



**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

Análisis molecular *in silico* de la proteína Citocromo b en el género *Mytilus*.

TRABAJO PRÁCTICO

Previo a la obtención del título de:

Bióloga Marina

Autor:

Arly Stefany Bello Coello

Tutor:

Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.

La Libertad – Ecuador

2020

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**MAYRA MAGALI
CUENCA ZAMBRANO**

Blga. Mayra Cuenca Zambrano, Mgt.

Decana



Firmado electrónicamente por:
**JIMMY AGUSTIN
VILLON MORENO**

Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc.

Director



Firmado electrónicamente por:
**ISABEL JANETH
GALARZA TIPAN**

Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.

Docente Tutor



Firmado electrónicamente por:
**DOUGLAS
FRANKLIN VERA
IZURIETA**

Blgo. Douglas Vera Izurieta, M.Sc.

Docente de Área

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por la idea y resultados expuestos en el presente trabajo, me corresponden exclusivamente, así como el patrimonio intelectual de la misma a la Srta. Arly Stefany Bello Coello y a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



Srta. Arly Stefany Bello Coello

C.I. 2400065583

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis padres, Nelly y Giovanni, por darme el apoyo que necesité en cada momento para llegar este momento tan anhelado.

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena, Facultad ciencias del Mar, por brindarme docentes de calidad, adquiriendo de sus conocimientos durante mi formación académica.

A mis demás familiares y amigos por su apoyo incondicional.

A la Blga. Janeth Galarza por guiarme constantemente y aportarme sus conocimientos durante todo este proceso.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	2
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. OBJETIVOS	6
3.1. Objetivo General	6
3.2. Objetivos Específicos	6
4. MARCO TEÓRICO	7
4.1. Mytilus	7
4.2. Proteínas	7
4.3. Bioinformática en proteínas	7
4.3.1. National Center for Biotechnology Information (NCBI)	8
4.3.2. Swiss-Model	9
4.3.3. BioEdit	9
4.4. Modelamientos <i>in silico</i>	9
4.5. Citocromo b	10
4.6. Cascada de señalización celular	10
5. METODOLOGÍA	12
5.1. Trabajo bioinformático	12
5.1.1. Alineamientos de secuencia del % de similitud	12
5.1.2. Modelamiento <i>in silico</i> de la proteína Citocromo b utilizando Swiss-Model	12
5.1.3. Diseño de la activación de la proteína del Citocromo b	13
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	14
6.1. Secuencia de aminoácidos	14
6.1.1. Alineamientos de la secuencia	14
6.1.2. Comparación de la proteína de interés con 5 secuencias de códigos del GenBank y Análisis de variaciones aminoacídicas	15
6.2. Modelamiento <i>In silico</i> del Cytb: Swiss-Model	18
6.3. Activación del Citocromo b	21
7. CONCLUSIONES	27
8. BIBLIOGRAFÍA	29
9. ANEXOS	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Porcentaje de similitud de las secuencias seleccionadas del NCBI ..	15
Tabla 2: Localización de variaciones de aminoácidos en las secuencias que producen alineaciones significativas de la proteína Citocromo b	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Alineamiento de Secuencia de aminoácidos de la proteína Citocromo b	14
Fig. 2: Variabilidad dentro de la secuencia de aminoácidos	17
Fig. 3: Alineamiento de las 5 secuencias.....	18
Fig. 4: Estructura de la proteína del Cytb. A: Proteína en forma tubular. B: Observación del Cytb como proteína de superficie.	19
Fig. 5: Modelo de alineación con 55,08% de identidad en la secuencia de contraste.....	19
Fig. 6: Cascada de señalización del cytb. Fuente: La autora, 2020.....	24
Fig. 7: Cascada de señalización del Cytb. Modelamiento de proteína	25
Fig. 8: Estrés oxidativo por cambios de temperatura en la cadena transportadora de electrones.....	26
Fig. 9: página del NCBI.....	33
Fig. 10: Programa BioEdit. Alineación de secuencias.	33
Fig. 11: Swiss-Model. Modelamiento de la proteína en 3D.....	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1: Comparación con estructuras PBD.....	20
Gráfica 2: Estimación de calidad local.....	20

RESUMEN

Las proteínas tienen numerosas funciones dentro de los seres vivos, que ayudan a formar varias características estructurales, como el de la proteína del Cytb que forma parte de la cadena respiratoria en la mitocondria en todos los organismos eucariotas, así es el caso del género *Mytilus*. Las herramientas bioinformáticas como NCBI, Swiss-Model, BioEdit, ayudan a conocer las estructuras de organismos vivos mediante el análisis y procesamiento de datos, hoy en día existen proyectos denominados *in silico* cuya función es el modelado, simulación y visualización de una estructura. Para el estudio de la proteína del Cytb se la realizó mediante la obtención la secuencia de aminoácidos de la proteína en el NCBI además de alineaciones con otras secuencias de similitud realizadas en BioEdit, para la modelación proteica se utilizó el Swiss-Model. Por esta razón, esta investigación está dirigida al análisis de la acción de la proteína del Citocromo b en *Mytilus* y sus rutas metabólicas en la mitocondria a través de herramientas bioinformáticas. Citocromo b es una proteína secundaria, conformada de 435 aa, la comparación de las similitudes entre las secuencias mostró una conservación del 55,08% con la secuencia del PBD. La función principal es formar parte de la cadena transportadora de electrones, fosforilación oxidativa, precisamente dentro del complejo III junto con otros complejos, es decir, que las proteínas del Cytb tienen una función importante en el proceso de reparación celular y generación de energía, mientras que los programas bioinformáticos ayudan a la obtención de secuencias además de una modelación estructural, ya sea de nucleótidos, aminoácidos o proteínas.

Palabras claves: Proteína del Cytb, bioinformática, modelación *in silico*, Fosforilación oxidativa, ATP.

1. INTRODUCCIÓN

La comunidad científica que realiza investigación dentro del área biológica, en el afán de encontrar respuestas a estudios de la estructura molecular y las secuencias de ADN, día a día se enfrenta a mayores retos que implican el manejo de enormes volúmenes de datos que crecen de manera exponencial en tamaño y complejidad, debido a los avances tecnológicos que permiten hacer cálculos más precisos (González, Castillo, Angiolillo, Fernández, & Rojas, 2016). La complejidad que conlleva el manejo de grandes volúmenes de datos exige de procesos computacionales con alto nivel de desempeño en cuanto a espacio y tiempos de respuesta (Meneses, Rozo, & Franco, 2011). Afortunadamente, el desarrollo tecnológico como el desarrollo de software (bioinformática) ha permitido un avance significativo en las técnicas para el procesamiento y análisis inteligente de los datos, beneficiando los estudios científicos que permiten conocer mejor las estructuras de los organismos vivos (Meneses et al., 2011).

Actualmente, muchos proyectos denominados *in silico* se han llevado a cabo gracias a esta rama de la ciencia y es utilizada principalmente para hacer predicciones por medio de tres principales herramientas: el modelado, la simulación y la visualización. El modelado se lleva a cabo en un análisis *in silico* de la proteína citocromo b (Cytb) para la representación tridimensional de la estructura para su estudio (Velázquez, 2017).

El uso de herramientas computacionales tales como NCBI, BioEdit, Swiss-Model, entre otras, han permitido el acercamiento al entendimiento de varios procesos en diferentes áreas del conocimiento. Estas herramientas cada vez tienden a representar mediante simulaciones de alta eficiencia los procesos biológicos.

Las proteínas desempeñan un mayor número de funciones en las células de los seres vivos. Forman parte de la estructura básica de los tejidos y desempeñan funciones metabólicas, transporte de oxígeno, inactivación de sustancias tóxicas, entre otras. Además son los elementos que definen la identidad de cada ser vivo ya que son la base de la estructura del código genético (Iván, 2009). En la respiración celular interviene la mitocondria, un organelo celular característico

en animales que presenta una doble membrana. Está presente en el citoplasma de las células eucariotas, cuya función primordial en la mayoría de los tejidos es la de proveer energía en forma de ATP, a partir de la oxidación de sustratos energéticos por parte de la cadena respiratoria (Justo, 2005). La membrana externa está en contacto con el citoplasma y se encarga de controlar procesos de difusión, mientras que la membrana interna contiene una variedad de enzimas. En la cresta mitocondrial encontramos a los citocromos, que son generalmente hemoproteínas y son principalmente responsables de generar energía de ATP por la vía de transporte de electrones, se encuentran ya sea como proteínas monoméricas o como subunidades de grandes complejos enzimáticos que catalizan reacciones redox. (Mojica & Piza, 2013).

Según (Fields, Zuzow, & Tomanek, 2012) mencionan que los organismos del género *Mytilus* poseen la capacidad para adaptarse o aclimatarse a diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, la variación de temperatura afecta fuertemente a los procesos fisiológicos y la integridad de las estructuras moleculares, tal es el caso del complejo III dentro de la cadena transportadora de electrones.

Para obtener la secuencia de aminoácidos de la proteína del Citocromo b y las alineaciones con otras secuencias de similitud se utiliza la página "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) que forma parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos, así como la modelación de la proteína se utiliza la página del Swiss-Model; un servidor web de bioinformática estructural dedicado al moldeado por homología de estructuras de proteínas en 3D. Por esta razón, esta investigación está dirigida a analizar la acción de la proteína del Citocromo b en *Mytilus* y sus rutas metabólicas en la mitocondria a través de herramientas bioinformáticas.

2. JUSTIFICACIÓN

Los programas bioinformáticos son herramientas para el análisis de secuencias, búsqueda de bases de datos de moléculas de ARN, ADN, proteínas, alineamiento de secuencias, predicción de genes, regulación, ensamblaje de genomas y su comparación, es por ello que existen diversas bases de datos biológicas y herramientas gratuitas que permiten buscar, visualizar, editar y analizar secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

Existen varios estudios con la implementación de la bioinformática y su aplicación en proteogenómica; tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN, así como el modelamiento *in silico* de varias estructuras de proteínas multifuncionales, que ayuda a probar hipótesis a su vez ahorrando tiempo y costos. La importancia de la modelación *in silico* es la predicción de las estructuras, especialmente cuando se trata de proteínas, teniendo así, una información disponible suficiente para la construcción del modelo en tres dimensiones (3D).

Considerando la importancia biológica de todas las proteínas que merecen ser estudiadas a profundidad, en esta ocasión se seleccionó a la proteína del citocromo b, ya que es parte esencial dentro del conjunto de complejos que forma la cadena respiratoria; mismos que se ven afectados siempre y cuando existan variaciones físico-químicas en el medio que se encuentren los organismos, por ejemplo, los organismos marinos del grupo de los mitílidos cuando el agua contiene poco oxígeno disuelto, son capaces de agotarlo totalmente de su proceso respiratorio pero esto no quiere decir que sea suficiente para sus necesidades, al aumentar la concentración del oxígeno, el mejillón aumenta el volumen de su respiración hasta llegar a un máximo que a su vez dependerá de la temperatura del agua. Consecuentemente los complejos respiratorios se encuentran involucrados en el transporte de electrones y la generación de ATP y por lo tanto juegan un rol vital en las células.

Los mitílidos que experimentan estrés oxidativo por temperaturas bajas o frías entre 7 y 13° C puede causar reordenamientos en el metabolismo energético, es decir, una regulación a la baja de ubiquinol citocromo c reductasa o complejo III y al ATP sintasa. A las temperaturas de aclimatación alta o más cálida (20 ° C)

se muestra una regulación en el citocromo b de ubiquinol reductasa, además durante esta aclimatación se incluirá una abundancia creciente de chaperonas moleculares, lo que sugiere que esta temperatura está cerca de su límite térmico crónico.

En el presente trabajo se tomó a *Mytilus* como modelo de estudio dado que se encuentra distribuido a lo largo del Pacífico donde se experimentan fluctuaciones de temperaturas en el agua de mar. Además, esta información científica demuestra que la proteína del citocromo b se ve afectada frente a cambios ambientales. Por tal razón surge la necesidad de conocer la estructura molecular y funcionamiento de la proteína Cytb, a través del modelamiento *in silico* y haciendo uso de programas bioinformáticos, que entreguen información precisa.

Así también, el proyecto contribuye a los estudiantes de biología y biología marina a incrementar el conocimiento teórico y práctico en el área de bioinformática, que ha sido poco explotada a nivel de país, por lo cual este tipo de investigaciones impulsan a estudiantes y futuros investigadores e tener un campo más amplio y diverso en el cual poder ejercer la profesión de Biólogos Marinos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Analizar a nivel molecular la proteína Citocromo b en *Mytilus*, a través de herramientas bioinformáticas (NCBI, BioEdit, Swiss Model) para la obtención del modelamiento *in silico* y la representación gráfica del funcionamiento de la misma.

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar un análisis de similitud del Cytb, a través de alineamientos de secuencias registradas en el GenBank para conocer la variación de los aminoácidos.
- Obtener el modelamiento *in silico* de la proteína de interés mediante Swiss-Model para la visualización de su estructura.
- Diseñar la activación de la proteína de interés a través de ilustraciones para la demostración de su funcionalidad.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Mytilus

Una característica común de los mitílidos es su prolongada vida larval pelágica, lo que les otorga alta capacidad de dispersión y la posibilidad de propagarse tanto de forma natural como antropogénica (Toro, 2017).

4.2. Proteínas

Las proteínas son una clase importante de moléculas que se encuentran en todas las células vivas. Una proteína se compone de una o más cadenas largas de aminoácidos, cuya secuencia corresponde a la secuencia de ADN del gen que la codifica. Las proteínas desempeñan gran variedad de funciones en la célula, incluidas estructurales, mecánicas, bioquímicas, transporte y almacén (Citocromos), señalización celular, etc. (Martínez & Martínez, 2006).

4.3. Bioinformática en proteínas.

La bioinformática es un área emergente interdisciplinaria que se ocupa de la aplicación de la informática a la recopilación, almacenamiento, organización, análisis, manipulación, presentación y distribución de información relativa a los datos biológicos o médicos, tales como macromoléculas, por ejemplo ADN o proteínas (Coronado, 2013).

Las tareas más importantes de las que se ocupa la bioinformática consisten en entender las correlaciones, las estructuras y los patrones en los datos biológicos. Esto se debe a la disponibilidad de enormes cantidades de datos biológicos públicos y privados, y a la necesidad imperiosa de transformar datos en información biológica útil y en conocimiento. Esto implica el uso de tecnologías informáticas y métodos estadísticos para manejar y analizar un gran volumen de datos biológicos sobre el ADN, el ARN y las secuencias de proteínas, estructuras de las proteínas, los perfiles de expresión genética y las interacciones de la proteína. La Bioinformática se compone de dos subcampos complementarios entre sí: - El desarrollo de herramientas informáticas y bases de datos, y - La aplicación de estas en la generación de conocimientos biológicos para

comprender mejor los sistemas vivos. El desarrollo de herramientas incluye el software de grabación de secuencias, el análisis estructural y funcional de estas, así como la construcción y la conservación de bases de datos biológicas. El análisis de los datos biológicos a menudo genera nuevos problemas y desafíos que a su vez estimulan el desarrollo de mejores herramientas computacionales (Meneses et al., 2011).

La Proteómica se define como el conjunto de técnicas o tecnologías utilizadas para la obtención de información funcional de las proteínas, y tiene por objetivo el análisis, identificación y caracterización del proteoma celular. El proteoma es entendido como el conjunto total de proteínas expresadas por los genes de una célula, tejido u organismo. Sin embargo, mientras que el genoma es básicamente el mismo en todas las células de un organismo, el proteoma es mucho más variable, siendo diferente en los distintos tipos celulares. Además, la cantidad de material genético en la célula no tiene por qué correlacionar con el rango de concentración de la proteína (Franch, 2019).

Para este estudio se seleccionaron varios programas y páginas tales como:

4.3.1. National Center for Biotechnology Information (NCBI)

National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), es una división de la National Library of Medicine, uno de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos. Como recurso nacional de información sobre biología molecular y uno de los más poderosos en las llamadas ciencias de la vida en general, el centro desarrolla constantemente nuevas tecnologías de información para ayudar a comprender, tanto los procesos genéticos, como moleculares. El NCBI agrupa sus bases de datos esenciales en tres grandes sectores: Literature Databases, Molecular Databases y Genomes. Estas dos últimas clases comprenden un grupo amplio y diverso de bases de datos biológicas cuya información procede básicamente de los resultados de experimentos científicos, suministrados directamente por los laboratorios o instituciones que los realizan o publicados en la literatura científica especializada, donde con frecuencia se aplican tecnologías de experimentación de muy alto rendimiento y el análisis computacional. La información contenida en estas bases de datos comprende: funciones, estructura y localización (tanto celular como cromosómica) de los genes, los efectos de las mutaciones, así

como las similitudes entre secuencias y estructuras biológicas (Cañedo, Rodríguez, & Vázquez, 2009) .

4.3.2. Swiss-Model

SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) fue el primer servidor de modelado de homología de proteínas totalmente automatizado y se ha mejorado continuamente durante los últimos 25-30 años. Su funcionalidad de modelado se ha ampliado recientemente para incluir el modelado de complejos homo y heteroméricos, dadas las secuencias de aminoácidos de los socios que interactúan como punto de partida. Es uno de los servidores de modelado de estructuras más utilizados en todo el mundo, su rendimiento se evalúa continuamente y se compara con otros servidores de última generación en el campo (Waterhouse et al., 2018).

4.3.3. BioEdit

BioEdit es un programa gratuito para edición de alineamientos y análisis de secuencias que funciona únicamente sobre ambiente MS/Windows. Es, sin lugar a duda, uno de los programas más conocidos para edición de secuencias para dicho sistema operativo. BioEdit cuenta con varias herramientas que van desde la creación de alineamientos hasta la anotación de plásmidos. El alineamiento de secuencias consiste en la comparación de secuencias homologas para localizar las inserciones, deleciones o cambios puntuales en los nucleótidos que se hayan podido producir en el proceso de divergencia desde el ancestro común (Juárez, n.d.).

4.4. Modelamiento *in silico*

El modelamiento *in silico* es una forma de recreación de estructuras complejas por medio de las computadoras haciendo alusión a la estructura interna del computador que está hecho en un 90% de sílice, cuando se habla de esto, se entiende que todo el proceso de simulación experimental ha ocurrido dentro del ordenador y no comparte ninguna de sus características físicas con el proceso original del cual fue creado (Scior, Martínez, & Salinas, 2007). Además, los diseños *in silico* pueden ser herramientas amigables que permiten manipular muchas variables en la secuencia de ADN, proteínas y así planificar experimentos, probar hipótesis y evaluar resultados, optimizando tiempo y costos (Pillacela, Galarza, & Tufiño, 2020).

4.5. Citocromo b

Los citocromos son generalmente hemoproteínas unidas por membranas que contiene grupos hemo y son principalmente responsables de generar energía de ATP por la vía de transporte de electrones, se encuentran ya sea como proteínas monoméricas o como subunidades de grandes complejos enzimáticos que catalizan reacciones redox. Los citocromos son capaces de realizar la oxidación y la reducción.

Debido a que los citocromos se mantienen dentro de la membrana mitocondrial de una manera organizada, las reacciones de óxido-reducción se llevan a cabo en la secuencia adecuada para una máxima eficiencia. En el proceso de la fosforilación oxidativa, que es el principal proceso de generación de energía realizado por organismos, otro unido a la membrana y solubles en complejos y cofactores están involucrados en la cadena de reacciones redox, con el efecto neto adicional de que los protones se transportan a través de la membrana interna mitocondrial. El gradiente de protones transmembrana resultante se usa para generar ATP (Mojica & Piza, 2013).

El citocromo b es la subunidad catalítica dentro del complejo III, encargada de la transferencia de electrones desde la coenzima Q para el citocromo c en la cadena respiratoria mitocondrial por translocación de protones a través de la membrana interna de la mitocondria. La transferencia de electrones a continuación, contribuye a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial que se utiliza entonces para la síntesis de ATP (Degli et al., 1993).

4.6. Cascada de señalización celular

Según Giraldo, Parra, & Rojas (2006) mencionan que la comunicación celular o señalización celular es el proceso en el cual las células intercambian mensajes químicos que modulan el funcionamiento intracelular y dan lugar a respuestas específicas dentro de un organismo.

Existen variedad de estudios sobre las cascadas de señalización; explicando la funcionalidad de diversas estructuras tales como, proteínas, enzimas, hormonas, etc., por ejemplo, Interacción de las vías de señalización intracelulares

participantes en la proliferación celular, potencial blanco de intervencionismo terapéutico (Valdespino-Gómez, Valdespino-Castillo, & Valdespino-Castillo, 2015); cascada de señalización de una hormona polipeptídica como lo es la insulina (Bonilla, 2014); proteínas cinasas dependientes de Ca^{+} : características y activación (Flores, Raya, & Torres, 2005), entre otros.

Sin embargo, Pérez (2019), cita a manera general que, de las aproximadamente 85 proteínas que constituyen la cadena respiratoria, únicamente 13 están codificadas por el ADNmt. Siete de estas trece proteínas son componentes del complejo I o NADH: ubiquinona óxido-reductasa; una de ellas, citocromo b, es un componente del complejo III o ubiquinol: citocromo c óxido-reductasa; tres forman parte del complejo IV o citocromo c oxidasa, y dos de la ATP sintetasa del complejo V.

5. METODOLOGÍA

5.1. Trabajo bioinformático

5.1.1. Alineamientos de secuencia del % de similitud

Para obtener la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés de *Mytilus* se la descargó desde la página del National Center for Biotechnology Information NCBI, la secuencia patrón correspondiente al código de Adhesión ANH09333.1, donde un alineamiento doble se realizó en secuencias de similitud mediante el BLAST concerniente a una proteína.

Posteriormente se descargó seis secuencias de la proteína citocromo b, que tenían un tamaño igual o cercanamente igual a la secuencia patrón, estas fueron descargadas en formato FASTA al programa BioEdit donde se realizó un alineamiento múltiple mismo que sirve para la visualización de las variaciones y las conservaciones de las cadenas de aminoácidos. El proceso más fundamental en este tipo de comparación es la alineación de secuencias. Este es el proceso por el cual, se comparan las secuencias mediante la búsqueda de patrones de caracteres comunes. El alineamiento de pares de secuencias es fundamental en la búsqueda de similitudes dentro de la base de datos y el alineamiento de secuencias múltiples (Meneses et al., 2011).

5.1.2. Modelamiento *in silico* de la proteína Citocromo b utilizando Swiss-Model

Se ingresa la secuencia patrón de la proteína de interés al servidor web de bioinformática estructural Swiss-Model para obtener el modelo *in silico*, junto con la comparación de una cadena de PBD.

La construcción del modelo de homología se realiza mediante la identificación de la plantilla estructural, la alineación de la secuencia patrón y la secuencia objetivo (PBD) de la plantilla, además se evalúa la calidad del modelo. Dentro de la plantilla obtenida se puede observar unas gráficas correspondientes a una comparación de estructuras de PBD y una estimación local de calidad.

Este método es fundamental para la construcción de estructuras terciarias por homología, las estructuras de referencia propuestas por el programa Swiss-

model en donde deberán tener un mínimo de 30% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la proteína. La herramienta construyó la estructura base en tres dimensiones siguiendo parámetros de similitud (Ballesteros & Parra, 2018).

5.1.3. Diseño de la activación de la proteína del Citocromo b

El diseño se fundamentó principalmente en una revisión bibliográfica detallada del funcionamiento de la proteína de interés dentro de *Mytilus*.

Para la visualización de la activación de la proteína dentro de la mitocondria se utilizó ExPaSy, un servidor de biología molecular que provee acceso a información en proteómica a través de un conjunto de herramientas de análisis y base de datos, es decir que analiza secuencias y estructuras de proteínas (Altamirano, Balderrama, Hoogland, Gasteiger, & Hochstrasser, 2002).

Una vez obtenida la información necesaria, mediante ilustraciones se procedió a ordenar y simular el proceso de cómo actúa Citocromo b en la membrana interna de la mitocondria.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1. Secuencia de aminoácidos.

Se seleccionó al género *Mytilus* con la proteína correspondiente al Cytb (Citocromo b) en la plataforma digital NCBI, misma donde se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Mytilus – 435 aminoácidos.

N - mvgnntaynt napksvgpwr stnklvkimn dsfydlpcpv nlnawwsfgs mlgiclvliq
lsglllsahy tahedmafds vvhimrnvek gwmlrnihan gssmfficiy ahiarglyyg syldktvwyf
gvhlflitma eaflygtlpw gqmsywgatv itnmlsvipv vgesmlryvw ggwtvcnatl krftytlhfl
pfvmvavvfl hlfflhekgs nnpLgsesgt mcvpfpfyt ikdlfgyvcf sffmylvcv dpellgnhln
ywpanpmktp ihvqpewyfm fayailrsip hkaggvyvmf lsivvlylip tlhtgkyrsl cfyplnqvfv
wvlvgsfisl twigarpvre pyiilgqcls viyfsslln plslwvwdkl leypkfcvsr pvdllkwkfl
ayfkllklvn rensarewan kcksm – **C**

6.1.1. Alineamientos de la secuencia.

Seleccionando la secuencia de la proteína de interés se procedió a correr el BLAST, demostrando así la similitud con organismos afines o que comparten características de la secuencia (Fig. 1).

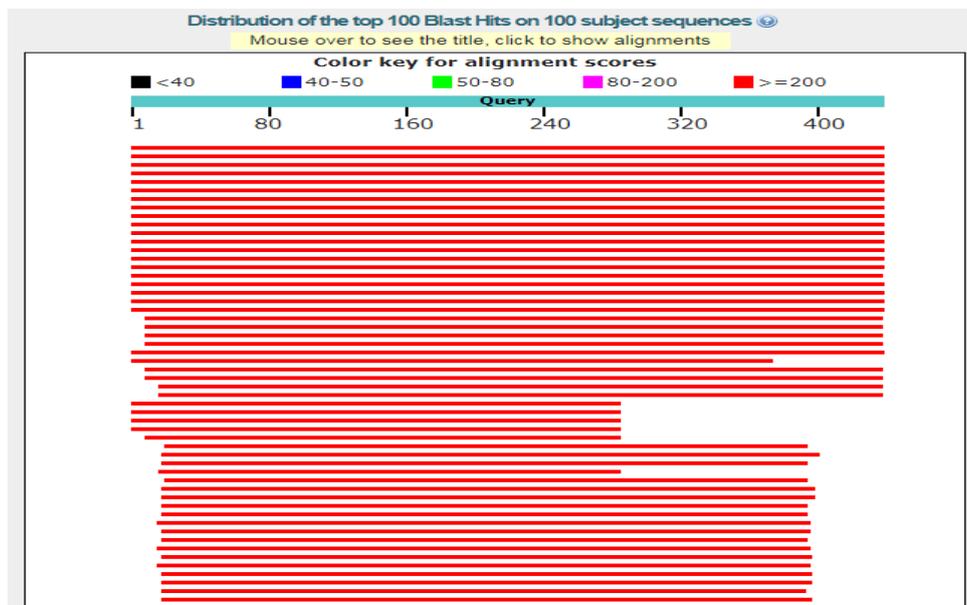


Fig. 1: Alineamiento de Secuencia de aminoácidos de la proteína Citocromo b

Fuente: NCBI

El alineamiento de secuencia fue contrarrestado con la base de datos propuesta, considerando la secuencia All78599.1 con un 99,77% de similitud, AMA20495.1 (99.31%), ABD37941.1 (99.54%), AAV68416.1 (86.85%) y AFR45255.1 (79.90%) respectivamente (Tabla 1)

Tabla 1: Porcentaje de similitud de cinco secuencias seleccionadas del NCBI

Descripción	Máximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	E. valor	Per. Ident	Acceso
citocromo b [<i>Mytilus trossulus</i>]	890	890	100%	0.0	99,77%	All78599.1
citocromo b [<i>Mytilus chilensis</i>]	887	887	100%	0.0	99.31%	AMA20495.1
citocromo b [<i>Mytilus galloprovincialis</i>]	885	885	100%	0.0	99.54%	ABD37941.1
citocromo b [<i>Mytilus edulis</i>]	732	732	97%	0.0	86.85%	AAV68416.1
citocromo b [<i>Mytilus californianus</i>]	705	705	96%	0.0	79.90%	AFR45255.1

Fuente: La autora, 2020.

6.1.2. Comparación de la proteína de interés con 5 secuencias de códigos del GenBank y Análisis de variaciones aminoacídicas

Para realizar el análisis de las variaciones de los aminoácidos se seleccionaron cinco trabajos de investigación en la página de NCBI, de la especie *M. trossulus*; *M. chilensis*; *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. californianus* con un porcentaje de similitud de 99.77; 99.31; 99.54; 86,85 y 79,90 % respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2: Localización de variaciones de aminoácidos en las secuencias que producen alineaciones significativas de la proteína Citocromo b

Variación	Mitogenómica de genomas mitocondriales recombinantes del mar Báltico Mejillones <i>Mytilus trossulus</i> 99,77%
Delección/sustitución	2
Variación	Genoma mitocondrial femenino completo de <i>Mytilus chilensis</i> 99,31%
Delección/sustitución	7
+/sustitución	22
Variación	Un genoma mitocondrial con una ruta de transmisión inversa en el Mejillón mediterráneo <i>Mytilus galloprovincialis</i> 99,54%
Delección/sustitución	229, 368
Variación	Análisis comparativo de mitocondrial completo asociado al género genomas en mejillones marinos (<i>Mytilus spp.</i>) 86.85%
Delección/sustitución	12, 15, 16, 17, 18, 55, 68, 75, 97, 114, 207, 229, 230, 241, 253, 276, 335, 345, 347, 360, 363, 364, 368, 382, 386, 396, 397, 407, 409, 411, 412, 420, 421, 424, 425, 433.
+/sustitución	28, 31, 40, 61, 123, 129, 188, 210, 227, 241, 321, 324, 338, 355, 391, 395, 419, 422, 427, 430.
Variación	Divergencia de secuencia extensa entre tipo F y tipo M Proteína mitocondrial, ARN de transferencia y genes de ARN ribosomal en el Mejillón <i>Mytilus californianus</i> 79,90%
Delección/sustitución	21, 68, 73, 75, 119, 135, 173, 174, 207, 209, 229, 251, 253, 261, 268, 304,307, 308,318, 321, 327, 331, 342, 355, 364, 368, 369, 370,372, 376, 389, 392, 396, 397, 398, 400, 401, 408,412, 414,418,420,424,426,427,430, 432.

+/sustitución	61, 82, 87, 89, 107, 129, 205, 230, 241, 264, 311, 312, 319, 326, 335, 338, 339, 344, 346, 349, 377,382, 386,390, 391, 395, 402,404, 407, 411,429, 433,434.
---------------	---

Fuente: La autora, 2020.

Como se ha podido observar, mediante el programa bioinformático BioEdit (Fig. 3), al explorar la secuencia, existen diferencias en el número de aminoácidos de secuencia para *Mytilus* en diferentes especies (*M. trossulus*, *M. californianus*, *M. galloprovincialis*, *M. chilensis* y *Mytilus edulis*). Esto se debe, principalmente, a las variaciones que han sufrido el organismo a lo largo de los años. Las secuencias de aminoácidos comparadas dieron a conocer que en algunas partes de la cadena existen diferencias de aminoácidos. Estas diferencias se basan en la eliminación de un aminoácido seguido con una sustitución de otro en las diferentes secuencias. Así, como la aparición de una simbología (+), cuya localización hace referencia a que se ha producido la sustitución de un aminoácido por otro pero que cumple una función similar y por tanto forma parte de una región importante de la proteína. Dando a entender que puede ser que se trate de genes ortólogos, que pertenecen a especies que han evolucionado a partir de un antepasado común y sus proteínas han cambiado, pero manteniendo una parte de la estructura fija para realizar una determinada función.

```

Query 9   NTNAPKSVGPNRSTNKLVKIMNDSFYDLPCPVNLNAWWSFGSMLGLCLVIQLISGLLLSA 68
          N N PK  WRSTNKLVK+MNDSFYDLPCPVNLNAWWSFGSMLGL LVIQL+SGLLLS
Sbjct 10  NINLPKKGVTWRSTNKLVKVMNDSFYDLPCPVNLNAWWSFGSMLGLSLVIQLISGLLLSI 69

```

Fig. 2: Variabilidad dentro de la secuencia de aminoácidos

Fuente: NCBI

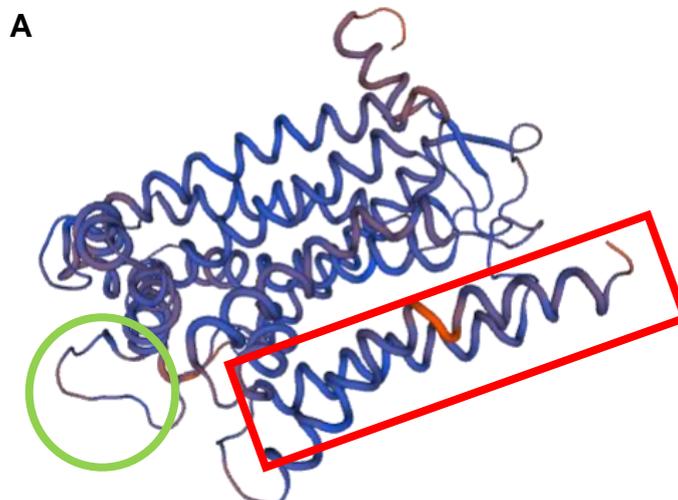


Fig. 3: Alineamiento de las 5 secuencias.

Fuente: BioEdit.

6.2. Modelamiento *In silico* del Cytb: Swiss-Model

El citocromo b, también conocido como complejo bc1 es una proteína de una estructura secundaria, es decir que la mayoría de estas proteínas presentan segmentos de sus cadenas peptídicas enrolladas o plegadas repetidamente en patrones que contribuyen a la conformación global de la proteína, además de hélices α (rojo)conectándose entre sí mediante los giros- β (bucle)(verde)(Fig. 4:A).



B

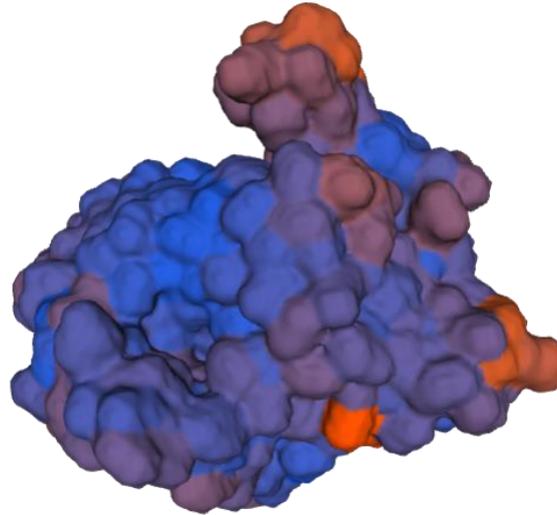


Fig. 4: Estructura de la proteína del Cytb. A: Proteína en forma tubular. B: Observación del Cytb como proteína de superficie.

Fuente: Swiss-model.

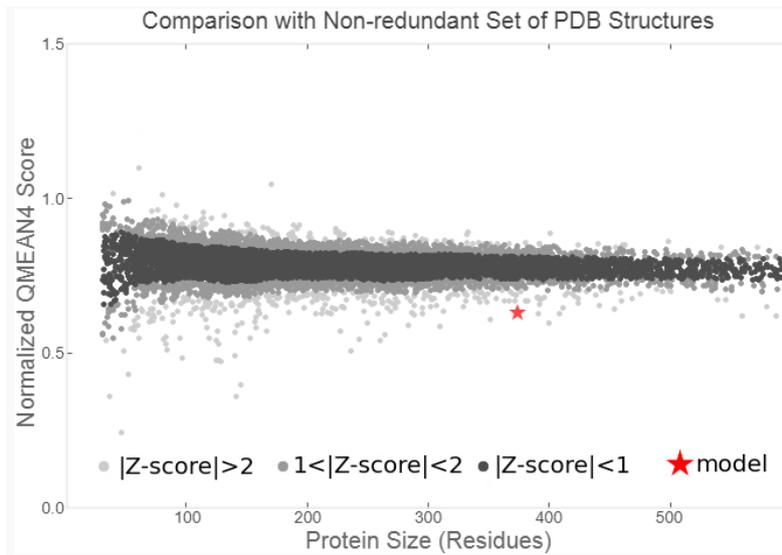
Las similitudes entre las regiones o secuencias evidenciaron la conservación estructural y funcional, de esta forma el análisis comparativo con el modelo primario establece una conservación aminoacídica del 55,08% con la secuencia que establece el programa (PBD) Swiss-model, sin perder la funcionalidad. (Fig. 5)

Model-Template Alignment		
Model_01	MVGNNIAYNTNAPKSVGPEWRSTNKLVKIMNDSFYDLPCPVNLNAAWWSFGSMLGCLVLIQLLSGLLLSAHY	70
6haw.1.C	-----RKSHPLMKIVNNAFIDLPAASNISSWWAFGSLLGICLILQILTGLFLAMHY	54
Model_01	TAHEDMAFDSVVMHMRNVEKGMRLRNHANGSSMFFICYAHIARGLYYGSYLDRTVWYFGVHLFLLTMA	140
6haw.1.C	TSDDTTIAFSSVTHICRLVNYGNLIRYMHANGASMEFFICYMHVGRGLYYGSYTFLETWNIQVILLTVMMA	124
Model_01	EAF LGYTL PWGQMSYWGATVITNMLSVIPWGESMLRYVWGGWTVCNATLKR FYTLHFLLPFVMVA VVFL	210
6haw.1.C	IAFMGYVLPWGQMSFWGATVITNLLSAIPYIGINLVEWVWGGFSVDRATLIRFFAFHFILPFDIMAIAMV	194
Model_01	HLFFLHEKGSNNPLGIESGTMCVPFHPFYTIKDLFGYVCF SFFFMYLVCVDPPELLGNHLYWPANPMKTP	280
6haw.1.C	HLLFLHETGSNNPTGISSDVDKIPFHPFYTIKDIILGALLLILALMLLVLFAPDLLGDDPNYTPANPLNTP	264
Model_01	IHVQPEWYFMFAYAILRSIPHKAGGVVVMFLSIWVLYLIPTLHTGKYRSLCFYPLNQVFWVWLVGSPISL	350
6haw.1.C	PHIKPEWYFLFAYAILRSIPNKLGGVLALAFSILILALIPLLHTSKORSMMFRPLSQCLFWALVADLLTL	334
Model_01	TWIGARPVREPYIILGQCLSVIYFSSLL-LNPLSLWVWDKLEYPKFCVSRPVDLKWFKFLAYFKLLKLV	419
6haw.1.C	TWIGGQFVEHPYITIGQLASVLYFLLILVLPNTAGTIENKLLK-----	378
Model_01	NRENSAREWANKCSKM	435
6haw.1.C	-----	

Fig. 5: Modelo de alineación con 55,08% de identidad en la secuencia de contraste.

Fuente: Swiss-Model

En esta sección, los resultados obtenidos muestran estructuras similares, pero que no presentan homología secuencial pero si similitudes en la estructura de la cadena peptídica. Es decir, que Citocromo b, carece de ciertas estructuras secundarias regulares y existe poca homología secuencial con la estructura de comparación denotada en valores >2 . Esto debe atribuirse a que el Cytb forma parte del complejo III de la cadena transportadora de electrones (Gráfica. 1-2)



Gráfica 1: Comparación con estructuras PBD



Gráfica 2: Estimación de calidad local

6.3. Activación del Citocromo b

La cadena de transporte de electrones está ubicada en la membrana interna de la mitocondria que está conformada por complejos respiratorios (I, II, III, IV y V o ATP sintasa) adicional de dos transportadores de electrones móviles (Coenzima Q o Ubiquinona y Citocromo c). Su función principal es transportar protones y electrones, para producir energía en forma de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. El transporte de electrones genera energía que es utilizada para transportar protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana situado entre las membranas mitocondriales externa e interna. Este proceso genera un gradiente electroquímico de protones, que es utilizado por el complejo V para generar ATP a medida que los protones fluyen de nuevo desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial. (Pérez, 2019).

Cadena transportadora de electrones. Fosforilación oxidativa

La mitocondria es el mayor generador de energía dentro de las células animales. Este proceso ocurre durante la fosforilación oxidativa, el cual es un proceso donde los electrones pasan a través de una serie de moléculas transportadoras de electrones dispuestas en complejos enzimáticos multiproteínicos denominados cadena de transporte de electrones (Konigsberg, 2008).

Los electrones pasan de un miembro de la cadena de transporte al siguiente en una serie de reacciones redox. La energía que se libera en estas reacciones es capturada como un gradiente de protones, el cual se utiliza para formar ATP en un proceso llamado quimiosmosis. En conjunto, la cadena de transporte de electrones y la quimiosmosis constituyen la fosforilación oxidativa (Khan Academy, 2015).

Complejo I, Ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa. Es el más grande de los cuatro complejos. El NADH transfiere sus electrones al complejo I. Dentro del complejo I, el encargo de recibir los electrones es una flavoproteína, es decir una proteína unida a una molécula orgánica llamada flavín mononucleótido, que contiene hierro-azufre (FMN). El FMN que recibe los electrones del NADH, es un grupo prostético, una molécula no proteica estrechamente unida a una proteína y que es necesaria para que ésta funcione.

El FMN traslada los electrones a otra proteína dentro del complejo I, una que tiene hierro y azufre unidos a su estructura (llamada proteína Fe-S o Rieske), que a su vez transfiere los electrones a un pequeño acarreador móvil llamado Ubiquinona Q.

Complejo II o Succinato deshidrogenasa. El complejo II recibe directamente FADH_2 , que no pasa a través del primer complejo. El FADH_2 deposita sus electrones en la cadena de transporte de electrones, pero lo hace a través del complejo II. De hecho, el FADH_2 es una parte importante del complejo II, transfiere sus electrones a las proteínas de Fe-S dentro del complejo II, las cuales transfieren los electrones a la ubiquinona Q, el mismo acarreador móvil que recolecta los electrones del complejo I.

Complejo III. El complejo III tiene una proteína Fe-S, pero también tiene dos proteínas de otro tipo, conocidas como citocromos. En el complejo III, los electrones pasan del Citocromo b (Cytb) al citocromo c_1 y luego hacia la proteína Fe-S para ser transferidos fuera del complejo hacia un acarreador de electrones móvil (el citocromo C). Este complejo bombea protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal y contribuye así al gradiente de concentración de H^+ .

Complejo IV. El citocromo C entrega los electrones del complejo III al complejo IV. Ahí, los electrones atraviesan otros dos citocromos más, el segundo de los cuales tiene un trabajo muy interesante: con ayuda de un ion de cobre cercano, transfiere los electrones al O_2 , rompe el oxígeno y forma dos moléculas de agua. El grupo hemo y el ion de cobre se unen con fuerza a la molécula de oxígeno y la mantienen en su lugar hasta que se reduce completamente (ha ganado los electrones y protones para convertirse en agua). Los protones utilizados para producir agua provienen de la matriz y contribuyen al gradiente de H^+ ; además, el complejo IV también bombea protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002).

Los complejos I, III y IV de la cadena de transporte de electrones son bombas de protones. Conforme los electrones se desplazan cuesta abajo energéticamente, los complejos capturan la energía liberada y la usan para bombear iones de H^+ de la matriz hacia el espacio intermembranal. Este bombeo genera un gradiente electroquímico a través de la membrana interna de la mitocondria. En

algunas ocasiones, el gradiente se llama fuerza protón-motriz y puedes pensar en ella como una forma de energía almacenada, algo así como una batería.

Como muchos otros iones, los protones no pueden atravesar directamente la bicapa de fosfolípidos de la membrana debido a que esta es muy hidrofóbica en su interior. Por el contrario, los iones H^+ solo pueden moverse por su gradiente de concentración con la ayuda de proteínas de canal que forman túneles hidrofílicos a través de la membrana.

En la membrana interna de la mitocondria, los iones de H^+ solamente cuentan con un canal disponible: una proteína transmembranal conocida como ATP sintasa. Conceptualmente, la ATP sintasa es muy parecida a las turbinas de un planta de energía hidroeléctrica. En vez de activarse con agua, se activa con el flujo de iones de H^+ que se desplazan por su gradiente electroquímico. Este flujo causa que la ATP sintasa gire y catalice la adición de un fosfato a ADP, con lo que captura la energía del gradiente de protones en forma de ATP.

Conforme los electrones viajan a través de la cadena, se desplazan de un mayor nivel de energía a uno inferior y se mueven de moléculas menos ávidas de electrones u otras más ávidas. En estas transferencias de electrones "cuesta abajo" se libera energía y varios de los complejos de proteína utilizan la energía liberada para bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio de intermembranal para formar un gradiente de protones (Khan Academy, 2015).

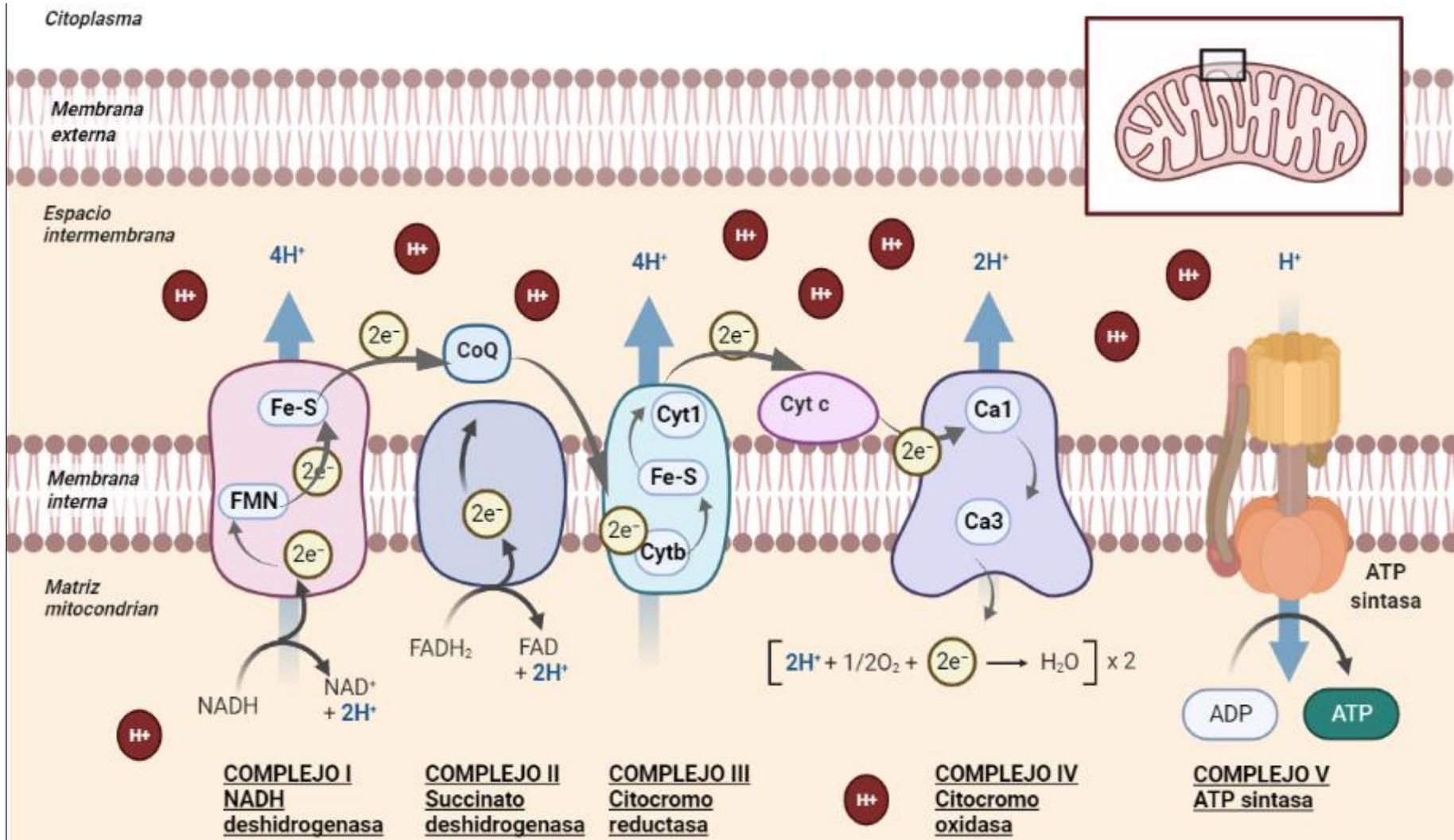


Fig. 6: Cascada de señalización del cytb.
Fuente: La autora, 2020.

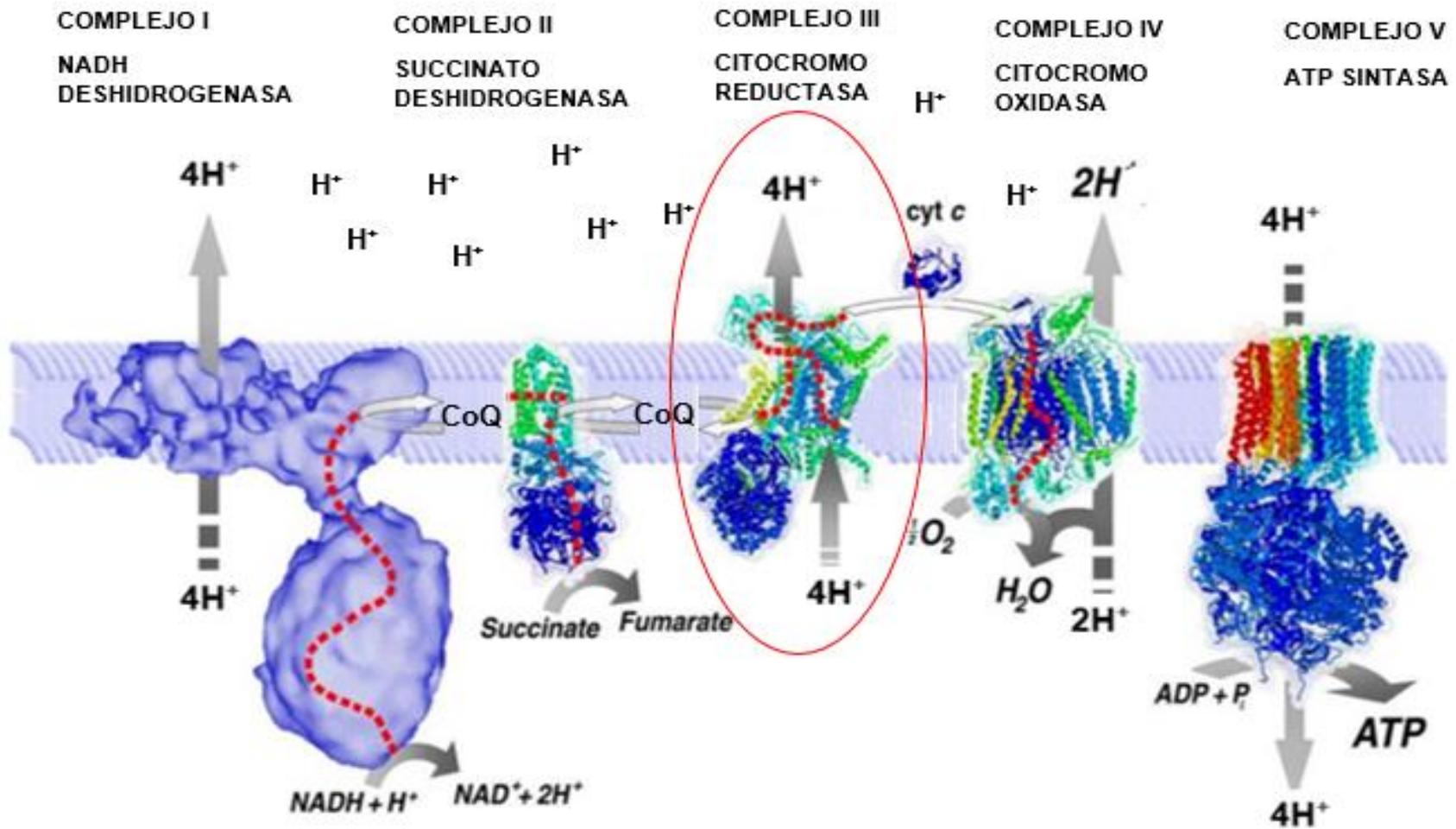


Fig. 7: Cascada de señalización del Cytb. Modelamiento de proteína

Fuente: La autora, 2020.

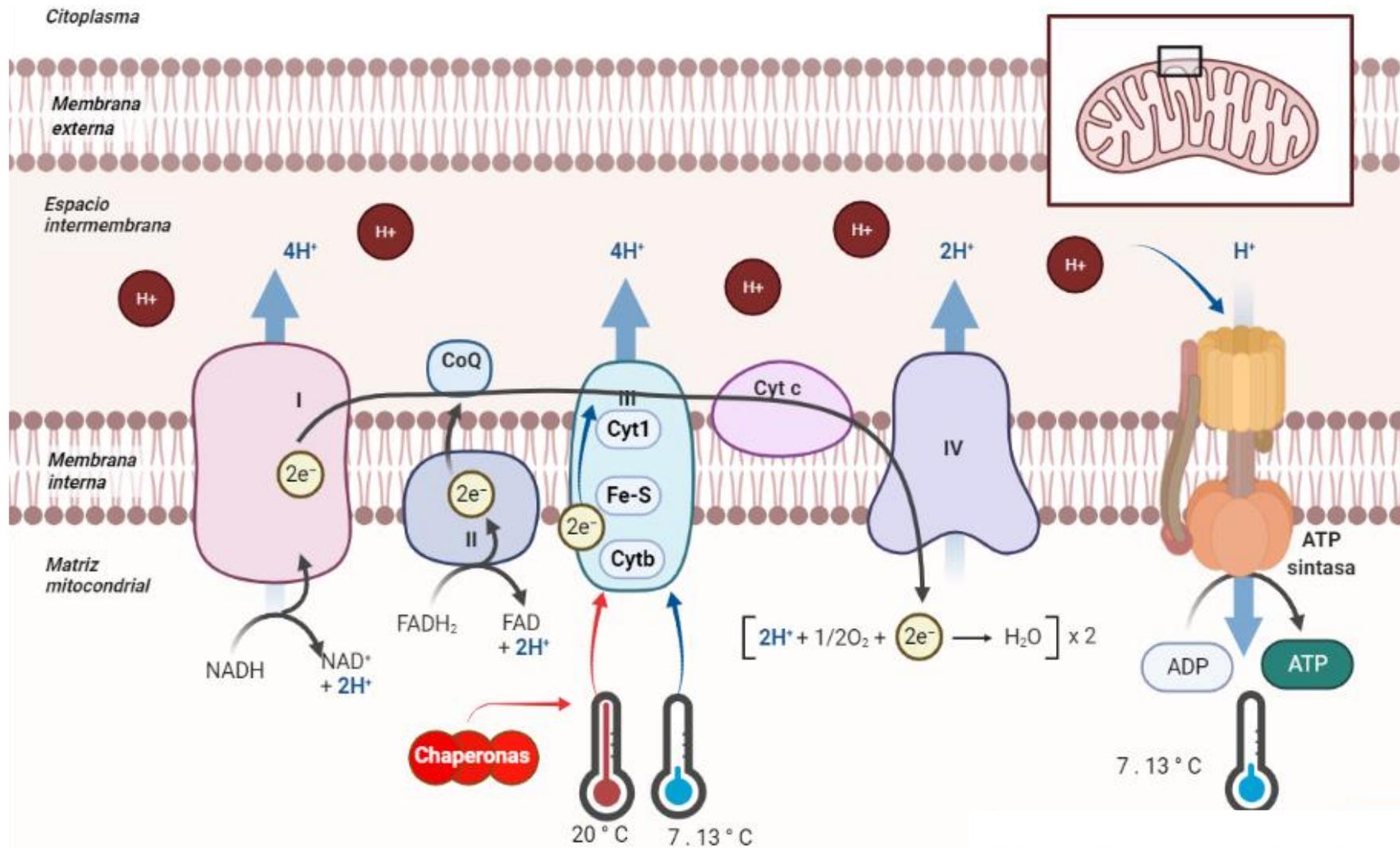


Fig. 8: Estrés oxidativo por cambios de temperatura en la cadena transportadora de electrones
Fuente: La autora, 2021

Los mitócondos que experimentan estrés oxidativo por temperaturas bajas o frías entre 7 y 13° C puede causar reordenamientos en el metabolismo energético, es decir, una regulación a la baja de ubiquinol citocromo c reductasa o complejo III y al ATP sintasa. Por lo tanto, los electrones captados por el Citocromo b son enviados de manera lenta al resto del complejo, provocando que el paso de protones se ralentice en el complejo ATP sintasa generando menos moléculas de ATP en un tiempo determinado. Por lo contrario, a las temperaturas de aclimatación alta o más cálida (20 ° C) se muestra una regulación en el citocromo b de ubiquinol reductasa, además durante esta aclimatación se incluirá una abundancia creciente de chaperonas moleculares, lo que sugiere que esta temperatura está cerca de su límite térmico crónico. La función de estas chaperonas moleculares se basa en ayudar al plegamiento de proteínas, y muchas de estas proteínas recién formadas son proteínas de choque térmico (Fig. 8) (Fields et al., 2012).

7. CONCLUSIONES

- La proteína del Cytb en *Mytilus* presentó 435 aa, al momento de las alineaciones con otras secuencias correspondientes al mismo género pero diferentes especies donde se evidenciaron variaciones como eliminaciones y sustituciones de un aminoácido por otro cumpliendo una función similar y por lo tanto forma parte de una región importante de la proteína
- En el servidor web bioinformático Swiss-Model se observó la proteína del citocromo b cuya estructura es secundaria, es decir que, está formada por hélices α conectándose entre sí mediante los giros- β .
- La proteína citocromo b tiene una función importante en el proceso de respiración y generación de energía dentro de la célula, en especial de las funciones dentro de la mitocondria. No solo sirve como herramienta de estudio del funcionamiento del complejo III, sino que también se evidencia los cambios de temperatura del medio en que se encuentran los mitílidos.
- Los programas bioinformáticos son utilizados en varias áreas de la biología como de otras tecnologías, donde se analiza e interpreta varios datos, donde se incluye secuenciaciones de nucleótidos, aminoácidos, proteínas. Con el apoyo de la bioinformática se pueden realizar estructuras tridimensionales (modelamiento *in silico*) por medio de diferentes técnicas, estos modelos tridimensionales son de gran importancia ya que son utilizados para predecir la interacción de una proteína.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano, R., Balderrama, J., Hoogland, C., Gasteiger, E., & Hochstrasser, D. (2002). *Article El nuevo servidor Latinoamericano de biología molecular de la UCB: Reference El nuevo servidor Latinoamericano de Biología Molecular de la UCB: ho . expasy . org. 2(1), 72–81.*
- Ballesteros, C., & Parra, D. (2018). *MODELAMIENTO in silico DE LA PROTEÍNA HEPARAN-ALFA-GLUCOSAMINA N-ACETILTRANSFERASA Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE ISOFORMAS MEDIANTE DOCKING MOLECULAR* (Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A). Retrieved from https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/1001/1/Ballesteros_CN_y_Parra_DC.pdf
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *The Respiratory Chain Consists of Four Complexes: Three Proton Pumps and a Physical Link to the Citric Acid Cycle.* Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22505/>
- Bonilla, D. (2014, June 11). Cascada de Señalización de la Insulina - DBSS INTERNATIONAL. Retrieved October 24, 2020, from <https://g-se.com/cascada-de-senalizacion-de-la-insulina-bp-457cfb26e7962d>
- Cañedo, R., Rodríguez, R., & Vázquez, Y. (2009). Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos: un palacio de la información para la medicina molecular. *Scielo*. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352009000400003
- Coronado, M. (2013). ¿Qué es la bioinformática? Retrieved October 4, 2020, from http://bioinformatica.uab.cat/genetica_tfg/bioinformaticaabast/Qué_es.html
- Degli, M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., & Meyer, A. (1993). Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 1143). Italy: KOPS.
- Fields, P. A., Zuzow, M. J., & Tomanek, L. (2012). Proteomic responses of blue mussel (*Mytilus*) congeners to temperature acclimation. *Journal of Experimental Biology*, 215(7), 1106–1116.

<https://doi.org/10.1242/JEB.062273>

Flores, R., Raya, J., & Torres, M. E. (2005). *PROTEÍNAS CINASAS DEPENDIENTES DE Ca²⁺: CARACTERÍSTICAS Y ACTIVACIÓN**. México .

Franch, M. (2019). *Bioinformática funcional y su aplicación en genómica, proteogenómica y reposicionamiento de fármacos*. . Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Giraldo, M., Parra, S., & Rojas, M. (2006). *Señalización Celular*. Universidad de Antioquía.

González, C., Castillo, C., Angiolillo, G., Fernández, D., & Rojas, A. (2016, December). *Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*. Retrieved from http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772016000100011

Iván. (2009, May 7). Destacan la importancia de las proteínas en varios procesos del cuerpo humano - La Tercera. Retrieved October 25, 2020, from <https://www.latercera.com/noticia/destacan-la-importancia-de-las-proteinas-en-varios-procesos-del-cuerpo-humano/>

Juarez, S. (n.d.). Alineamiento de Secuencias de Dna Bioedit. Retrieved October 23, 2020, from <https://es.scribd.com/doc/147681010/Alineamiento-de-Secuencias-de-Dna-Bioedit>

Justo, R. (2005). *Función y biogénesis mitocondrial. Diferencias entre géneros* .

Khan Academy. (2015). Fosforilación oxidativa . Retrieved October 5, 2020, from <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/cellular-respiration-ap/a/oxidative-phosphorylation-etc>

Konigsberg, M. (2008). *Radicales libres y estrés oxidativo*. Retrieved from https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/50365331/Radicales_Libres_y_Estres_Oxidativo._Apl.pdf?1479360999=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DRadicales_Libres_y_Estres_Oxidativo._Apl.pdf&Expires=1625499179&Signature=BngFxbYHX5IRvK8uBKwZoOh

x~PKe

- Martínez, A., & Martínez, V. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *SCielo*, 21. Retrieved from http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000500002
- Meneses, C., Rozo, V., & Franco, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Universidad Tecnológica de Pereira.*, 0(49), 116–121.
- Mojica, A., & Piza, J. (2013, November 5). Citocromos. Retrieved July 28, 2020, from <https://es.slideshare.net/Aminadab94/bioquimica-citocromos>
- Pérez, D. (2019). Características de la cadena respiratoria. Retrieved October 5, 2020, from <http://www.neurowikia.es/content/características-de-la-cadena-respiratoria>
- Pillacela, B., Galarza, J., & Tufiño, C. (2020). *Reliability of in silico Modeling Based on Restriction Patterns for the Study of the Carotenogenic Gene pds of Haematococcus sp.* 5(1), 16–21. <https://doi.org/10.11648/j.ijmb.20200501.13>
- Scior, T., Martínez, E., & Salinas, E. (2007). Los modelos in silico, una herramienta para el conocimiento farmacológico. *Redalyc*, 14, 45–48. Retrieved from <http://redalyc.uaemex.mx>
- Toro, J. (2017). *CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DEL GÉNERO Mytilus EN CHILE.*
- Valdespino-Gómez, V. M., Valdespino-Castillo, P. M., & Valdespino-Castillo, V. E. (2015). Cell signalling pathways interaction in cellular proliferation: Potential target for therapeutic interventionism. *Cirugía y Cirujanos (English Edition)*, 83(2), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.circen.2015.08.015>
- Velázquez, J. (2017). *Análisis in silico: Modelado de Proteínas.* Retrieved from <http://tlamati.uagro.mx/t82e/49.pdf>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein

structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

9. ANEXOS

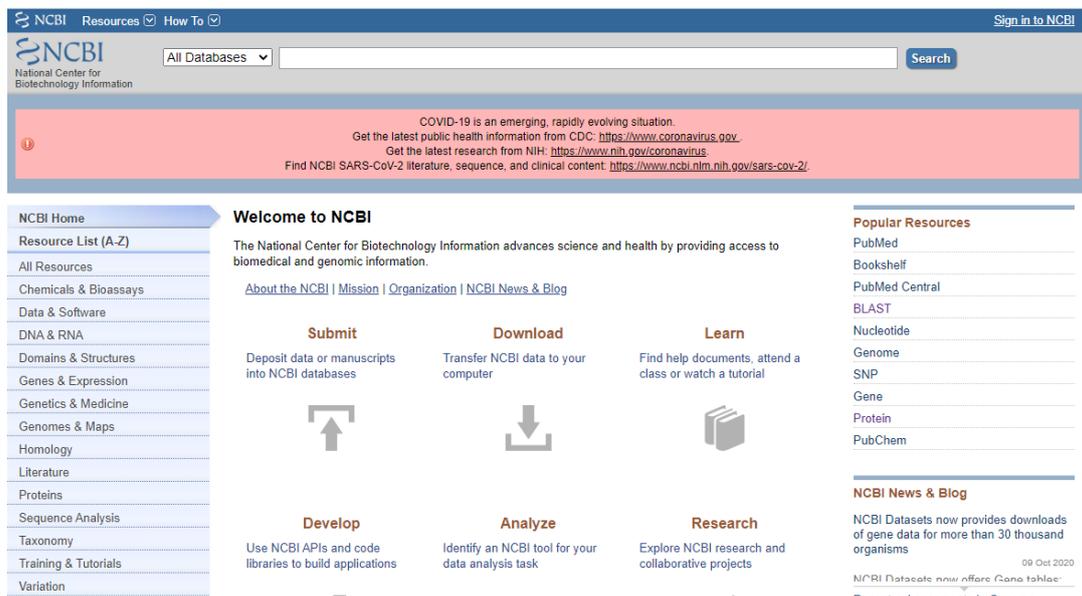


Fig. 9: página del NCBI

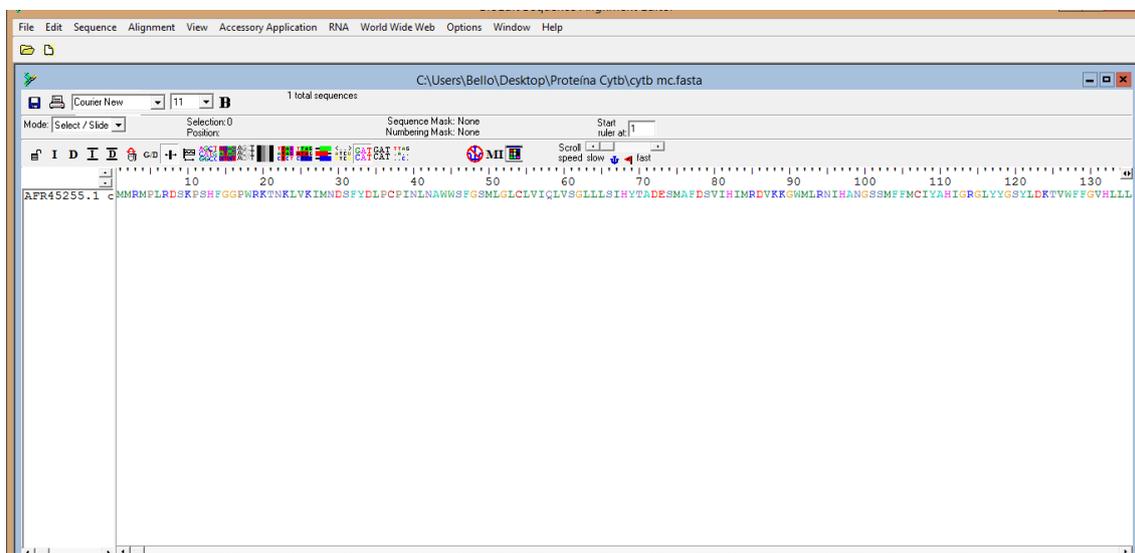


Fig. 10: Programa BioEdit. Alineación de secuencias.


SWISS-MODEL
Modelling Repository Tools Documentation Log in Create Account

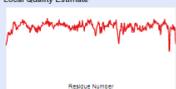
All Projects
Untitled Project Created: today at 18:22
 Summary Templates Models 1

Model Results Order by: GMQE


 Oligo-State Monomer Ligands None GMQE 0.66 QMEAN -3.82

Global Quality Estimate

QMEAN	-3.82
Cp	-3.68
All Atom	-1.49
solvation	0.68
torsion	-3.53

Local Quality Estimate


Comparison


Template: Shaw, I.C. Seq Identity: 55.08% Coverage: Description: Cytochrome b
 Crystal structure of bovine cytochrome b c1 in complex with 2-pyrazolyl quinolone inhibitor WCH2GT

Model-Template Alignment

```

Model_01 MGGNDIAININRSEYVFF...
Shaw, I.C. ....
Model_01 QLYYQY...
Shaw, I.C. ...
Model_01 ...
Shaw, I.C. ...
Model_01 ...
Shaw, I.C. ...
          
```

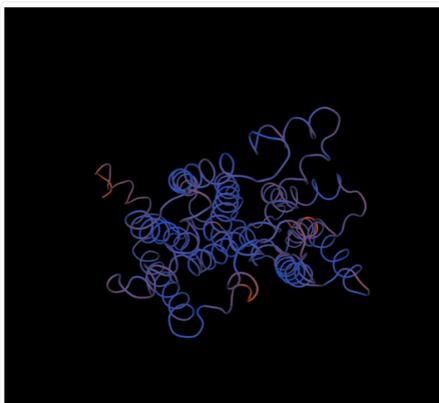


Fig. 11: Swiss-Model. Modelamiento de la proteína en 3D