

**DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE METALOTIONEINA EN LA ESPECIE INVASORA *HEMIDACTYLUS BROOKII*
(SQUAMATA: GEKKONIDAE) EN CALI**

Samuel Salinas Bubu

*Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.
correo electrónico: samuel.salinas@correounivalle.edu.co*

Rafael Santiago Castaño Valencia

*Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.
correo electrónico: santiago.castano@correounivalle.edu.co*

Fernando Castro Herrera

*Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.
correo electrónico: fernando.castro@correounivalle.edu.co*

RESUMEN

Los metales pesados son una problemática ambiental que va en aumento, y que afecta muchas poblaciones naturales. Este incremento se debe principalmente a actividades antropogénicas. Por lo tanto, es importante definir organismos bioindicadores y mecanismos que den información sobre la salud ambiental con relación a estos contaminantes. En este estudio se pretendió detectar secuencias de la proteína metalotioneina, la cual presenta capacidad de quelar metales y además se expresa en presencia de éstos, usando como modelo de estudio el gecko *Hemidactylus brookii* en la ciudad de Cali. Se realizó por medio de reacciones de RT-PCR usando como sustrato ARN total del tejido hepático de éstos, obteniéndose ADNc que se amplificó con reacción de PCR usando cebadores degenerados diseñados a partir de especies pertenecientes a la familia Gekkonidae. El amplicón de esta reacción se llevó al servicio de secuenciación, obteniéndose una secuencia de 187 pares de bases la cual codificaba para metalotioneina, y se analizó filogenéticamente alineándose con otras 14 secuencias de ARNm y ADNc reportadas en el banco de genes y literatura publicada, esta secuencia codificó un péptido de 62 aminoácidos con sus posiciones de quelación conservadas, con alta afinidad para metales, relacionándose filogenéticamente con organismos pertenecientes a la misma familia. Con esto se concluyó que la proteína detectada en esta especie está cumpliendo su función y que puede llegar a ser usada para estudios de contaminación por metales pesados al igual que el organismo, sin embargo, faltan estudios para comprobar la eficiencia de éste.

Palabras clave: Metales pesados, quelación, proteína, reptiles, alineamientos, análisis filogenético.

ABSTRACT

Heavy metals are environmental problem that is increasing and affecting many natural populations. This increase is primarily due to anthropogenic activities. Therefore it is important to define bioindicator organisms and mechanisms to provide information on environmental health in relation to these contaminants. In this study we tried to detect sequences of metallothionein protein, which has ability to chelate metals and is also expressed in the presence of these, using as the model for study the gecko *Hemidactylus brookii* in Cali city. Was carried out by RT-PCR reactions using total RNA as substrate from liver tissue, resulting cDNA was amplified with PCR reaction using degenerate primers designed from species from Gekkonidae family. The amplicons from this reaction was sent to sequencing service, obtaining a sequence of 187 bp which coded for metallothionein. Was analyzed phylogenetically aligning with other 14 cDNA and mRNA sequences reported in the gene bank and published literature, this sequence encoded a peptide of 62 amino acids with their positions retained chelation, with high affinity for metals, with phylogenetically related organisms from same family. Was concluded that the protein detected in this specie is fulfilling its function and can be used to study heavy metal contamination as well as the organism, however studies are needed to confirm the efficiency of the organism

Key words: Heavy metals, chelation, protein, reptiles, alignments, phylogenetic analysis.

INTRODUCCIÓN

Desde la revolución industrial (mitad de siglo XIX) se incrementaron las emisiones de metales pesados al ambiente, a través de una amplia gama de procesos y vías, por ejemplo, la industrialización, urbanización, minería, efluentes domésticos y a la combustión de derivados de petróleo (Jarup 2003), y continúa una constante emisión al ambiente de metales como Hg, Cd, Ni, Pb, Cu y Zn, aproximadamente entre 500.000 y 3,5 millones de toneladas métricas por año (Nriagu 1996). Son un contaminante del medio importante e interfieren en procesos ambientales, evolutivos, ecológicos y nutricionales (Nagajyoti *et al.* 2010). Afectando procesos fisiológicos como el crecimiento y la reproducción, desencadenando en la reducción de poblaciones (Hamza-Chaffai 2014).

Metales como el Fe, Zn, Cu, Mn y Mo, que son considerados esenciales, participan en funciones químicas y fisiológicas (Wintz *et al.* 2002). Metales como Ni, Pb, Hg, Cd y As son elementos altamente tóxicos (Nieboer & Richardson 1980), y compiten con metales esenciales y los desplazan de los sitios catalíticos en las proteínas y enzimas en las que los metales esenciales actúan como cofactores (Shaw 1990), los iones de metales pesados pueden confundirse con metales de la misma carga y radio iónico asociados a iones de metales esenciales y ser transportados de forma pasiva a través de la membrana celular (Gadd 1990). Sin embargo, los iones metálicos esenciales dentro de la célula pueden ser eliminados a través de bombas ATPasas, pero los iones metálicos no esenciales no lo hacen y se acumulan en las células enlazadas a proteínas o en vesículas (Dameron & Harrison 1998).

A pesar de la toxicidad de los metales pesados, casi todos los organismos como los vertebrados, invertebrados, plantas, microorganismos eucariotas y algunos procariotas han desarrollado mecanismos moleculares de protección contra presencia de metales pesados a concentraciones tóxicas subletales jugando un papel importante en la desintoxicación y secuestro de metales en algunos organismos, reduciendo sus efectos peligrosos (Cooper & Fortin 2010). Entre los mecanismos moleculares se ha reportado que los organismos inducen la síntesis de proteínas como metalotioneinas y prometalotioneinas como respuesta a estrés provocado por presencia de estos metales a concentraciones que inducen una respuesta “antitóxica” en los organismos (Carginale *et al.* 2002).

Este tipo de respuesta o mecanismos han sido bien documentados para levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y ratones (*Mus musculus*). En estos organismos se ha demostrado que los genes de la metalotioneina contienen numerosos elementos reguladores que in-

teraccionan con proteínas sensoras específicas para la presencia de iones de metales pesados. Las proteínas sensoras se unen a proteínas reguladoras específicas en el núcleo que a su vez se relacionan con el área promotora de metalotioneina y que induce a la síntesis de ARN mensajero para esta proteína (Seguin 1991, Dameron *et al.* 1991).

Para ratones se han descrito un número de secuencias que participan en la inducción de expresión con participaciones de Cd y Zn para genes de metalotioneina, estas secuencias son llamadas MRE y poseen propiedades *enhancer* (Westin & Schaffner 1998). En reptiles la metalotioneina se expresa en muchos tejidos y la expresión es inducida por exposición de Cadmio (Trinchella *et al.* 2006).

Ésta proteína fue descubierta por Magroshes y Valley en 1858 en el córtex renal de un caballo, es de bajo peso molecular (>10KDa) (Kojima *et al.* 1976), se expresa en todas las células, tiene la capacidad de enlazar de siete a ocho iones metálicos a través de enlaces de coordinación a por medio de residuos de cisteína (Winge *et al.* 1985). Se caracterizan por contener de 6 % a 11 % de metales y de 30 % a 35 % de cisteína según el peso molecular de la cadena polipeptídica, pero carecen de aminoácidos aromáticos e histidina, haciéndola un potente quelador de metales (Kojima *et al.* 1976, Kagi & Vallee 1960, Ribas 2004). Pero se conocen más de 10 isoformas de 7 KDa, que presentan cambios en la afinidad y el grado en que ésta es inducida cuando está expuesta a diferentes cationes orgánicos e inorgánicos (Nordberg & Kojima 1979, Hammer 1986, Robinson & Jackson 1986). En ratones se han caracterizado dos isoformas designadas como MT-I y MT-II que se han detectado en el hígado y el riñón (Polec *et al.* 2002). Mientras que en humanos se han detectado cuatro isoformas, la MT-1 y MT-2 se expresa en muchos tejidos, la MT-3 se conoce como un factor de inhibición del crecimiento (FGI) y la MT-4 se expresa predominantemente en tejido nervioso (Ribas 2004).

Aunque estas proteínas son de bajo peso molecular se codifican a través de genes múltiples con un gran número de alelos, presenta un dominio alfa y un beta que se enlazan a un número variable de elementos minerales, la posición de los 20 residuos de cisteína son altamente conservados, en la estructura de la molécula prevalecen los arreglos Cys-Cys y Cys-X-Cys (donde X es otro aminoácido), el orden de afinidad de iones metálicos a las proteínas es Cd>Zn, Cu, Ag, Hg>Bi>Pb (Hunziker & Kägi 1987). Su función también está relacionada con la regulación de la absorción de metales esenciales a la célula, actuando como donador y aceptor de iones metálicos dentro de procesos biosintéticos y procesos catabólicos (Brady 1982). En cuanto a la evolución de

las metalotioneinas en vertebrados es un aspecto que poco se conoce, sin embargo, se dice que se pueden haber desarrollado a través de eventos de duplicación y pérdida en las especies en eventos ancestrales antes de su especiación (Trinchela *et al.* 2012).

Las metalotioneinas han sido usadas exitosamente como biomarcadores de contaminación (Loubordis *et al.* 2007), debido a que su concentración incrementa después de la exposición a metales pesados, en peces (Cope *et al.* 1994), en *Rana ridibunda* se ha observado que la exposición a cadmio aumenta la concentración de metalotioneinas y que hay una relación directa entre estos dos factores (Loubordis *et al.* 2007), igual que en mamíferos (Henry *et al.* 1994). La presencia de esta proteína en hígado y riñón la ha convertido en biomarcador de exposición a elementos metálicos y principalmente de iones de metales pesados como Cd^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} (Falfushynska *et al.* 2008). En campo se ha demostrado que la metalotioneina es un buen bioindicador, mostrando variaciones estacionales en su expresión (Cooper & Fortin 2010). Además, otros estudios han demostrado la eficacia de la metalotioneina como bioindicador de contaminación por metales en varios ambientes.

Debido a que la contaminación aumenta, es necesario el desarrollo de técnicas que permitan el monitoreo del estado ambiental y medir el estado de salud de los organismos, para implementar de manera apropiada planes de manejo ambiental, aunque medir contaminantes directamente desde el ambiente presenta algunas desventajas, como las bajas concentraciones y la variación espacio temporal, si bien puede encontrarse en el ambiente altas concentraciones de contaminantes pero estos pueden no estar biodisponibles (Hamza-Chaffai 2014), además, no se indica el estado de salud de los organismos (Murray & Michael 1998). Por ello es necesario incluir en los estudios biomarcadores, que son parámetros medibles en diferentes niveles de organización biológica (molecular, celular o fisiológico) (Lagadic *et al.* 1997).

Los reptiles se han utilizado como biomodelos centinelas en estudios ecotoxicológicos (Schmidt 2003, Campbell & Campbell 2002), entre los reptiles, los lagartos se han situado como biomonitores de contaminación debido a distribución geográfica amplia, variedad de hábitats, longevidad, en muchos casos la territorialidad y fidelidad a un sitio (Lambert 2005). En este estudio se usó como biomodelo el lagarto *Hemidactylus brookii*. En primer lugar, su uso no implica el trabajo con especies nativas que están amenazadas o en riesgo, debido a que esta especie es introducida desde el continente africano (Kluge 1969, Castro-Herrera & Vargas-Salinas 2008). En segundo lugar, esta especie

ha mostrado predilección por ambientes urbanos y suburbanos y nunca se ha detectado en ambientes naturales (Caicedo-Portilla & Dulcey-Cala 2011). Tercero, las especies de este género están ampliamente distribuidas desde Asia, África y Suramérica, zonas áridas del norte de África y el suroccidente asiático, así como en la región Mediterránea (Carranza & Arnold 2006). Cuarto, esta especie no está incluida en apéndices CITES (*Convention International Trade Endangered Species*) ni está clasificada en ningún estado de amenaza del IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), por lo que la extracción de estos organismos posiblemente no implicaría consecuencias negativas en el ambiente.

No se conoce la variabilidad y la eficiencia de la proteína en la quelación de metales pesados en *Hemidactylus brookii*, pero para lograr esto primero hay que detectar la presencia de metalotioneinas, conocer sus secuencias primarias, detectar la expresión como respuesta a la presencia de metales e identificar la eficiencia funcional de la quelación de metales pesados por parte de estas proteínas. Para aportar en la identificación de modelos animales como bioindicadores de presencia de metales pesados, en este trabajo se propuso detectar la presencia de metalotioneinas mediante detección de secuencias parciales.

MÉTODOS

Este proyecto contó con aprobación del comité de ética de experimentación en animales de la Universidad Icesi CIECUAE (CIECUAE 008/2013). También contó con los permisos de la autoridad ambiental DAGMA (No.2015413300008292).

Se colectaron tres individuos adultos del lagarto introducido *Hemidactylus brookii*, desde las 07:00 horas a las 09:00 horas, sobre paredes externas de viviendas y edificios de la ciudad de Cali, ($3^{\circ}25'17,4''\text{N}$; $76^{\circ}32'56''\text{W}$). Fueron llevados a terrarios del laboratorio de ciencias biomédicas de la Universidad ICESI y se alimentaron por un tiempo máximo de 48 horas.

Inicialmente los materiales que se usaron en el aislamiento de los tejidos fueron esterilizados con una solución de Dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1 % y fueron sometidos a proceso de autoclave a 200°C . El agua utilizada para la disoluciones de ARN se trató con DEPC 0,1 % (v/v). Como método de eutanasia los individuos fueron dejados por 10 minutos a 4°C , con el fin de disminuir actividades metabólicas y producir parálisis, luego se procedió a descerebrarlos con un micropunzón a través del foramen magno y con esto asegurar pérdida de percepción y nocicepción

en el animal, el organismo con muerte cerebral fue mantenido visceralmente vivo (corazón e irrigación sanguínea funcionando) para mantener la estabilidad de las moléculas de ARN en hígado. Acto seguido se hizo extracción del hígado y se colocó en viales con 700 ul del buffer RNAlater (QIAGEN) a 4°C. El procedimiento desde la descerebración hasta la extracción del órgano duro un máximo de cuatro minutos.

A 30 mg del tejido hepático de los tres individuos dispuesto en RNAlater fué macerado en nitrógeno líquido. Haciendo uso del kit de extracción de ARN *RNeasy mini kit* (Quiagen # 74104) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez extraído el ARN total mediante el kit, el ARN fué precipitado empleando soluciones de cloruro de litio y etanol con centrifugación a 10.000 rpm por dos minutos a 4°C. Posteriormente el ARN total obtenido fue resuspendido en 30 ul en agua libre de RNAsas y tratada con DEPC. Para determinar la cantidad del ARN total obtenido, se tomaron 2 ul para estimar la concentración mediante absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro Nanodrop. Una alícuota de 2 ul fué utilizada para estimar la integridad del ARN total obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa con reactivo desnaturalizante para ARN (formaldehído 3%). La integridad se puede verificar con las bandas correspondientes al 18S y 28S del ARN ribosomal. Además, la integridad se verificó haciendo la electroforesis simultáneamente con muestras estables y conocidas de ARN total de otras especies con las que se había trabajado en el laboratorio como: El ratón (*Mus musculus*) y rana (*Eleutherodactylus johnstonei*). Todo el ARN total obtenido, fué almacenado en alícuotas a -80°C.

Debido a que no se conocen secuencias de metalotioneinas ni siquiera para el género *Hemidactylus*, se propuso hacer diseño de cebadores degenerados empleando las secuencias de metalotioneinas de los geckos *Paroedura masobe* (accesión AM087396) y *Phelsuma barbouri* (accesión AM087397) reportados en el NCBI. Acto seguido se realizó el diseño de cebadores degenerados para aislar la secuencia, para ello se usaron las secuencias de nucleótidos de metalotioneina de reptiles en el GENBANK del NCBI para especies de la familia Gekkonidae, se usaron secuencias de ARNm de dos gecónidos mencionados previamente, que fueron alineadas usando el programa MEGA 6.0 de Tamura *et al.* (2013) con el algoritmo *Muscle*, este alineamiento se llevó al programa PRIMA-CLADE de Gadberry *et al.* (2005), para el diseño de los cebadores, se escogieron los que incluían la totalidad o gran parte de la región codificante, con temperaturas de *melting* entre 55°C y 70°C, con una longitud de secuencia mayor a 18 bases, con un alto contenido %GC, para evaluar la eficiencia y especificidad de los cebadores se

realizó una búsqueda con la herramienta BLAST del NCBI observándose alta afinidad para metalotioneinas.

El ARN total se colocó a 45°C durante 45 minutos en agua libre de RNAsas, *Buffer Tfl AMV 5X*, la enzima transcriptasa inversa AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*) y el oligonucleótido *poly* (dT), luego de los 45 minutos se calentó la muestra a 94°C por 2 minutos para desnaturalizar la enzima AMV-RT, el ADNc generado se amplificó por PCR con la enzima de actividad polimerasa Taq (TAKARA BIO INC, # RRO2AG), y se optimizó con el *buffer 2x GC* y dNTPs diseñados para esta enzima, usando los cebadores diseñados (Tabla 1) combinados *Forward* y *Reverse* (MT1DgFor con MT1DgRev, MT1DgFor con MT2DgRev, MT2DgFor con MT2DgRev y MT2DgFor con MT1DgRev), solo fueron elegidos los cebadores que mostraron amplificación y que fueron verificados en geles de agarosa, cuya longitud se encontraba dentro del tamaño esperado. Los amplificados fueron extraídos de los geles y purificados con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega # A9281), y fueron enviados al servicio de secuenciación del Instituto de Tecnología de Georgia (*Georgia Tech*) por medio del método de Sanger en secuenciador multicapilar ABI 3130XL. El servicio incluyó ligación del amplicon en vector de clonación, selección de colonias y escogencia de colonias cuyo aislamiento de vectores, purificación e identificación de amplicones correspondía con la longitud esperada para la secuencia putativa objeto de estudio.

Para observar si la secuencia obtenida estaba filogenética más cercana a especies de la familia Gekkonidae y confirmar si se tenía una nueva secuencia, entonces se propuso tomar las secuencias de nucleótidos (ADNc o ARNm) correspondientes a metalotioneinas de reptiles reportadas en el trabajo de Trinchella *et al.* (2008), mas las secuencias de *Lachesis muta* e *Hypsiglena* sp., para un total de 14 especies de reptiles del orden Squamata, y éstas fueron alineadas con la nueva secuencia empleando la rutina *Muscle* en el programa MEGA 6.0, realizándose traducción de la secuencia y con el alineamiento se hizo un árbol filogenético para detectar la filialidad de la secuencia putativa obtenida por medio de una análisis de máxima verosimilitud, con una prueba de *Bootstrap* con 500 replicas.

RESULTADOS

La extracción hecha permitió obtener una concentración de 221,9 ng/ul para un total de 0,66 mg de ARN a una alta pureza (A260 nm/280 nm = 2,03). En la electroforesis con formaldehído (Fig. 1), se pudo verificar la integridad del ARN total obtenido dado que la mues-

tra presentó las dos bandas ribosomales características correspondientes a los ARNr 18S y 28S teniendo en

cuenta que constan de 1900 pb y 4900 pb respectivamente, muestra que se almacenó a -80°C .

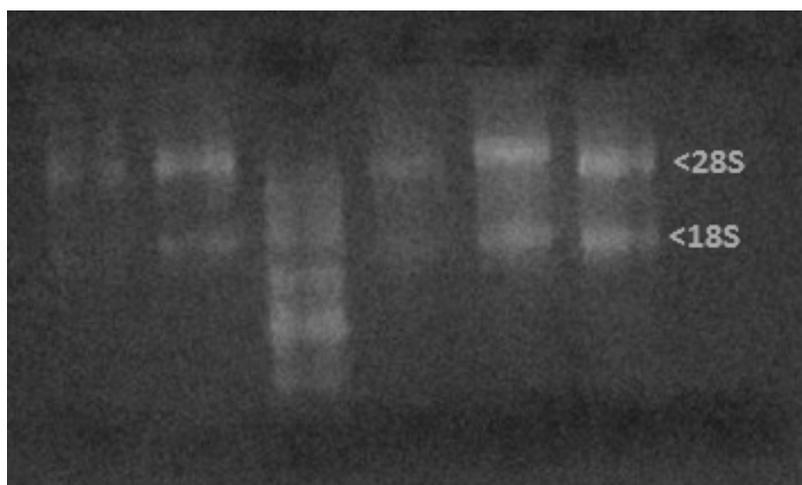


Figura 1. Electroforesis de ARN total purificado en gel de agarosa 1 %, con un marcador de peso de 500 pb en la tercera línea de corrida de Izquierda a derecha, las bandas corresponden a muestras de ARN total de hígado de *Mus musculus*, *Hemidactylus brookii*, marcador, *Eleutherodactylus johnstonei*, *Eleutherodactylus johnstonei*, *Mus musculus*.

El programa PRIMACLADE arrojó múltiples cebadores (*forward* y *reverse*) que presentaban máximo dos degeneraciones. Sin embargo, al seguir los criterios de selección y la búsqueda de los cebadores en BLAST (NCBI), se seleccionaron dos pares de cebadores (*forward* y *reverse*) (Tabla 1), con una alta similitud con afinidad para metalotioneinas de otros reptiles. Al

obtenerse el ADNc por RT-PCR se amplificó por PCR usando los cebadores diseñados, solo las combinaciones de cebadores MT1DgFor con MT1DgRev presentaron amplificación con una banda de aproximados 200 pares de bases, esta banda se extrajo para secuenciarse.

Tabla 1. Cebadores degenerados seleccionados con ayuda del programa PRIMACLADE. Star pos = posición en que hibrida el cebador en la secuencia codificadora. Las sustituciones para el diseño óptimo de los cebadores se da de la siguiente manera: R = A o G, M = A o C, Y = C o T, W = A o T.

Nombre	Secuencia 5'>3'	Tm °C	%GC	Start pos (*)
MT1DgFor	GATCCTCAGGACTGCCCMT	60,02	57,89	4
MT1DgRev	AGCTGCAACAGCTRCACCTTR	59,96	50,00	176
MT2DgFor	TACYGGTGGTWCTTGTAGCTG	60,18	52,38	27
MT2DgRev	ARCGGTGCATTTTTAGCTGC	60,27	45,00	186

```
GATCCTCAGGACTGCCCTGCGCTACCGGTGGTTCCTGTAGCTGTGCTGGTTCCTGCAA [ 60 ]
TGCAAAAATTGCAAGTGTACTTCTGCCAAAAAGCTGCTGTTCTGTTGCCAGCTGGC [ 120 ]
TGCACCAACTGTGCCAAGGGCTGTGTCTGCAAAAGACCACTGTGAACAAGTGCAGCTGT [ 180 ]
TGCAGCT [ 187 ]
```

Figura 2. Secuencia parcial nucleótidos de metalotioneina de *Hemidactylus brookii*.

La secuenciación arrojó como resultado un oligonucleótido de 187 pares de bases en el que no presentaba el codón de iniciación ni el de parada (Fig. 2), esta

secuencia se sometió a búsqueda con la herramienta Blast de NCBI, mostró alineamientos con secuencias que codifican para metalotioneina en diferentes espe-

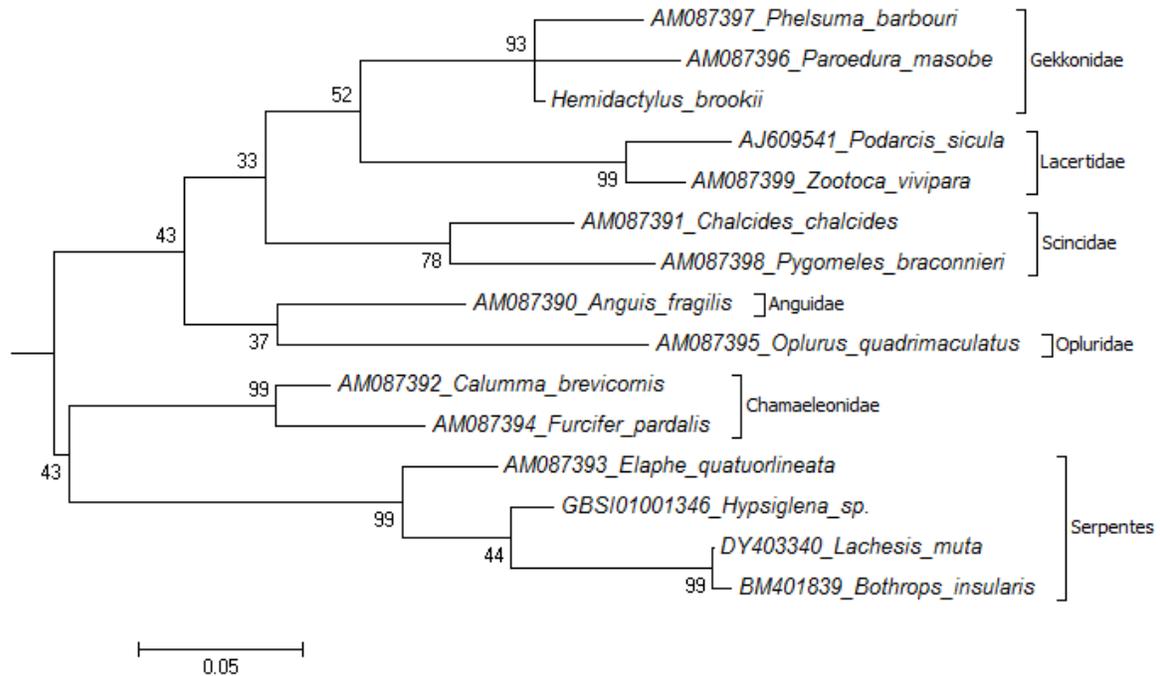


Figura 4. Análisis filogenético de secuencias de nucleótidos de metalotioneina por máxima verosimilitud (Tamura & Nei 1993), el árbol se muestra con un *log-likelihood* (-1136,6693), con los valores *bootstrap* por cada nodo y la escala de confianza del análisis filogenético. Todas las posiciones que contenían *gaps* y deleciones fueron eliminadas, el código de acceso del NCBI se encuentra antepuesto al nombre de la especie.

hayan corrido el codón de parada o de inicio. Sin embargo, en lo reportado de secuencias codificantes para metalotioneina en otros organismos (aves) se observa que la región exónica es altamente conservada (Shartz et al. 1993).

La secuencia de aminoácidos para metalotioneina de *Hemidactylus brookii* presenta como modificación notable la presencia de una Gln en la posición 31 similar a los otros dos geconidos (*Paroedura masobe* y *Phelsuma barbouri*), que en *Oplurus quadrifasciatus* y MT2 de aves presentan una Arg; en peces, anfibios y mamíferos presentan en esta posición una Lys (Trinchella et al. 2008). Se ha reportado que aminoácidos básicos adyacentes a los residuos Cys, disminuyen el valor pK, y por tanto la reactividad del residuo cisteínico (Parente et al. 1985), en este caso la pérdida de este residuo puede darle más reactividad al residuo Cys 30, dando más afinidad de la proteína hacia los metales. Esta proteína no presenta residuos aromáticos ni His tal como lo reporta Kojima et al. (1976), con los 20 residuos cisténicos altamente conservados en posiciones Cys-X-Cys o Cys-Cys, tal como ocurre en varias isoformas de vertebrados (Vasák & Meloni 2011). Al observarse entre los grupos hay modificaciones en la cadena primaria que al parecer son muy propias de cada uno, tal es el caso de las serpientes, se puede

observar que estos organismos tienen modificaciones específicas con respecto a otros, tal es el caso de la posición 17 con cambio de Ala por Asn o Asp, 53 de Glu por Asp, 56 de Ser por Leu y 63 con presencia de solo Pro, mientras que en algunos saurios hay presencia de His en la posición 63, que puede cambiar la afinidad hacia algunos metales, además que estos son los únicos vertebrados con presencia de este aminoácido en la estructura de la proteína con excepción de algunas aves (Trinchella et al. 2012).

Dentro del análisis filogenético es observable que la secuencia de metalotioneina de *Hemidactylus brookii* se relaciona filogenéticamente con secuencias de las otras especies de geckos, igual que las que corresponden a otras especies que se relacionan filogenéticamente con organismos del mismo grupo con altos valores de *bootstrap*. Sin embargo, se puede observar que hay formación de clados, tal como el que agrupa serpientes y camaleones o entre los demás grupos; según la hipótesis presentada por Trinchella et al. (2008), entre los reptiles Squamata se presentan genes parálogos y ha ocurrido más de un evento de duplicación, por lo cual en vertebrados los genes de metalotioneina no se agrupan de acuerdo su filogenia sino de acuerdo a la similitud de las secuencias (Trinchella et al. 2012). Es por eso que en peces, aves y mamíferos se conocen

más de una isoforma de metalotioneína las cuales varían de acuerdo a la estructura primaria y a la afinidad con ciertos metales (Serén *et al.* 2013).

De acuerdo a las propiedades que presenta esta proteína en su estructura ésta podría ser usada como biomarcador de contaminación por metales pesados haciendo estudios de expresión, sin embargo, se debe responder si en efectos prácticos esta proteína en este organismo es inducida a la expresión por metales, por ello se deberían hacer estudios de acumulación de metales y expresión de la misma para ver si hay alguna relación entre estas variables; o bien sea estudios que involucren exposición y respuesta de expresión.

Si bien, se pudo detectar esta secuencia de nucleótidos, pero no se conoce la variación intra específica de este gen, y se deben incluir análisis moleculares más ro-

bustos que impliquen una secuenciación completa de todos las posibles isoformas de las secuencias codificadoras de metalotioneína en esta especie. Aunque este trabajo presenta un avance en la investigación sobre metalotioneínas en los reptiles.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis directores por el apoyo brindado durante la investigación y mi carrera, al Dr. Rafael Santiago Castaño y al Dr. Fernando Castro Herrera. A mis amigos Carolina Saavedra y Carmenza Aguilar por la colaboración prestada durante la escritura del documento. Al laboratorio de Ciencias Bomédicas de la Universidad ICESI en especial a Flavio E. Ceron.

LITERATURA CITADA

- Caicedo-Portilla, R. and Dulcey-Cala, C.J. (2011), “Distribución del gecko introducido *Hemidactylus frenatus* (Dumeril & Bribon 1836) (Squamata: Gekkonidae) en Colombia”, *Biota Colombiana*, Vol. 12 No. 2, pp. 45-56.
- Campbell, K.R. and Campbell, T.S. (2002), “A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: a review of available data”, *Environmental Toxicology & Chemistry*, Vol. 21 No. 5, pp. 894-898.
- Carginale, V., Capasso, C., Scudiero, R. and Parisi, E. (2002), “Identification of cadmium-sensitive genes in the antarctic fish *Chionodraco hamatus* by messenger RNA differential display”, *Gene*, Vol. 299, pp. 117-124.
- Carranza, S. and Arnold, E.N. (2006), “Systematics, biogeography and evolution of *Hemidactylus* geckos (Reptilia: Gekkonidae) elucidated using mitochondrial DNA sequences”, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 38, pp. 531-545.
- Castro-Herrera, F. and Vargas-Salinas, F. (2008), “Anfibios y reptiles en el departamento del Valle del Cauca, Colombia”, *Biota Colombiana*, Vol. 9 No. 2, pp. 251-277.
- Cooper, S. and Fortin, C. (2010), “Metal and metallothionein content in bullfrogs: Study of a whole watershed impacted by agricultural activities”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 73, pp. 391-399.
- Dameron, C.T., Winge, D.R., George, G.N., Sansone, M. Hu, S. and Hamer, D. (1991), “A copper-thiolate polynuclear cluster in the ACE1 transcription factor”, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 88 No. 14, pp. 6127-6131.
- Dameron, C.T. and Harrison, M.D. (1998), “Mechanisms for protection against copper toxicity”, *American Journal of clinical nutrition*, Vol. 67, pp. 1091-1097.
- Falfushiyanska, H.I., Romanchuk, L.D. and Stolyar, O.B. (2008), “Seasonal and spatial comparison of metallothioneins in frogs *Rana ridibunda* from feral populations”, *Ecotoxicology*, Vol. 17, pp. 781-788.
- Gadberry, M.D., Malcomber, S.T., Doust, A.N. and Kellogg, E.A. (2005), “Primaclade-a flexible tool to find conserved PCR primers across multiple species”. *Bioinformatics*, Vol. 21 No. 7, pp. 1263-1264.
- Gadd, G.M. (1990) “Fungi and Yeasts for metal accumulation”, In Ehrlich, C.L. (Ed), *Microbial Mineral Recovery*. McGrawHill, New York, 249-276.
- Hammer, D.H. (1986), “Metallothionein”, *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 55, pp. 913-951.
- Hamza-Chaffai, A. (2014), “Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring”, *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, Vol. 3 No. 1, pp. 19-26.
- Hunziker, P. and Kagi J.H.R. (1987), “Human hepatic metallothioneins: resolution of six isoforms”, *Experientia Supplementum*, Vol. 52, pp. 257-264.
- Jarup, L. (2003), “Hazards of heavy metal contamination”, *Medical Bulletin*, Vol. 68, pp. 167-182.

- Kägi, J.H.R. and Valle, B.L. (1960), "Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 235, pp. 3460-3465.
- Kluge, A.G. (1969), "The evolution and geographical origin of the new world *hemidactylus mebouiabrookii* complex (Gekkonidae, Sauria)", *Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan*, No. 138, pp. 1-84.
- Kojima, Y., Berger, C., Vallee, B.L. and Kagi, J.H.R. (1976), "Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-IB", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 73, No. 10, pp. 3413-3417.
- Lagadic, L., Caquet, T. and Amiard, J.C., (1997), "Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions (introduction)", In Lagadic, L., Caquet, T. and Amiard, J.C. (Ed), *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*. Masson, Paris, 1-7.
- Lambert, M.R.K. (2005), "Lizards used as bioindicators to monitor pesticide contamination in sub-Saharan Africa: a review", *Applied Herpetology*, Vol. 2 No. 2, pp. 99-107.
- Linhart, C. and Shamir, R. 2002, "The degenerate primer design problem", *Bioinformatics*, Vol. 18 No. 1, pp. 172-180.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L., and Darnell, J. (2006), *Biologia celular y molecular*, 5ta ed., Medica Panamericana, Buenos Aires.
- Loumbourdis, N.S., Kostaropoulos, I., Theodoropoulou, B. and Kalmanti, D. (2007), "Heavy metal accumulation and metallothionein concentration in the frog *Rana ridibunda* after exposure to chromium or a mixture of chromium and cadmium". *Environmental Pollution*, Vol. 145, pp. 787-792.
- Murray, T.B. and Michael, H.D. (1998), "Determinant of trace metal concentrations in marine organisms", In Langston, B. and Bebianno, M.J. (Ed), *Metal metabolism in aquatic environments*. Chapman & Hall, London, 185-217.
- Nagajyoti, P.C., Lee K.D. and Sreekanth T.V.M. (2010). "Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review", *Environmental Chemistry Letters*. Vol. 8, pp. 199-216.
- Nieboer, E. and Richardson, D.H.S. (1980). "The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemistry significant classification of metal ions". *Environmental Pollution Series B*, Vol. 1, pp. 3-26.
- Nordberg, M. and Kojima, Y. (1979), "Metallothionein and other low molecular weight metal binding proteins. *Experientia Supplementum*, Vol. 34, pp. 41-121.
- Nriagu, J.O. (1996), "A History of Global Metal Pollution". *Science*, Vol. 272, pp. 223-224.
- Parente, A., Merrifield, B., Geraci, G., and D'Alessio, G. (1985), "Molecular basis of superreactivity of cysteine residues 31 and 32 of seminal ribonuclease", *Biochemistry*, Vol. 24, pp. 1098-1110.
- Polec, K., Perez-Calvo, M., Garcia-Arribas, O., Szpunar, J., Ribas, B. and Lobinski, R. (2002), "Investigation of metal complexes with metallothionein in rat tissues by hyphenated techniques", *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 88, pp. 197-206.
- Ribas, B. (2004) Metallothioneins, In Merian, M.E., Anke, M., Ichnat, M. and Stoeppel M. (Ed), *Elements and their compounds in the Environment*, Wiley-VCH, Germany. Vol. 1 No. 2, pp. 391-400.
- Robinson, N.J. and Jackson, P.J. (1986), "Metallothionein-like" metal complexes in angiosperms; their structure and function", *Physiologia Plantarum*, Vol. 67, No. 3, pp. 499-506.
- Schmidt, S.R. (2003), *Reptile cholinesterase characterization and use in monitoring anti-cholinesterases*. Thesis of graduation in environmental toxicology. Faculty of Texas Tech University, Lubbock.
- Seguin, C. A. (1991), "Nuclear factor requires Zn⁺² to bind a regulatory MRE element of the mouse gene encoding metallothionein-1", *Gene*, Vol.97, pp. 295-300.
- Seren, N., Glaberman, S., Carretero, M.A. and Chiari, Y. (2014), "Molecular Evolution and Functional Divergence of the Metallothionein Gene Family in Vertebrates", *Journal of Molecular Evolution*, Vol. 78 No. 3, pp. 217-233.
- Shartzler, K.L., Kage, K., Sobieski, R.J. and Andrews, G.K. (1993). "Evolution of avian metallothionein: DNA sequence analyses of the Turkey metallothionein gene and metallothionein cDNAs from pheasant and quail", *Journal of Molecular Evolution*, Vol. 36 No. 3, pp 255-262.
- Shaw, J.A. (1990). *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*, CRC Press Inc, United States Florida.
- Tamura, K. Nei, M. (1993), "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees", *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 10 No. 3, pp. 512-526.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013), "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 30, pp. 2725-2729.
- Trinchella, F., Riggio, M., Filosa, S., Volpe, M.G., Parisi, E. and Scudiero R. (2006), "Cadmium distribution and metallothionein expression in lizard tissues following acute and chronic cadmium intoxication", *Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 144, pp. 272-278.
- Trinchella, F., Riggio, R., Filosa S., Parisi, E. and Scudiero, R. (2008), "Molecular cloning and sequencing of metallothionein in squamates: New insights into the evolution of the metallothionein genes in vertebrates", *Gene*, Vol. 423, pp. 48-56.
- Trinchella, F., Esposito, M.G. and Scudiero, R. (2012), "Metallothionein primary structure in amphibians: Insights from comparative evolutionary analysis in vertebrates". *Comptes rendus Biologies*, Vol. 335, pp. 480-487.
- Vasák, M. and Meloni, G. (2011), "Chemistry and biology of mammalian metallothioneins", *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, Vol. 16, pp. 1067-1078.
- Westin, G. and Schaffner, W. (1988), "A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene", *EMBO Journal*, Vol. 7 No. 12, pp. 3763-3770.
- Winge, D.R., Nielson, K.B., Gray, W.R. and Hamer, D.H. (1985), "Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 260 No. 27, pp.14464-14470.
- Wintz, H., Fox, T. and C. (2002), "Responses of plants to iron, zinc and copper deficiencies". *Biochemical Society Transactions*, Vol. 30, pp. 766-768.