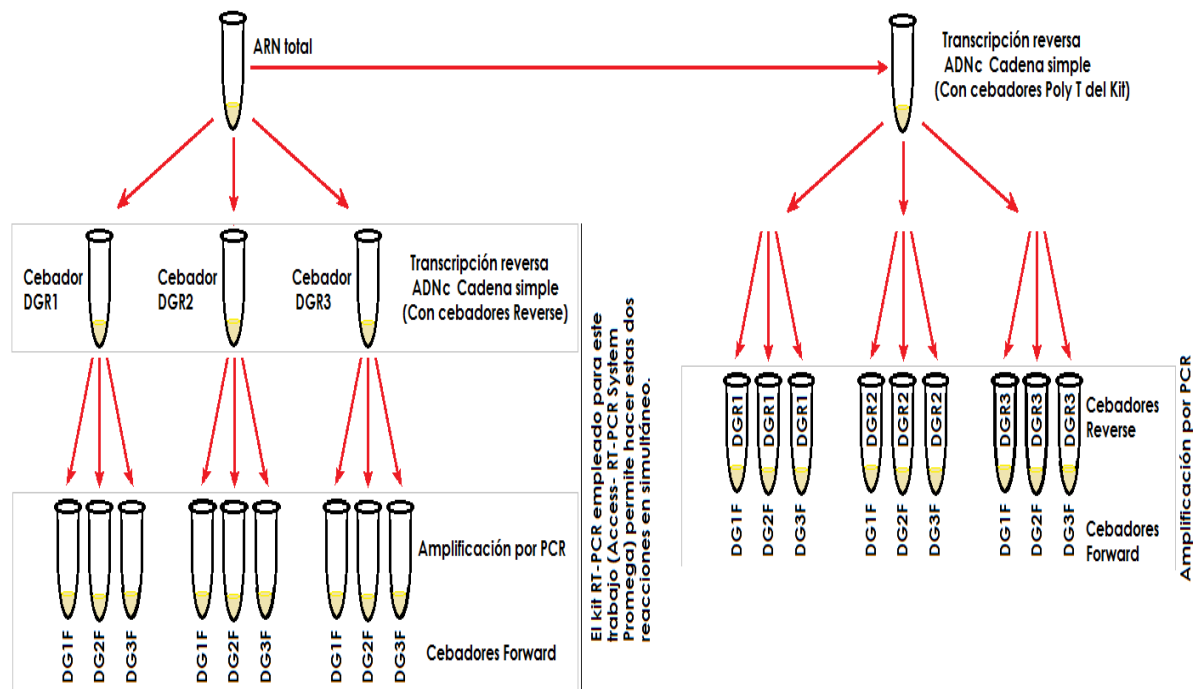


Figura 4. Diagrama del diseño del experimento realizado para las reacciones de RT-PCR y PCR. Estas reacciones involucraron todas las combinaciones posibles entre los cebadores forward y reverse diseñados para aislar el ADNc de Metalotioneina.

Luego de realizar las diferentes reacciones de PCR, se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se escogieron las reacciones que generaron amplicones que cumplieran dos condiciones: 1) Que mostraran una “banda” de alta intensidad (patrón no degradado, ni difuso) y 2) que el tamaño del amplicón esté lo más cercano posible al peso molecular esperado (aprox. 100pb).

De todos los intentos, reacciones y combinaciones de cebadores documentados en geles se hizo un total de 18 reacciones de PCR, y se triplicaron variando entre ellas temperatura de hibridización (annealing) para un total de 54 reacciones.

Los parámetros de las reacciones de PCR adaptados a las sugerencias del Kit La TAQ TaKaRa (para todas las combinaciones de cebadores y plantillas ADNc de cadena simple) se exponen en la Tabla 6, la temperatura de anidamiento de los cebadores fue variable en diferentes reacciones, de la cual a 61°C se observó mayor visibilidad de amplicones.

Tabla 6. Programa de ciclado empleado en las reacciones de PCR con los cebadores DG2F-DG1R y DG3F-DG1R.

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	DURACIÓN (min)	N° Ciclos
Desnaturalización ADNc	94	3	1
Desnaturalización ADNc	94	0.5	40
Anillamiento de cebadores al ADNc	61	0.5	40
Extensión LA TAQ TaKaRa	72	2	40
Extensión LA TAQ TaKaRa	72	3	1
Preservación de la Reacción	4	Infinito	1

Muy pocas reacciones de PCR mostraron bandas (posibles amplicones difusos). Solo una reacción mostró una banda que se seleccionó para ser sometida a secuenciación (ver figura 5). Esta banda fue obtenida al hacer transcripción reversa empleando Poly dT y una PCR posterior empleando los cebadores DG2F y DG1R que cumplía las condiciones esperadas de forma visible (Ver figura 5b pozo 5).

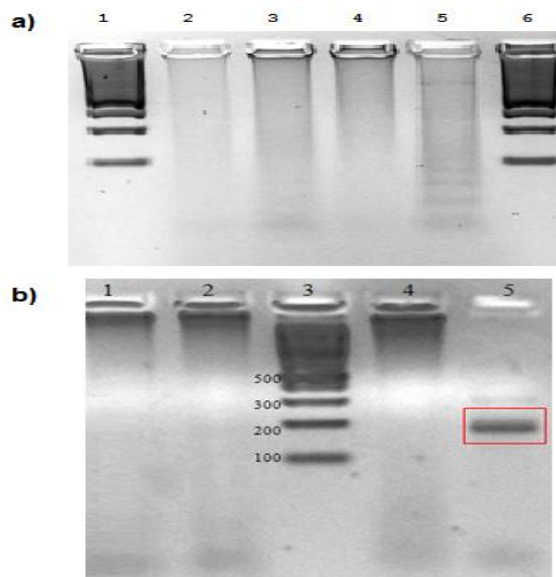


Figura 5. Ejemplos de electroforesis de PCR obtenidas al realizar combinaciones con los cebadores diseñados. Los geles se hicieron al 3% de agarosa con tinción de bromuro de etidio. En la figura 5a, los pozos 1 y 6 representan el marcador de peso molecular 100 pb

(Promega). Los otros pozos no muestran bandas (amplicones) que sigan los parámetros de selección de amplicones candidatos para secuenciación. En contraste el gel mostrado en la figura b) pozo 5 muestra una banda nítida entre 100 y 200 pb. Este amplicón fue elegido para ser secuenciado.

El amplicón obtenido fue aislado del gel (cortándolo con bisturí), y fue purificado mediante el kit de purificación (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) y fue enviado al servicio de secuenciación de la empresa MACROGENusa (<http://www.macrogenusa.com/service/standard/standardseq.jsp>)

La secuencia obtenida presentó una longitud de 40 bases, de las cuales 15 dan lectura ilegible (N) y la secuencia legible obtenida presenta una longitud de 25 bases (ver figura 6). Al someter la secuencia a un análisis Blastn (en línea), las secuencias similares no correspondieron a metalotioneinas sugiriendo la inespecificidad de la reacción (ver figura 7).

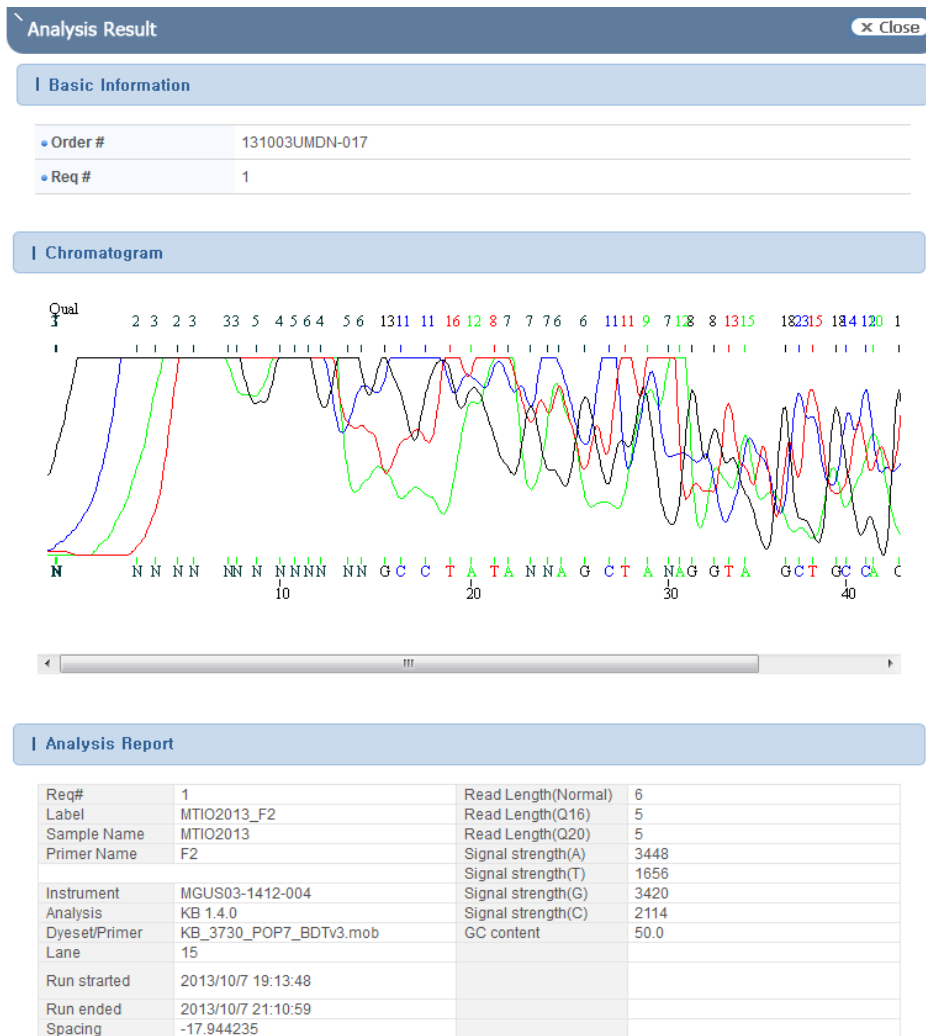
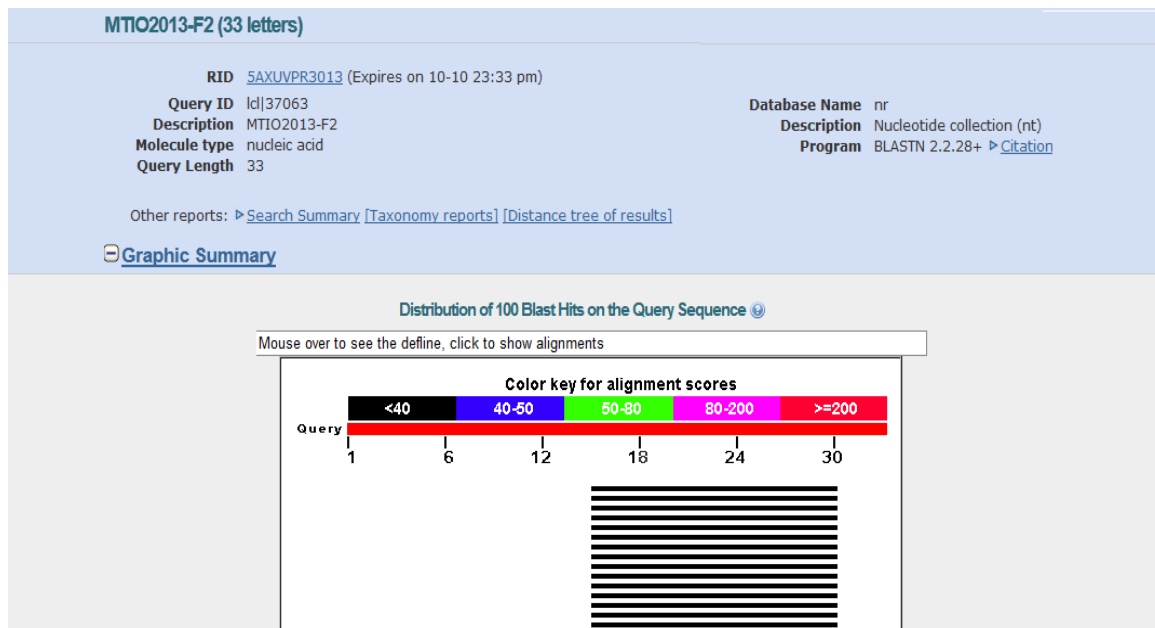


Figura 6. Pantallazo del resultado de la secuenciación realizada por la empresa MACROGENusa. La secuencia obtenida es altamente inespecífica. Dicho resultado no sugiere similitud con el ADNc de la proteína Metalotioneina.



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: Capra hircus 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic (HTR3A), mRNA	30.2	30.2	45%	520	100%	XM_005689623.1
PREDICTED: Pundamilia nvererei ras GTPase-activating protein 1-like (LOC102202240), transcript variant X2, mRNA	30.2	30.2	45%	520	100%	XM_005722323.1
PREDICTED: Pundamilia nvererei ras GTPase-activating protein 1-like (LOC102202240), transcript variant X1, mRNA	30.2	30.2	45%	520	100%	XM_005722322.1
Alteromonas macleodii str. 'Deep ecotype', complete genome	30.2	30.2	45%	520	100%	CP001103.3
PREDICTED: Oreochromis niloticus ras GTPase-activating protein 1-like (LOC100707127), mRNA	30.2	30.2	45%	520	100%	XM_003456076.2
PREDICTED: Bos taurus potassium voltage-gated channel, subfamily member 6 (KCNIH6), transcript variant X3, mRNA	30.2	30.2	45%	520	100%	XM_005220889.1
PREDICTED: Bos taurus potassium voltage-gated channel, subfamily member 6 (KCNIH6), transcript variant X2, mRNA	30.2	30.2	45%	520	100%	XM_005220888.1
PREDICTED: Bos taurus potassium voltage-gated channel, subfamily member 6 (KCNIH6), transcript variant X1, mRNA	30.2	30.2	45%	520	100%	XM_005220887.1
Alteromonas macleodii str. 'Ionian Sea UM4b', complete genome	30.2	30.2	45%	520	100%	CP004855.1
Alteromonas macleodii str. 'Ionian Sea UM7', complete genome	30.2	30.2	45%	520	100%	CP004853.1

Figura 7. Pantallazo de la búsqueda y alineamiento de BLASTN para la secuencia obtenida mediante RT-PCR Y PCR. Este análisis arrojó que la secuencia no corresponde a metalotioneina y presenta gran similitud con secuencias que codifican para otro tipo de moléculas (canales de potasio, receptores, etc.) diferentes a la de interés (Metalotioneina).

7. DISCUSIÓN

Los organismos objeto de estudio fueron de fácil de consecución, manejo y disección, debido a que se trata de una especie ampliamente distribuida sobre los lugares entre los 0-1200 msnm y entre ello se encuentra la ciudad de Cali. Además, las implicaciones sobre la dinámica ecológica se ven negativamente poco afectadas, ya que se trata de una especie invasora que ha colonizado, perturbado la barrera geográfica y actualmente es una amenaza para la dinámica poblacional de las especies nativas y en general para los ecosistemas. Todo esto conlleva a que la utilidad de este anuro beneficia tanto la dinámica biológica como la facilidad de obtención de los especímenes y de legalidad ética para los estudios realizados.

Al determinar las zonas de muestreo, se tuvo en cuenta condiciones que permitieran y facilitaran el acceso a la zona y no implicase riesgo para el investigador interesado u personal quien muestrea el lugar. Los cuatro sitios escogidos además de cumplir con las exigencias de seguridad y fácil muestreo, se emplearon pensando en aumentar así la probabilidad de obtener especímenes de nuestro interés cuya exposición a ambientes perturbados es alta y por ende, existe gran probabilidad que aquellos individuos por presión ambiental, modifican su expresión genética para contrarrestar trazas de metales pesados, a través de la expresión del gen de la metalotioneína. También, al realizar los procedimientos siguientes se garantizó con dicho muestreo que hubo un pool de genes que aumentan la probabilidad de encontrar polimorfismos en la proteína (solo si se halla que se expresa).

Los hígados de *Eleutherodactylus johnstonei* presentaron pesos entre 4,3 y 47 mg. Todos estos hígados fueron macerados siguiendo las condiciones del kit de extracción de ARN total de Qiagen. El peso total de hígados sugirió un cálculo para emplear tres columnas, pero para esto el peso total se dividió en tres y se establecieron los procedimientos para tres extracciones empleando el kit. Los resultados de extracción mostraron un aislamiento de ARNm con eficiencias (cosechas) comprendidas entre 39,6 a 134,6 ng/uL. Las pruebas espectrofotométricas de la relación de lectura a longitudes de onda 260/280 sugieren alta pureza dado que las lecturas de la relación de absorbancia mostraron un rango entre 1,9 y 2 siendo 2 la lectura sugerida como altamente pura. Todo esto se logró gracias al establecimiento y metodologías de extracción de ARN.

Las muestras de ARN total aisladas del hígado de la rana *Eleutherodactylus johnstonei* permitieron obtener ARN estable, dado que al correr las muestras en geles desnaturalizados de Agarosa 1% con formaldehído como agente desnaturalizante (que permite suprimir la estructura terciaria de los ARN) permitieron observar las dos bandas que son características de los ARN

ribosomales (más abundantes). Se sabe mediante esta prueba que la estabilidad de estos ARNr sugiere la estabilidad de los ARNm y ARNt.

La metodología empleada para la extracción del ARN total fue basada en múltiples precauciones que se deben tener en cuenta, ya que el éxito de cualquier extracción de RNA es totalmente dependiente de la eliminación de toda posible contaminación de ribonucleasas (RNAsas) que degradan el RNA durante y después de la extracción, provocando bajos rendimientos de RNA de longitud completa. Las ribonucleasas son enzimas muy resistentes y de gran actividad catalítica: a) son marcadamente resistentes al calor, manteniendo incluso una considerable actividad tras un ligero calentamiento; b) son activas dentro de un amplio rango de pH; c) usualmente no requieren cofactores para su actividad; c) algunas, como las RNAsas pancreáticas, se renaturalizan fácilmente después de un tratamiento con agentes desnaturalizantes (p. ej., urea) (Hernández. A, 1995).

Es importante nombrar que el contenido de RNAsas endógenas varía con el tejido que se estudia: páncreas y bazo son tejidos con muy altos contenidos de RNAsas, mientras que riñón, hígado e intestino tienen niveles menores, aunque no despreciables. Un problema adicional es que el contenido de mRNA en cualquier tejido es muy bajo: una célula típica de mamífero contiene aproximadamente 10 - 5ug de RNA total, del que tan sólo 1-5 % corresponde a mRNA. De ese mRNA, aproximadamente el 50 % lo constituyen clases de mensajeros presentes en un número de copias < 10 por célula 1. Por esta razón, una pequeña contaminación de RNAsas, tanto endógena (del propio tejido) como exógena (del material utilizado, soluciones, manos, polvo, etc.), puede suponer un problema serio, por lo cual se deben tomar algunas precauciones (Sambrook, 2001).

A diferencia del DNA, el RNA es muy inestable una vez obtenido el tejido, por la presencia de las RNAsas celulares. Por ello resulta crítica la congelación del tejido o su rápida homogeneización en la solución desnaturalizante. Una fuente potencialmente grande de contaminación con RNAsas son las manos del investigador por las células epidérmicas que se liberan continuamente. Es por ello obligado el uso de guantes tanto al realizar la extracción como al preparar las soluciones. De fundamental importancia para una extracción de RNA intacto con éxito es la ejecución de todas las fases tan rápidamente como sea posible, ya que esto elimina riesgos de contaminación. Los recipientes a utilizar deben ser de plástico y estériles, y si se quiere trabajar con recipientes de cristal es necesario calentarlos a 250° C durante 24 horas o más (ni siquiera el autoclavado nos garantiza la inactivación de ribonucleasas).

Hay que trabajar, además, con soluciones libres de RNAsas contaminantes, y esto se consigue tratándolas previamente con DEPC. El DEPC (Dietilpirocarbonato) es un agente alquilante que reacciona covalentemente y de modo inespecífico con las proteínas, pero es muy reactivo con los sitios activos de las RNAsas,

inactivándolas muy eficaz, aunque no absolutamente (Hernández. A, 1995).

En cuanto a las secuencias escogidas para el diseño de los cebadores degenerados, fueron de tres anfibios y cinco aves debido a que alineamientos preliminares con tan solo las secuencias de anfibios no permitían obtener secuencias de cebadores óptimos para el desarrollo del trabajo. Al agregar las aves (en ausencia de reptiles), el alineamiento permitió que al someter las secuencias el programa de diseño de cebadores PRIMACLAD, este si arrojara secuencias de cebadores. Idealmente se esperaba que los cebadores fueran exclusivamente de anfibios pero con tan pocas secuencias reportadas se presentó el problema de diseño.

El alineamiento de ocho secuencias de metalotioneinas de vertebrados, permitió que mediante el programa PRIMACLAD se obtuvieran 14 pares de cebadores pero de estos solo tres pares sugerían parecerse a las secuencias Metalotioneina (por búsqueda Blastn). Esta estrategia es la estrategia más económica usada en las técnicas de clonación, amplificación de secuencias y aislamiento de genes cuyas secuencias son desconocidas, pero no son absolutamente eficientes en todos los casos.

Las reacciones de transcripción reversa y reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) hechas en este trabajo sumaron un total de 54 reacciones en las que se emplearon combinaciones con los cebadores degenerados diseñados para metalotioneina. Al verificar las reacciones de PCR mediante geles de agarosa se evidenció que no se produjeron (amplicones) bandas bien definidas exceptuando para la reacción en la que se el ADNc se hizo empleando el cebador Poly dT, cuyo producto, posteriormente fue amplificado por PCR empleando los cebadores DG2F y DG1R. El producto obtenido se envió a secuenciar con el primer DG1R y la secuencia reportada presentó una longitud de 44 bases de los cuales 25 bases fueron legibles por el sistema de secuenciación mientras que 19 bases fueron ilegibles. Este resultado probablemente se debió al proceso de manipulación y purificación de la muestra a partir del gel. Por lo general se sugiere en estos casos, tomar el producto de PCR, vectorizarlo, transformar bacterias competentes para reproducirlas (multiplicar) y luego aislar los plásmidos para ser enviados a secuenciación. De esta forma se obtienen lecturas de secuenciación más largas y sin caída de la lectura por parte del sistema de secuenciación. El proyecto finalmente no optó por realizar esta vía debido a que no se había planteado al inicio del proceso de investigación pues la vía escogida da buenos resultados cuando las reacciones con los cebadores son muy específicas.

De la lectura de la secuencia obtenida (25 bases) al someterla a una búsqueda Blastn, esta no mostró similitud con Metalotioneinas, pero al observar las cinco secuencias iniciales similares arrojadas por la búsqueda Blastn, la secuencia mostró similitud con: El receptor ionotrópico 5HT (serotonina) de cabra (*Capra*

hircus), Proteína activadora GTPasa de los peces *Pundamilia nyererei* y *Oreochromis niloticus*.

Teniendo en cuenta que la evidencia de extracción de ARN fue exitosa pero la secuencia obtenida fue producto de una reacción inespecífica, se sugiere que para aislar la secuencia ADNc que codifica para metalotioneina, se debe modificar las reacciones RT-PCR para incrementar la posibilidad de hibridización de los cebadores diseñados y los ADNc (si este fuere el caso). Esto se puede lograr con técnicas como PCR en gradiente o Touch down PCR. La otra opción es la de rediseñar los cebadores (aunque el tamizaje digital sugiere que las secuencias de estos hibridizan altamente con secuencias de Metalotioneinas).

8. CONCLUSIONES

Se estableció una metodología que permite el aislamiento del ADNc de la proteína hepática metalotioneina, la cual involucro desde un análisis y planteamiento de las zonas y sitios de muestreos, la elección y captura de los especímenes, la extracción de ARN; pero requiere del análisis más riguroso de termodinámica de las reacciones de RT-PCR y PCR para obtener el patrón de amplificado específico.

La secuencia obtenida mediante transcripción reversa (con el cebador Poli dT y los cebadores diseñados DG2F y DG1R) y enviada al servicio de secuenciación no sugiere la ausencia de proteína metalotioneina, existe probabilidad de que el aislamiento de dicha secuencia cuenta con una alta astringencia ya que dentro de la región conservada (zona sobre la que se diseñaron los cebadores) el porcentaje de GC es alto y pudo ocasionar interferencia en el anidamiento con los cebadores, una alternativa que permite el análisis y la estandarización rigurosa de dicho problema termodinámico en las reacciones, puede ser el empleo de técnicas como PCR touch down y PCR en gradiente.

La metodología empleada para el aislamiento del amplicón no fue eficiente, debido a que al ser eluido del gel dicho amplicón, hay un alto grado de interferencia ocasionado por la agarosa la cual en dichos procedimiento nunca es totalmente eliminada del producto de PCR, y al utilizar esta en alta concentración (nuestro caso 3%) la limpieza es menos eficiente creando dificultad al detectar las secuencias, con un marco de lectura corto e inespecífico que dificultad al investigador hacer el análisis.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar nuevas reacciones de RT-PCR que permitan establecer con mayor claridad la termodinámica de las reacciones, tales como PCR en gradiente, o PCR touch Down; optimizando así las temperaturas de anidamiento y el tiempo de reacción; además de los costos de las reacciones y el tiempo empleado por el investigador.

También se sugiere que de encontrar amplicones con las características esperadas, estos sean seleccionados vía librería de clones, introduciendo estos en vectores de clonación, para luego aislar las colonias de bacterias transformadas, que sean candidatas a tener el amplicón. Estas se hacen crecer en población y se lisan para obtener el plásmido con el amplicón. Como se dijo antes, esta técnica permite mejores lecturas durante la secuenciación, por que se discrimina la interferencia de otras secuencias amplificadas que puedan interferir con la reacción de secuenciación. Además, permite que por cada copia que se inserte en una célula competente, se aumenten las probabilidades de encontrar polimorfismos de la secuencia de interés.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bacon, J.P., Gray, J.A., and Kitson, L. 2006. Status and conservation of the reptiles and amphibians of the Bermuda islands. *Applied Herpetology*: 323-344
- Berg. M. y Shi Y. (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science*. 271:1081-1085.
- Berger SL y Kimmel AR (eds): Cuide to Molecular Cloning Techniques. *Methods Enzymol*. Vol 152. Academic Press Inc., Orlando, 1987
- Blaustein. A; Wake. D,Sousa.W. (1994). Amphibian Declines: Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and Global Extinctions. *Conservation Biology*, Vol.8, No.1
- Blaustein.A*; Belden L; Olson D; Green.D; Root.T; Kiesecker.J. (2001). Amphibian Breeding and Climate Change. *Conservation Biology*. Volume 15, Issue 6, pages 1804–1809
- Bourne, G. R. (1997). Reproductive behaviour of terrestrial breeding frogs *Eleutherodactylus johnstonei* in Guyana. *Journal of Herpetology*, 31(2): 221-229.
- Bremner I, Mehra R.K. (1991). Assay of extracellular metallothionein. *Methods Enzymol*. 205:60-70.
- Briggs R.W., Armitage I.M. (1982). Evidence for site-selective metal binding in calf liver metallothionein. *J. Biol. Chem*. 257:1259-62.
- Brouwer M., Enghild J., Hoexum-Brouwer T., Thogersen I., Truncali A. (1995). Primary structure and tissue-specific expression of blue crab (*Callinectes sapidus*) metallothionein isoforms. *Biochem. J*. 311: 617-622.
- Brouwer M., Syring R., Hoexum-Brouwer T. (2002). Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. *J. Inorg. Biochem*. 88:228-239.
- Capdevila, M., & Atrian, S. (2011). Metallothionein protein evolution: a miniassay. *Journal Of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication Of The Society Of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), 977-989.
- Chen P., Muñoz A., Nettesheim D., Shaw C.F. 3rd, Petering D.H. (1996). Stoichiometry and cluster specificity of copper binding to metallothionein: homogeneous metal clusters. *Biochem. J*. 317:395-402.

- Cherian. M, Apostolova M.D. (2000). Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cell Mol. Biol.* 46:347-356.
- Csermely P., Sandor P., Radics L., Somogyi J. (1989). Zinc forms complexes with higher kinetical stability than calcium, 5-F-BAPTA as a good example. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:838-844.
- Cody C.W, Huang P.C. (1994). Replacement of all alpha-domain lysines with glutamates reduces metallothionein detoxification function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202:954-9.
- Dallinger R., Berger B., Hunziker P., Kägi J.H. (1997). Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature.* 388:237-238.
- Dameron C.T, Harrison M.D. (1998). Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(Suppl):1091S-1097S.
- El País (2011). Contaminación del río Cauca amenaza la salud humana.
- Fundación Evaristo García (2012). Metales pesados: fuentes y mecanismos de alcance a mujeres embarazadas en la ciudad de Cali.
- Goyer, R. Golub, M. Choudhury, H. Hughes, M. Kenyon, E. Stifelm, M. (2004). Issue paper on the human health effects of metals.
- Hamer D.H. (1986). Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55:913-951.
- Jimenez.F. (2003). *Biología celular y molecular*. Pearson Education, 1^{era} edición. Pag 23.
- Hernández. A, (1995). Análisis del ARN: Estudio de la expresión génica, *NEFROLOGIA*. Vol. XV. Suplemento 2.
- Kershaw W.C., Klaassen C.D. (1992). Degradation and metal composition of hepatic isometallothioneins in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112:24-31.
- Klaassen C.D., Choudhuri S., McKim J.M. Jr., Lehman-McKeeman L.D., Kershaw W.C. (1994). In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein. *Environ. Health Perspect.* 102:141-6.
- Klaassen, C., Liu, J., & Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*, 39:267-294.

Kaiser, H (1997). Origins and introduction of the Caribbean frog *Eleutherodactylus johnstonei* (Leptodactylae): management and conservation concerns. *Biodiversity and Conservation*, 6: 1391-1407.

Liu J., Klaassen C.D. (1996). Absorption and distribution of cadmium in metallothionein-I transgenic mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 29:294-300.

Liu, J., Zhou, Z., Zhang, W., Bell, M., & Waalkes, M. (2009). Changes in hepatic gene expression in response to hepatoprotective levels of zinc. *Liver International: Official Journal Of The International Association For The Study Of The Liver*, 29(8), 1222-1229.

Liu Y., Liu J., Iszard M.B., Andrews G.K., Palmiter R.D., Klaassen C.D. (1995). Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135:222-8.

Margoshes M., Vallee B.L. (1957). *A cadmium protein from equine kidney cortex*. *J. Am. Chem. Soc.* 79:4813-4814.

Martín Mateo, M., Herreros, C., Melero, R., & Bustamante, J. (2003). Isolation, characterization, and evaluation of metallothionein in renal transplant patients. *Renal Failure*, 25(5), 719-725.

Miles A.T., Hawksworth G.M., Beattie J.H., Rodilla V. (2000). Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35:35-70.

Muñoz A., Petering D.H., Shaw C.F. 3rd. (2000). Structure-reactivity relationships among metallothionein three-metal domains: role of non-cysteine amino acid residues in lobster metallothionein and human metallothionein-3. *Inorg. Chem.* 39:6114-23.

Ngu, T., & Stillman, M. (2009). Metalation of metallothioneins. *IUBMB Life*, 61(4), 438-446.

Nettesheim D.G., Engeseth H.R., Otvos J.D. (1985). Products of metal exchange reactions of metallothionein. *Biochemistry* 24:6744-51.

Pulido P., Kagi J.H., Vallee B.L. (1966). Isolation and some properties of human metallothionein. *Biochemistry.* 5:1768-1777.

Pattanaik A., Shaw C.F. 3rd, Petering D.H., Garvey J., Kraker A.J. (1994). Basal metallothionein in tumors: widespread presence of apoprotein. *J. Inorg. Biochem.* 54:91-105.

Romero-Isart N., Cols N., Termansen M.K., Gelpi J.L., Gonzalez-Duarte R., Atrian S., Capdevila M., Gonzalez-Duarte P. (1999). Replacement of terminal cysteine with histidine in the metallothionein alpha and beta domains maintains its binding capacity. *Eur. J. Biochem.* 259:519-27.

Romero-Isart N., Vasak M. (2002). Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* 88:388-96.

Robbins A.H., McRee D.E., Williamson M., Collett S.A., Xuong N.H., Furey W.F., Wang B.C., Stout C.D. (1991). Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 221:1269-93.

Saint-Jacques E, Guay J, Wirtanen L, Huard V, Stewart G, Séguin C (1998). Cloning of a Complementary DNA Encoding an *Ambystoma mexicanum* Metallothionein, AmMT, and Expression of the Gene During Early Development. *DNA Cell Biol.* 1998 Jan;17(1):83-91.

Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Editor: Nolan, C. Ed. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

Savage, J. M. 2002. *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica*. Chicago and London: University of Chicago Press. 934 p.

Sternlieb I. (1987). Hepatic lysosomal copper-thionein. *Experientia Suppl.* 52:647-53.

Theocharis, S., Margeli, A., Klijanienko, J., & Kouraklis, G. (2004). Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology*, 45(2), 103-118.

Tsujikawa K., Suzuki N., Sagawa K., Itoh M., Sugiyama T., Kohama Y., Otaki N., Kimura M., Mimura T. (1994). Induction and subcellular localization of metallothionein in regenerating rat liver. *Eur. J. Cell Biol.* 63:240-6.

Trayhurn P., Duncan J.S., Wood A.M., Beattie J.H. (2000). Regulation of metallothionein gene expression and secretion in rat adipocytes differentiated from preadipocytes in primary culture. *Horm. Metab. Res.* 32:542-7

Van Holde K.E., Miller K.I. (1995). *Hemocyanins*. *Adv. Protein. Chem.* 47:1-81.

Vašák, M. (2011). Metallothioneins: chemical and biological challenges. *Journal Of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication Of The Society Of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), 975-976.

Vasak M., Hasler D.W. (2000). Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:177-183

Voet. D (2004). *Bioquímica*. 3era edición. Editorial medica panamericana S.A. pag. 1153.

Wang, Y. Goodrich, J. M. Gillespie, B. Werner, R. Basu, N. Franzblau, A. (2012). An investigation of modifying effects of metallothionein single-nucleotide polymorphisms on the association between mercury exposure and biomarker levels. *Environmental Health Perspectives*;. 120: 4, 530-534. 41 ref.

Wong K.L., Klaassen C.D. (1979). Isolation and characterization of metallothionein which is highly concentrated in newborn rat liver. *J. Biol. Chem.* 254:12399-403.K

Ye B., Maret W., Vallee B.L. (2001). Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:2317-22.

ANEXOS

ANEXO 1

MATRIZ DE MARCO LÓGICO

Objetivo General: Aislar total o parcialmente la secuencia ADN complementaria de la proteína hepática Metalotioneina en muestras de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> .			
Objetivos Especifico	Actividad	Indicadores	Supuestos
Establecer una metodología que permita aislar la secuencia parcial o total de ADN complementaria de la proteína hepática Metalotioneina en muestras de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>.	Establecer una superficie estéril y una estructura cerrada para disección del organismo objeto de estudio.	Establecimiento de una cámara de disección sencilla pero estéril	Genebank es una fuente fiable para la evaluación de las secuencias.
	Diseño de primers complementarios a la secuencia del gen MT en anfibios.	Primers degenerados diseñados y tamizados In-Sílico	Las secuencias escogidas tienen pocos contenidos de CG. La longitud de la secuencia escogida es suficientemente de tal manera que la probabilidad de anillamiento con una secuencia diferente a la de nuestro interés sea muy baja.
	Extracción de ARNm a partir de tejido hepático de anfibios.	La visualización (en gel de agarosa, desnaturalizante) de las dos bandas de ARN.	Las biopsias de tejido hepático se preservaron correctamente. El laboratorio cuenta con equipamiento que garantiza que las

<p>Secuenciación del amplicón positivo obtenido del anfibio objeto de estudio y su análisis comparativo In-sílico de esta nueva secuencia con otras secuencias de anfibios reportadas en bancos de genes.</p>	<p>Realizar transcripción reversa (RNAm-cDNA) de las extracciones de ARNm obtenida.</p>	<p>Amplificación exitosa de la secuencia de interés (gen MT), visualización en el gel de agarosa de bandas en el tamaño de amplicón esperado.</p>	<p>condiciones climáticas de las muestras, se mantendrán pese algún percance</p> <p>El marcador molecular escogido es lo suficientemente polimórfico para detectar la secuencia de interés.</p>
	<p>Secuenciación de las regiones amplificadas en el laboratorio.</p>	<p>Las secuencias obtenidas sugieren secuencias homólogas en los bancos de genes de anfibios y que coincidan en similitud con secuencias del gen MT de anfibios.</p>	<p>Las muestras enviadas para la secuenciación se preservaron correctamente.</p>
	<p>Alineación de las secuencias reportadas en el GeneBank y las halladas en el laboratorio.</p>	<p>La secuencia obtenida corresponde a secuencia parcial o total de la MT en <i>E.jonhstonei</i>.</p> <p>Identificación de sustituciones, modificación de residuos, entre otras; causantes de las variaciones encontradas en las</p>	<p>El estudiante maneja correctamente los programas que realizan la alineación.</p> <p>El estudiante conoce e interpreta bien los resultados que arrojan los programas digitales.</p>

		secuencias gen MT anfibios.	del en	
--	--	-----------------------------------	-----------	--

ANEXO 2 IMPACTO AMBIENTAL

El estudio genético de la proteína hepática Metalotioneina en la especie *Eleutherodactylus johnstonei*, contribuiría a entender y estudiar el efecto de los metales pesados sobre el ambiente, sobre especies de flora, fauna y sobre el hombre. Principalmente generará nuevos horizontes en estudios donde se investiguen los niveles contaminación de estos metales, ya que la especie de estudio podrá utilizarse como bioindicador. También, conocer la secuencia de la proteína MT proporcionará información crítica acerca del polimorfismo, el cual, tras su análisis se deduciría, si su adquisición ocurrió como un evento para mejorar su función o por el contrario indicará que se trato de una delección y como respuesta hubo una disminución de la función de la MT en los organismos. Las alineaciones y estudios comparativos con las especies cercanas, darán indicios acerca de cuál fue el efecto evolutivo entre diferentes grupos taxonómicos o si por el contrario este gen es totalmente conservado entre las especies de estudios comparadas y se encuentra bajo selección natural.

El impacto ambiental que genera este proyecto, no cambia las dinámicas ecológicas de los ecosistemas, ya que la especie de estudio corresponde a una especie ampliamente distribuida en toda Colombia y corresponde a una especie de carácter invasor, es decir, que su presencia está generando el desplazamiento de las especies nativas. En el caso de los reactivos utilizados dentro del laboratorio, aquellos que tienen un grado de exposición tóxico; mientras se empleen en prácticas, se dispondrá de los elementos indispensables para la bioseguridad como son guantes, gafas, batas de laboratorio y el uso adecuado de los sistemas de desechos dentro de los laboratorios y ventilación.

ANEXO 3

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tiempo (Mes/Año)

	2012	2013	2013	2013	2013	2013	2013	2013	2013	2013	2013
Actividades	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Agost	Sept	Oct
Búsqueda bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Permisos	X	X	X	X	X	X	X	X			
Establecimiento del laboratorio	X	X	X	X	X	X	X				
Muestreo de ranas	X	X	X	X							
Diseño de primers	X										
Aislamiento del ARNm								X	X		
Transcripción reversa									X	X	
PCR y obtención de amplicones.									X	X	
Secuenciación											X
Bioinformática analítica de las secuencias obtenidas											X
Entrega del informe final											X

**ANEXO 4
PRESUPUESTO DEL PROYECTO**

	Presupuesto		\$ (Peso Colombiano)
Costos Operacionales	Costo unitario	Cantidad	Total
Reactivos	3800000	N.A.	3800000
Servicio de secuenciación	2000000	N.A.	2000000
Servicio de síntesis de primers	400000	N.A.	400000
Equipos	109000000	N.A.	109000000
Otros	300000	N.A.	300000
Subtotal	115500000	N.A.	115500000
Costos administrativos	Costo unitario	Cantidad	Total
Administración del proyecto	1155000	N.A.	1155000
Costo total			116655000

N.A.=No aplica por cálculo neto.

ANEXO 5 Aprobación DAGMA



ALCALDÍA DE
SANTIAGO DE CALI
DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO
DE GESTIÓN MEDIO AMBIENTE



2013413300190151

Al contestar por favor cite estos datos:
Radicado No.: 2013413300190151
Fecha: 09-07-2013
TRD: 4133.0.5.2.205.019015
Rad. Padre: 2013413300084362

Doctor
FRANCISCO JAVIER GONZALEZ A.
Coordinador de Gestión Ambiental y Administrador del Bioterio
Salud Ocupacional y Medio Ambiente
Universidad ICESI
Calle 18 No. 122 – 135
Tel: 555 23 34 Ext.: 8802 / 8960
Cali

Asunto: Respuesta a Radicado No.2013-41330-008436-2

En respuesta a su solicitud de evaluación de los siguientes seis (6) proyectos de investigación relacionados con el uso de la rana *Eleutherodactylus johntonei* (rana coqui). Titulados: 1- "Adaptación y establecimiento de un sistema de traducción para medir el curso temporal de sístoles ventriculares en Biomodelo de corazón de *Eleutherodactylus johntonei*". 2- "Estudio de la sensibilidad de fármacos antiarrítmicos en el potencial de Acción Monofásico (PAM) ventricular de *Eleutherodactylus johntonei*". 3- "Estudio de polimorfismo de la proteína hepática metalotioneína en muestras de *Eleutherodactylus johntonei*". 4- "Establecimiento de un sistema de órgano aislado para registro de acople presináptico y postsináptico, empleando nervio ciático y músculo sartorio de *Eleutherodactylus johntonei*". 5- "Evaluación de la presencia de alcaloides en la rana *Eleutherodactylus johntonei*". 6- "Morfología ovárica y desarrollo de los oocitos de *Eleutherodactylus johntonei*". Presentado por: Universidad ICESI – Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación – CIECUAE.

En cumplimiento de la normatividad, tener en la cuenta lo siguiente:

- Los especímenes de rana coqui (*Eleutherodactylus johntonei*) que serán usados en los proyectos de investigación, no hacen parte de la Fauna Silvestre Nativa. La rana coqui está considerada como especie invasora según el Artículo primero de la Resolución 0848 de 2008: "Por la cual se declaran unas especies introducidas irregularmente al país que pueden ser objeto de cría en ciclo cerrado y se adoptan otras disposiciones" y se listan las especies.
- El Artículo 8 de la Ley 165 de 1994 plantea en su literal h) "Impedirá que se introduzcan, controlará o erradicará las especies exóticas que amenazan a ecosistemas, hábitats o especies".
- En el Artículo 3: "Para efectos de adoptar medidas para la prevención, control y manejo de las especies introducidas exóticas, invasoras y trasplantadas presentes en el territorio nacional, listadas en el Artículo Primero, las corporaciones autónomas regionales autorizarán y/o adelantarán directamente las actividades que en cada caso se estimen pertinentes, tales como el otorgamiento de permisos de caza de control y

Edificio Fuente de Versalles Avenida 5A Norte N° 20N-08
Teléfono: 660-55-15 ext 114 / 660-02-08
www.cali.gov.co

Aprobación DAGMA



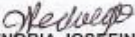
demás medidas manejo que resulten aplicables conforme a las disposiciones legales vigentes.

- Que en concepto técnico del 20 de junio de 2006, emitido por la Dirección de Ecosistemas de este Ministerio, se advierte lo siguiente:
 - o Las especies exóticas de carácter invasor son aquellas que han sido capaces de colonizar efectivamente un área en donde se ha interrumpido la barrera geográfica y se han propagado sin asistencia humana directa en hábitats naturales o semi-naturales y cuyo establecimiento y expansión amenaza los ecosistemas, hábitats o especies con daños económicos o ambientales.
- Se hace necesario que el equipo que recolecte los especímenes de la especie *Eleutherodactylus johnstonei* (rana coqui) que serán usadas para la investigación, entreguen reporte ante el DAGMA del número de especímenes y los lugares donde fueron recolectadas, con fines de llevar el registro respectivo.
- Revisar la Ficha del proyecto, ya que en él se plantea el número requerido de ranas por proyecto, donde existe una incoherencia. Proyecto 1: 28 ranas. – Proyecto 2 : 113 ranas. Y el Proyecto 3: 28 ranas. Para un total de 169 ranas. Y el proyecto presenta un total de 249 ranas. – Resolución No. 008430 de 1993 – Normas científicas, técnicas y administrativas para investigación en salud - : empleo de animales adquiridos legalmente - : Los animales seleccionados para la experimentación deben ser de una especie y calidad apropiada, y utilizar el mínimo número requerido para obtener resultados científicamente válidos.

Por lo demás, el proyecto involucra la utilización de una especie de fauna exótica – *Eleutherodactylus johnstonei* (rana coqui), la cual es considerada una especie invasora por poner en riesgo la fauna silvestre nativa. Si estos especímenes son recolectados para ser usados en proyectos de investigación, el beneficio no solo favorecerá a la fauna silvestre, sino a la sociedad. Por lo anterior y por contener un procedimiento experimental adecuado, son motivos suficientes para recibir la aprobación del DAGMA.

Quedamos a la espera de conocer los detalles sugeridos,

Atentamente,


SENOBIA JOSEFINA HIDALGO GARCÉS
Directora (E).

Copia a: Expediente.

Elaboró: Zool. Javier Cañas Ángel – Grupo de Fauna y Flora Silvestre
Aprobó: Ing. Mónica Patricia Londoño M. – Coordinadora (E) Área de Calidad Ambiental

Edificio Fuente de Versalles Avenida 5A Norte N° 20N-08
Teléfono: 660-55-15 ext 114 / 660-02-08
www.cali.gov.co



ANEXO 6. APROBACIÓN COMITÉ DE ETICA CIECUAE- UNIVERSIDAD ICESI



Santiago de Cali, Febrero 25 de 2013
CIECUAE-008/2013

Dr. Rafael Santiago Castaño, B.Sc, M.Sc., & Ph.D
Investigador principal - Universidad Icesi
Cali

Asunto: Aprobación de proyectos con ranas - *Eleutherodactylus johnstonei*

El día 8 de Febrero del presente año, los miembros del CIECUAE de la Universidad Icesi, se reunieron, revisaron y aprobaron los siguientes proyectos de investigación, dando cumplimiento a la Ley 84 de 1989 y a la resolución de Rectoría N° 847 (9 de julio de 2012):

- **Nombre del proyecto 1:** "Adaptación y establecimiento de un sistema de transducción para medir el curso temporal de sistoles ventriculares en Biomodelo de corazón de *Eleutherodactylus johnstonei*."
- **Nombre del proyecto 2:** "Estudio de la sensibilidad de fármacos antiarrítmicos en el Potencial de Acción Monofásico (PAM) ventricular de *Eleutherodactylus johnstonei*."
- **Nombre del proyecto 3:** "Estudio de polimorfismo de la proteína hepática metalotioneína en muestras de *Eleutherodactylus johnstonei*."

Nota: Los órganos, restos frescos y carcasas de las ranas sacrificadas en los proyectos 1 y 2 serán empleados en los proyectos 3, 4, 5 y 6 para optimizar el uso de estas ranas.

- **Nombre del proyecto 4:** "Establecimiento de un sistema de órgano aislado para registro de acople presináptico y postsináptico, empleando nervio ciático y músculo sartorio de *Eleutherodactylus johnstonei*."
- **Nombre del proyecto 5:** Evaluación de la presencia de alcaloides en la rana *Eleutherodactylus johnstonei*.
- **Nombre del proyecto 6:** Morfología ovárica y desarrollo de los oocitos de *Eleutherodactylus johnstonei*

Con esta aprobación, el investigador debe solicitar los permisos de uso de fauna silvestre antes las entidades de control ambiental, ya sea CVC, DAGMA y/o Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo sostenible.


La presente se firma, el día (25), mes (Febrero), del año (2013)

Cordialmente,

Gabriel Jaime Echeverri, M.D
Presidente -CIECUAE- Universidad Icesi


ANEXO 7

PANTALLAZO POE: Sacrificio y disección de *Eleutherodactylus johnstonei*.

<p>NOMBRE DE LA INSTITUCION</p> 	<p>TITULO PROCEDIMIENTO</p> <p style="text-align: center;">POE Sacrificio y disección de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> (Anura: <u>Eleutherodactylidae</u>)</p>	<p>Proceso:</p>
<p>UNIDAD</p> <p>Facultad de Ciencias de la salud</p> <p>Departamento de ciencias básicas medicas</p>		<p>Sub proceso:</p> <p>Laparotomía</p>
		<p>Procedimiento: 01</p>
		<p>Página: 1-3</p>
<p>OBJETO/PROPOSITO</p>	<p>Establecer una guía para ejecutar un procedimiento de disección con el fin de realizar reconocimiento y aislamiento de órganos reproductivos para estudios en histología y fisiología siguiendo los parámetros <u>bioéticos</u> establecidos.</p>	
<p>ALCANCE/CAMPO APLICACION</p>	<p>Materiales y reactivos a utilizar:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Equipo de disección: escalpelo, hojas de bisturí, Tijera, Pinza finas. 2. Congelador 3. Aguja mangonada 4. <u>Ringer</u> anfibio 50 % 5. Estereoscopio 6. Guantes látex 7. Tapa bocas 8. Formaldehido 3.7 % 9. Pipetas cuentagotas 10. Papel absorbente 11. Frasco lavador 	
<p>RESPONSABLES</p>		
<p>DEFINICIONES</p>		

ANEXO 8

PANTALLAZO POE: Captura y mantenimiento en cautiverio de *Eleutherodactylus johnstonei*.

	TITULO PROCEDIMIENTO POE Captura y mantenimiento en el laboratorio de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> (Anura: <u>Eleutherodactylidae</u>)	Proceso:
		Sub proceso: Cría en cautiverio
		Procedimiento:
		Página: 1-3
OBJETO/PROPOSITO	Establecer una guía para dar a conocer el procedimiento y las recomendaciones que se deben tener en cuenta para la captura en campo y cría en cautiverio de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> para que sea accesible como <u>biomodelo</u> para estudios en fisiología, biología molecular, etc.	
ALCANCE/CAMPO APLICACION	Materiales y reactivos a utilizar: <ol style="list-style-type: none"> 1. Frascos de plástico con hojarasca humedad en su interior y con tapa con ventilación (agujeros) para el momento de la captura. 2. Terrarios de vidrio de tamaño grande y ventilados 3. Sustrato para el terrario: arena o tierra. 4. Plantas para la percha y para mantener la humedad, preferiblemente de la familia <u>Bromeliaceae</u> y el género <u>Bromelia</u>. 5. Jama o red entomológica 6. Recipientes para el agua. 7. Rociador 	
RESPONSABLES		
DEFINICIONES	Esta especie es encontrada en gran cantidad en la vegetación ornamental de los viveros y jardines de la ciudad. Usualmente se pueden encontrar en reposo entre la vegetación, bajo troncos, materas, ladrillos, y rocas.	