



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Purificación y Caracterización de la Mioglobina de Reno

Autor: Jennifer Ortúñez Sanz

Tutores:

José Miguel Ferreras

Antimo Di Maro

Purificación y caracterización de la mioglobina de reno

Disertación original expresamente elaborada
para la obtención del Grado en Química de acuerdo con
lo dispuesto en el Real Decreto 1393/2007 de 29 de Octubre.

FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

VALLADOLID

2015

Nombre – Jennifer Ortúñez Sanz

Tutor – Profesor: Doctor José Miguel Ferreras Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Valladolid

Co-Tutor – Profesor: Doctor Antimo Di Maro. Seconda Università degli Studi di Napoli. (Caserta)

Quiero dar las gracias

- Al programa Erasmus Mundus de la Universidad de Valladolid.
- A la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid por la dedicación de sus profesores a la hora de transmitir el conocimiento.
- A los doctores José Miguel Ferreras y Antimo Di Maro. También al equipo de investigación de la Seconda Università degli Studi di Napoli, por todo lo que he aprendido a su lado y por su generosidad a la hora de enseñar.
- A mis padres por su infinita paciencia, apoyo y comprensión.

Índice de contenidos

1.	Resumen	8
2.	Abstract	10
3.	Listado de abreviaturas	12
4.	Introducción	16
4.1	Localización	16
4.2	Funciones	16
4.3	Estructura	18
4.4	Proteínas relacionadas	22
4.5	Aplicaciones biotecnológicas	23
4.6	¿Porqué carne de Reno y no de otro tipo para realizar la investigación?	24
5.	Objetivos y plan de trabajo	26
6.	Materiales y métodos	30
6.1	Materiales	30
6.1.1	Equipamiento empleado	30
6.1.2	Reactivos	33
6.1.3	Software utilizado	35
6.2	Métodos	37
6.2.1	Preparación del extracto de carne de reno	37
6.2.2	Cromatografía de exclusión molecular	37
6.2.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)	38
6.2.4	Cromatografía de intercambio aniónico o Q-Sepharosa	39
6.2.5	HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)	40
6.2.6	Espectrometría de masas	40
6.2.7	Obtención y tratamiento de la secuencia de los datos	41
6.2.8	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la mioglobina	41

6.2.9	Análisis filogenético de la mioglobina	41
6.2.10	Modelado molecular de la mioglobina y representación gráfica	41
7.	Resultados	44
<hr/>		
	Diagrama de flujo de la purificación	44
7.1	Preparación del extracto de carne de reno	45
7.2	Cromatografía de exclusión molecular	45
7.3	Electroforesis de la cromatografía exclusión molecular	47
7.4	Cromatografía en Q-Sepharosa	48
7.5	Electroforesis de la cromatografía en Q-Sepharosa	50
7.6	HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)	51
7.7	Espectro de masas	52
7.8	Secuencia de la mioglobina de reno	53
7.9	Comparación con otras mioglobinas de mamífero	54
7.10	Estructura de la mioglobina de reno	56
7.11	Evolución de la mioglobina en los mamíferos	62
8.	Conclusiones	68
<hr/>		
9.	Referencias: Bibliografía	72
<hr/>		
10.	Anexos:	76
<hr/>		
10.1	Listado de tablas	76
10.2	Listado de figuras	77

“Desgraciados los hombres que tienen todas las ideas claras”

Louis Pasteur

Resumen

1. Resumen

La mioglobina es una hemoproteína que se encuentra en el músculo esquelético y cardíaco de los vertebrados. Su función principal es la de almacenar y facilitar la difusión del oxígeno. Se ha aislado la mioglobina de reno (*Rangifer tarandus* L.) mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-100 y cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharosa. Su masa molecular (16924) y secuencia coinciden con la de la mioglobina del ciervo europeo (*Cervus elaphus* L.). Se ha obtenido un modelo 3D por modelado comparativo que muestra una estructura similar a la de la mioglobina de otros mamíferos: ocho hélices alfa conectadas por cuatro lazos y tres secuencias de uno o dos aminoácidos y que además tiene dos breves extensiones en los extremos amino y carboxilo terminales. El grupo hemo se inserta en un bolsillo hidrofóbico formado por 21 aminoácidos en los que predominan las cadenas laterales apolares. La comparación de las secuencias de mioglobina de los mamíferos muestra la presencia de 48 aminoácidos invariables de los cuales solamente se ha descrito la función de 15. La mioglobina de reno presenta 17 cambios respecto a la secuencia consenso de los cuales tres son cambios no conservados (A53, H88, V148). Un análisis filogenético de la mioglobina de mamíferos muestra que esta proteína ha evolucionado debido a la divergencia de las distintas especies pero sobre todo debido a las necesidades fisiológicas específicas de los distintos animales.

Abstract

2. Abstract

Myoglobin is a cytosolic heme protein localized in the skeletal and cardiac muscle of vertebrates. Its main role is the storage and supply of oxygen. The myoglobin of reindeer (*Rangifer tarandus* L.) has been isolated by size-exclusion chromatography through Sephacryl S-100 and anion-exchange chromatography through Q-Sepharose. Its molecular mass (16924) and sequence were coincident with that of red deer (*Cervus elaphus* L.) myoglobin. A 3D model has been obtained by comparative modelling that shows a similar structure to that of other mammalian myoglobins: eight alpha-helices linked by four loops and three short amino acid sequences, and two short amino- and carboxyl-terminal extensions. The heme group is inserted in a hydrophobic cleft of the protein composed by 21 amino acids containing predominantly hydrophobic side chains. The comparison of mammalian myoglobin sequences revealed the presence of 48 invariant amino acids whose function has only been reported in 15 of them. The reindeer myoglobin displayed 17 changes in its amino acid sequence with respect to the consensus sequence, three of these changes were non conserved (A53, H88, V148). The phylogenetic analysis of mammalian myoglobin revealed that this protein has evolved due to the divergence between the different species but mainly due to the specific requirements in the physiology of the different animals.

Listado de abreviaturas

3. Listado de abreviaturas

A	Absorbancia
A(número)	Alanina (El número significa la posición)
APS	Persulfato de amonio
C (Aminoácido)	Cisteína
CPK	Corey-Pauling-Koltun (Esquema o sistema de colores)
Cygb	Citoglobina
D (Aminoácido)	Ácido Aspártico
Da	Dalton
E (Aminoácido)	Ácido glutámico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
ESI-Q-TOF	Ionización por electrospray. Analizador de cuádruplo. Analizador de tiempo de vuelo.
F(número)	Fenilalanina (El número significa la posición)
H(número)	Histidina (El número significa la posición)
Hb	Hemoglobina
His	Histidina
I(número)	Isoleucina (El número significa la posición)
K(número)	Lisina (El número significa la posición)
kDa	Kilodalton
L(número)	Leucina (El número significa la posición)
Mb	Mioglobina

N1	Átomo 1 de la histidina (Nitrógeno)
Na/P	Tampón de sodio y fosfato
Ngb	Neuroglobina
NOS	Óxido nítrico sintasa.
P(número)	Prolina (El número significa la posición)
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa
S(número)	Serina (El número significa la posición)
SDS	Dodecil-sulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio.
T(número)	Treonina (El número significa la posición)
T(número)	Treonina (El número significa la posición)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamida
TFA	Acido trifluoroacético
Tris	Trihidroximetil-aminometano
UV	Ultravioleta
V(número)	Valina (El número significa la posición)
Y(número)	Tirosina (El número significa la posición)

Introducción

La mioglobina (Mb) es una hemoproteína globular que se encuentra en el músculo esquelético y cardíaco de los vertebrados. Su función principal es la de unirse al oxígeno (revisado en Hendgen-Cotta et al 2014). En las células musculares la mioglobina tampona la disponibilidad de oxígeno de las mitocondrias, facilita la difusión de oxígeno, y puede funcionar como un almacén de éste, para mantener el metabolismo aeróbico durante la hipoxia en muchas aves y mamíferos buceadores en los que la mioglobina se encuentra en altas concentraciones. Pertenece a una familia de proteínas que unen oxígeno, entre las que se encuentran la hemoglobina (Hb), la neuroglobina (Ngb) y la citoglobina (Cygb). Fue la primera proteína en la que se determinó su estructura (John Kendrew obtuvo por ello el Premio Nobel de Química en 1962) y continúa siendo un modelo para estudiar la relación entre la estructura y la función de las proteínas.

4.1 Localización

La mioglobina es una proteína citosólica, que se encuentra en casi todos los vertebrados, salvo en un tipo de peces árticos que se llaman dracos o peces-hielo (Sidell et al 1997). Se localiza en el tejido muscular estriado o esquelético, el tejido estriado cardíaco y el tejido muscular liso (Hendgen-Cotta et al 2014). Esto la diferencia de las demás hemoproteínas que unen oxígeno ya que la hemoglobina se encuentra en los eritrocitos (las células endoteliales tienen una variante de la hemoglobina), la neuroglobina en las neuronas y la citoglobina se encuentra en muchos tejidos de vertebrados. La mioglobina se encuentra también en trazas en el cerebro, riñón e hígado de los peces y en células asociadas a tumores de mama de los seres humanos (Hendgen-Cotta et al 2014).

4.2 Funciones

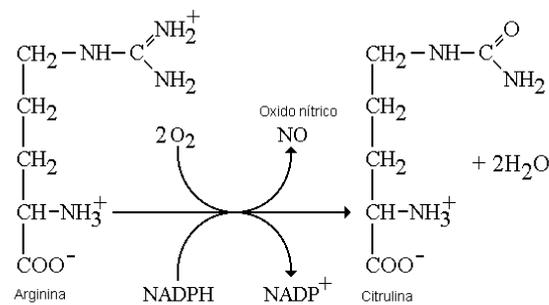
– Suministrador de oxígeno

La mioglobina funciona como un depósito de oxígeno en los tejidos musculares aumentando la disponibilidad del mismo de los miocitos. En los mamíferos buceadores su concentración es hasta diez veces mayor que en los mamíferos terrestres, lo que les permite en algunos casos como el cachalote bucear durante más de una hora (Hendgen-Cotta et al 2014). La mioglobina es capaz de intervenir en el proceso de transferencia/transporte de oxígeno en diferentes

condiciones de presión parcial de éste, incluso en muy bajas presiones, por esta razón se dice que la mioglobina tiene una “*alta afinidad con la molécula de oxígeno*” (Hochachka., 1999). A presiones por encima de 40 mmHg de oxígeno está saturada (95%). Dado que se encuentra en el tejido del corazón y de los músculos, constituye una "reserva" dentro del músculo. Este papel es particularmente evidente en los mamíferos y las aves acuáticas (Kooyman & Ponganis 1998), en los que el tejido muscular cardiaco almacena oxígeno para utilizarlo durante los períodos de hipoxia o anoxia. A una presión muy baja (5 mmHg) la mioglobina libera el oxígeno convirtiéndose en un mecanismo efectivo para el transporte y la liberación del gas; con ello se facilita la difusión de éste a la mitocondria, alimentando, por lo tanto, la cadena respiratoria (Conley & Jones 1996)

– **Protector contra la toxicidad de óxido nítrico (NO), agua oxigenada (H₂O₂) y peroxinitrito (ONOO⁻)**

El NO (óxido nítrico o monóxido de nitrógeno) es un radical libre que se genera continuamente por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) de las células endoteliales (Hendgen-Cotta et al 2014). La NOS cataliza la siguiente reacción:



El NO juega un papel esencial en el mantenimiento del tono de los vasos coronarios, pero, mientras que concentraciones bajas de NO tienen un efecto ionotrópico positivo, las concentraciones altas lo tienen negativo. Además las concentraciones altas del NO bloquean la respiración celular inhibiendo la citocromo c oxidasa porque compite con el oxígeno. Tanto la oxihemoglobina como la oximioglobina reaccionan rápidamente con el NO actuando como neutralizantes (scavengers) del NO (Hendgen-Cotta et al 2014).

También se ha demostrado que la mioglobina elimina el H_2O_2 gracias a su actividad peroxidasa y que tiene la capacidad de detoxificar el peroxinitrito (Hendgen-Cotta et al 2014).

– **Generador de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO)**

La mioglobina regula la biodisponibilidad de NO en el músculo cardíaco ya que en condiciones de normoxia la oximioglobina neutraliza el NO transformándolo en NO_3^- , mientras que en condiciones de hipoxia la deoximioglobina reduce el NO_2^- a NO. Esta reacción asegura la integridad y viabilidad del miocardio durante los periodos breves de hipoxia (Hendgen-Cotta et al 2014). Uno de ellos es su capacidad para unirse a NO, una molécula cuyos efectos pueden ser beneficiosos o perjudiciales para la célula. En efecto, además de su papel como potente vasodilatador, el óxido nítrico inhibe la citocromo c oxidasa y bloquea la respiración mitocondrial (Brunori 2001). Brunori ha demostrado que la mioglobina, por su capacidad para unirse a NO, puede actuar como un "almacén" de NO en el músculo esquelético y cardíaco (Brunori 2001).

4.3 Estructura

Es una proteína monomérica que tiene un peso molecular de alrededor de 17.800 Da. En los mamíferos tiene 153 aminoácidos. El 70% de los aminoácidos forman ocho hélices alfa dextrógiras anfipáticas que están conectadas por lazos que no presentan una estructura regular (Fig. 1). La hélice de mayor longitud tiene 23 aminoácidos y la más corta solamente 7 (Cammarata & Brodbelt 2014).

En las hélices, los aminoácidos hidrófobos predominan en la cara orientada hacia el interior de la proteína y los aminoácidos polares predominan en la cara que está orientada hacia el exterior. La superficie de la mioglobina presenta una superficie con carga negativa por lo cual unas moléculas de la misma repelen a otras y no forman agregados (Cammarata & Brodbelt 2014).

Las hélices se nombran con letras de la A a la H desde el amino terminal al carboxilo terminal: A (del aminoácido 4 al 19), B (aminoácido 20 al 35), C (aminoácido 36 al 42), D (aminoácido 51 al 57), E (aminoácido 58 al 77), F (aminoácido 86 al 94), G (aminoácido 100 al 118) y H (aminoácido 124 al 150). Los lazos se denominan con las letras de las hélices que conectan: CD (aminoácido 43 al 50), EF (aminoácido 78 al 85), FG (aminoácido 95 al 99) y GH (aminoácido 119 al 123). Además tiene dos cortas extensiones en los extremos terminales

amino (aminoácido 1 al 3) y carboxilo (aminoácido 151 al 153) (Cammarata & Brodbelt 2014).

Un residuo aminoácido individual puede designarse por su posición en la secuencia de aminoácidos o por su localización dentro de la secuencia de un segmento concreto de hélice alfa. Por ejemplo, el residuo histidina (His) coordinado al grupo hemo en la mioglobina, His93 (el aminoácido nº 93 desde el extremo amino-terminal de la secuencia polipeptídica de la mioglobina) se llama también His F8 (el octavo residuo de la hélice alfa F).

La molécula de mioglobina es tan compacta en su interior que sólo hay espacio para cuatro moléculas de agua. Este denso núcleo hidrofóbico es típico de las proteínas globulares

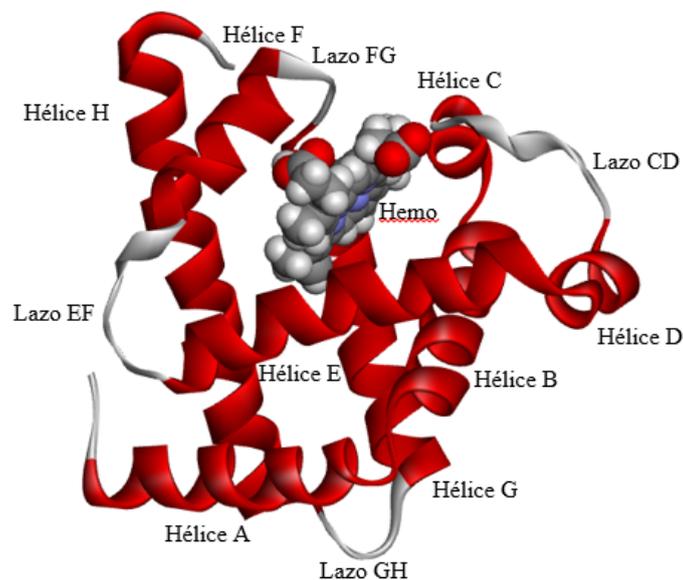


Figura 1. Estructura de la mioglobina de cachalote. Se muestran las hélices alfa (rojo), los lazos (gris) y el grupo hemo (CPK). La estructura se obtuvo del Protein Data Bank (número de acceso 1MBN).

El oxígeno no es muy soluble en el agua y no puede transportarse a los tejidos en cantidad suficiente por simple disolución en el suero sanguíneo. Este papel es desempeñado por ciertos metales de transición, entre ellos el hierro y el cobre, que tienen una fuerte tendencia a unir oxígeno y así poder transportarlo. Los organismos multicelulares explotan las propiedades de los metales, normalmente del hierro, para el transporte de oxígeno. Sin embargo, el hierro libre provoca la formación de especies altamente reactivas del oxígeno, tales como los

radicales hidroxilo, que pueden dañar el ADN. Por lo tanto el hierro suele estar incorporado a un grupo prostético unido a una proteína, llamado grupo hemo.

El grupo hemo es un sistema de anillos derivado de la porfirina a la que está unido un único átomo de hierro en su estado ferroso Fe^{2+} (Fig. 2). El grupo hemo se encuentra en muchas proteínas transportadoras de oxígeno, y también en algunas proteínas, como los citocromos, que participan en reacciones de oxidación-reducción (transferencia de electrones). Contiene cuatro anillos pirrólicos, que se nombran de la A a la D, unidos por puentes de meteno. El grupo hemo está estabilizado en el interior de la mioglobina y la hemoglobina por interacciones hidrofóbicas con la fenilalanina CD1 (resto primero del lazo CD) y la valina E11 (resto undécimo de la hélice alfa F). El átomo de hierro, en su forma ferrosa, puede establecer seis enlaces de coordinación que se disponen en una distribución octaédrica, con los seis enlaces dirigidos hacia los seis vértices del octaedro. El átomo de hierro se sitúa en el centro del anillo complejo de la protoporfirina y establece cuatro de esos enlaces con los cuatro nitrógenos centrales de los cuatro anillos pirrólicos, dos covalentes y dos coordinados. Los dos enlaces restantes están orientados verticalmente al plano de la protoporfirina, cada uno de ellos a un lado. Uno de estos se establece con un resto de histidina de la cadena peptídica, concretamente con la histidina F8 (His 93) (resto octavo de la hélice alfa F), y este va a ser el punto de anclaje del grupo hemo a la cadena peptídica; esta histidina F8 se llama también histidina proximal. El otro enlace es el punto de unión para el oxígeno, y, por tanto, únicamente se formará cuando el oxígeno se una al grupo hemo. Los átomos de nitrógeno coordinados (que tienen carácter de dadores de electrones) ayudan a evitar la conversión del hierro hemo al estado férrico (Fe^{3+}). El hierro en estado Fe^{2+} une oxígeno de manera reversible, mientras que en el estado Fe^{3+} no une oxígeno. Los estudios han demostrado que esta histidina actúa como un "interruptor" que se abre y se cierra cuando el oxígeno entra en el bolsillo hidrofóbico para unirse al grupo hemo.

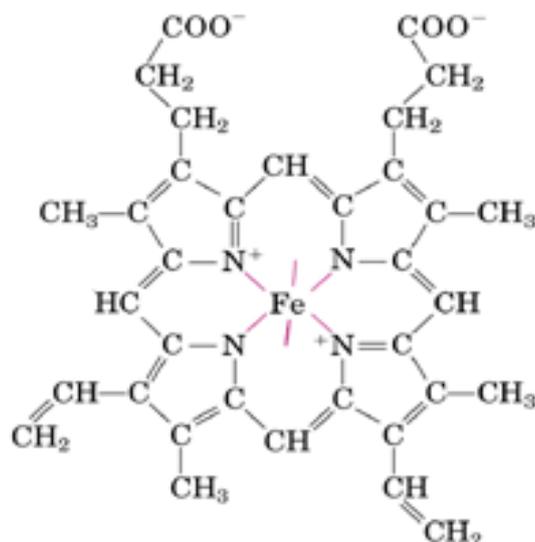


Figura 2. Representación del grupo hemo.

La reacción simultánea de una molécula de O₂ con dos moléculas de hemo libres (o con dos de Fe²⁺) puede dar lugar a la conversión irreversible del Fe²⁺ a Fe³⁺. En las proteínas que contienen hemo, esta reacción se evita secuestrando cada hemo en un lugar suficientemente profundo dentro de la estructura proteica. Así, el acceso a los dos enlaces de coordinación está ocupado por el nitrógeno de la cadena lateral de un residuo His. El otro es el sitio de fijación del oxígeno molecular (O₂). La oxigenación del grupo hemo altera el estado electrónico del grupo, lo que afecta a sus propiedades espectrofotométricas. Esta es la razón del diferente color que presentan la sangre arterial (rojo vivo) y la sangre venosa (más oscura).

La mioglobina también llamada desoximioglobina presenta el hierro en estado ferroso (Fe²⁺) y se caracteriza por la ausencia de ligandos en la sexta posición de los enlaces. En estos casos, la mioglobina presenta un color púrpura (Este es el color que podemos apreciar en la carne recién cortada). La mioglobina, la cual presenta gran afinidad con el oxígeno, se combina con el oxígeno atmosférico para convertirse muy rápidamente en oximioglobina (MbO₂). En el caso de la carne recién cortada, la cuál era de color púrpura, pasa a ser del color rojo brillante que los consumidores asocian con frescura. En esta molécula el átomo de hierro permanece en estado ferroso (Fe²⁺) lo que sucede en un proceso de oxigenación y no de oxidación.

Cerca del enlace de unión al oxígeno del grupo hemo, hay otro resto de histidina de la cadena peptídica, que no forma enlace ni con el grupo hemo ni con el oxígeno, es la histidina E7 (His

64) o histidina distal, que por su proximidad genera un entorno molecular que hace que la unión del oxígeno con el hierro sea una unión más débil y no permanente, que se puede formar y romper, lo cual permite a estas proteínas transportar el oxígeno (lo captan y luego lo liberan). Este resultado está garantizado también por la formación de un enlace de hidrógeno entre el oxígeno y el hidrógeno del anillo de imidazol de la histidina. La sustitución en la mioglobina de esta histidina distal con cualquier otro residuo de aminoácido reduce la afinidad de la proteína para el oxígeno y aumenta su velocidad de auto-oxidación (Spiro & Kozlowski 2001).

Algunas moléculas pequeñas, como el monóxido de carbono (CO) y el óxido nítrico (NO) pueden coordinarse con el hierro del grupo hemo con mayor afinidad que el oxígeno. Cuando una molécula de CO se une al grupo hemo, el oxígeno queda excluido, siendo ésta la razón por la que el CO es altamente tóxico para los organismos aeróbicos.

4.4 Proteínas relacionadas

Las globinas se encuentran habitualmente en eucariotas de todas las clases e incluso en algunas bacterias. La mayoría funcionan en el transporte o almacenamiento de oxígeno, aunque algunas tienen la función de sensores de oxígeno, óxido nítrico o monóxido de carbono. En los humanos y otros mamíferos, existen como mínimo cuatro clases de globinas (Hendgen-Cotta et al 2014).

– Hemoglobina (Hb)

La hemoglobina transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, está formada por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas de alfa-globina y dos cadenas de beta-globina que se disponen en una estructura cuaternaria característica. Tanto la alfa-globina como la beta-globina tienen homología con la mioglobina, llevan unidas un grupo hemo y cada una está formada por ocho hélices que están conectadas por lazos. Sin embargo, difiere de la mioglobina en muchos aspectos. Por ejemplo, la mioglobina tiene una afinidad por el oxígeno superior a seis veces respecto a la de la hemoglobina.

– Neuroglobina (Ngb)

La neuroglobina se encuentra sobre todo en el sistema nervioso central y periférico aunque también se puede encontrar en el sistema endocrino. Tiene importancia para la homeostasis neuronal de oxígeno y también para evitar la hipoxia. Asimismo tiene homología con la

mioglobina, lleva unido un grupo hemo y está formada por ocho hélices que están conectadas por lazos.

– **Citoglobina (Cygb)**

La citoglobina se encuentra en el núcleo y el citoplasma de muchos tejidos. Es más grande que la mioglobina estando formada por 190 aminoácidos en vez de 153. Esto es debido a que tiene extensiones de unos 20 aminoácidos en los extremos amino y carboxilo terminales. El resto de la molécula tiene una estructura similar a la mioglobina, está formada por ocho hélices que están conectadas por lazos y lleva unido un grupo hemo. Su papel fisiológico no está claro todavía. Se expresa en mayor cantidad, a presiones de oxígeno bajas, en varios órganos como el cerebro, retina, hígado, corazón y músculo esquelético.

4.5 Aplicaciones biotecnológicas

La mioglobina se sigue utilizando como modelo para estudiar la relación entre estructura y función de las proteínas debido a que es una de las proteínas más estudiadas y mejor conocidas. Además se utiliza en distintas aplicaciones biotecnológicas.

– **Marcador de infarto de miocardio**

La mioglobina fue uno de los primeros biomarcadores que se utilizaron para diagnosticar el infarto agudo de miocardio (Song et al 2014): Actualmente no se utiliza de forma habitual debido a que los nuevos ensayos con troponina I y T son más sensibles que los que utilizan la mioglobina. Sin embargo se están ensayando nuevos métodos que utilizan la mioglobina como marcador del infarto agudo de miocardio y que poseen una gran sensibilidad (Wang et al 2015).

– **Marcador del origen de la carne**

La mioglobina se utiliza también como marcador para detectar adulteraciones en productos cárnicos como, por ejemplo, en las hamburguesas. Se pueden distinguir las mioglobinas de carne de vacuno, pollo, caballo, avestruz, cerdo y búfalo de agua utilizando la cromatografía líquida de alta resolución, UPLC (Giaretta et al 2013).

- Biosensores

La mioglobina se utiliza en el diseño de biosensores para la detección de distintos compuestos como el H₂O₂ (Liu and Hu 2009; Canbay et al 2015; Guo et al 2012), nitrito (Canbay et al 2015; Guo et al 2012) u oxígeno (Guo et al 2012).

4.6 ¿Porqué carne de Reno y no de otro tipo para realizar la investigación?

La elección de la carne de Reno en lugar de la de cualquier otro animal se debe a que es la carne con mayor cantidad de proteína (Ver tabla 1). Es importante porque la mioglobina es una hemoproteína globular que se encuentra en el músculo entonces cuanta más cantidad de proteína mejor.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL

	Reno	Vacuno	Cerdo	Pollo
Valor energético	125 Kcal	160 kcal	219 kcal	166 kcal
Proteínas	23,8 gr	19,1 gr	17,5 gr	19,9 gr
Grasa total	3,30 gr	9,3gr	16,5 gr	9,6 gr
Hierro	4,85 mg	2,1 mg	1,8 mg	0,73 mg

Tabla 1. Cantidad de proteína en función de los diversos animales.

Objetivos y plan de trabajo

5. Objetivos y plan de trabajo

El objetivo principal de esta investigación es purificar y caracterizar la mioglobina de reno. Esta investigación es la base para implementar unos controles de calidad rigurosos que garanticen la seguridad de los consumidores a la hora de comprar productos cárnicos sin miedo a que contengan carnes distintas a las que se pretenda adquirir y distintas de las que aparecen en el etiquetado de las mismas. Algo similar ya sucedió hace tiempo cuando el supermercado Lidl introdujo extractos de carne de caballo en hamburguesas de ternera. Por otro lado el estudio de la estructura de la mioglobina de reno comparada con otras mioglobinas de mamífero nos permite estudiar las peculiaridades de estas proteínas.

Para lograr dicho objetivo, abordaremos los siguientes objetivos concretos:

1. Purificación de la mioglobina de reno.
2. Obtención de la masa molecular de la mioglobina de reno por espectrometría de masas.
3. Obtención de la secuencia de la mioglobina de reno.
4. Obtención de un modelo de estructura de la mioglobina de reno.
5. Comparación con las secuencias y estructuras de otras mioglobinas.
6. Análisis filogenético de las mioglobinas de mamífero.

Para lograr nuestros objetivos, estableceremos una serie de etapas dentro de un plan de trabajo que tendremos que ir alcanzando:

Etapa correspondiente	Fechas estimadas de realización	Etapas y objetivos de realización
Etapa 1	18-09-2013	Establecimiento y definición de objetivos.
Etapa 2	19-09-2013	Alcance de la investigación y diferentes campos de aplicación.

Etapa 3	29-09-2013	Documentación e investigación previa: Normas, manual de calidad, otros planes de trabajo, manuales, revistas de divulgación científica, otras investigaciones...
Etapa 4	01-10-2014	Realización de las pruebas prácticas pertinentes para llevar a cabo la purificación. Dentro del plan de trabajo, ha surgido la posibilidad de llevar a cabo dichas pruebas en la <i>Seconda Università degli Studi di Napoli</i> . Para ello debemos preparar y homogeneizar el producto. El producto del estudio se prepara con las operaciones necesarias. Habrá que coger un pedazo de carne de toda la pieza y homogeneizarlo.
Etapa 5	26-02-2014	Obtención del peso molecular. En este caso se examinará la mioglobina de reno. Para ello se realizan diferentes tipos de cromatografía: exclusión molecular o filtración en gel que es el Sephacryl, Q-Sepharosa o de intercambio aniónico, electroforesis, HPLC o cromatografía líquida de alta resolución.
Etapa 6	05-05-2014	Aplicación de técnicas bioinformáticas con la masa molecular obtenido.
Etapa 7	21-05-2014	Obtención de figuras, tablas y resultados.
Etapa 8	22-05-2014	Consecución de la secuencia de la mioglobina de reno.
Etapa 9	01-07-2014	Extracción de las conclusiones pertinentes para la aplicación e implementación de los resultados obtenidos.

Tabla 2.- Lista de objetivos.

Materiales y métodos

6.1 Materiales

6.1.1 Equipamiento empleado

A la hora de realizar las diferentes pruebas y ensayos de cara a completar la purificación de la mioglobina de reno, se han utilizado los equipos que a continuación se detallan. Se especifica tanto el equipo, como el modelo, como el uso que se le ha dado.

Para la preparación de la muestra y homogeneización utilizamos una centrífuga Avanti J-25, cuya marca era Beckman Coulter, con un rotor de F0650 a una velocidad de 14.000 rpm y una picadora de marca Waring Blender.

Las lecturas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro modelo Cary 50. Este espectrofotómetro de UV-Vis era de la marca Agilent Technologies.

Todas las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo con diferentes cromatografías. El dispositivo utilizado en electroforesis fue un Mini- Protean II de la marca Bio-Rad. El segundo equipo utilizado es el de cromatografía líquida alta resolución (HPLC) era de la marca Breeze de Waters.

Para medir la conductividad utilizamos un medidor de conductividad modelo CDM80 de la marca Radiómetro Copenhagen.

El último de los equipos usados, fue el que se utilizó para detectar la masa molecular de la mioglobina de reno, un espectrómetro de masas ESI- Q-TOF de Waters.

Equipo	Marca/ Modelo
Centrífuga Avanti J-25	Beckman Coulter/ rotor de F0650
Picadora	Waring Blender
Espectrofotómetro de UV-Vis	Agilent Technologies/ Cary 50
Electroforesis	Bio-Rad/ Mini- Protean II
Cromatografía de alto rendimiento (HPLC) Breeze	Waters
Medidor de conductividad	Radiómetro Copenhague/ CDM80
Espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF	Bruker/ AutoFlexSpeed™ TOF/TOF

Tabla 3. Lista de equipos de laboratorio.

Los materiales utilizados en el Laboratorio de la Seconda Università degli Studi di Napoli fueron: pipetas, micropipetas eppendorf, eppendorf, vasos de precipitados de 100 mL y 250 mL, cubetas de espectrofotómetro, tubos tipo “falcon”, Parafilm, Pipetas Pasteur; tubos de ensayo; embudo de cristal; jeringa de 500 µl para el HPLC; probetas de 10 mL, 25 mL, 100 mL y 500 mL; pipetas graduadas de 1 mL, 2 mL 5 mL y 10 mL.

Los tubos de diálisis Spectra-POR (tamaño de corte 6000/8000) los produce la empresa Spectrum y los distribuye la empresa Gianni SpA Productos. El papel de filtro es de la marca Miracloth Calbiochem. La columna C-4 HPLC de fase inversa fue proporcionada por Alltech. Para la preparación de la soluciones se utilizó agua Milli-Q , producida con el dispositivo Milli-Q SY-A10 de Millipore.

Materiales	Marca
Pipetas	-
Micropipetas eppendorf	-
Eppendorf	-
Vasos de precipitados de 100 mL y 250 mL	-
Pipetas Pastur	-
Parafilm	-
Embudo de cristal	-
Jeringa de 500 µl para el HPLC	-
Pipetas graduadas de 1 mL, 2 mL 5 mL y 10 mL.	-
Cubetas de espectrofotómetro	-
Tubos de diálisis Spectra-POR	Spectrum (EE.UU.) y los distribuye Gianni SpA Productos
Papel de filtro	Mira cloth Calbiochem
Columna C-4 HPLC de fase reversa	Alltech
Columna de Sephacryl S-100 High Resolution	-
Columna Q-Sepharosa (23.5 x 9 cm)	-
Tubos tipo "falcon"	-

Tabla 4. Lista de materiales.

6.1.2 Reactivos

En el proceso de la purificación de la mioglobina de reno se han utilizado diversas soluciones que se detallan a continuación.

Para todos los ensayos analíticos hemos necesitado agua desionizada. Para equilibrar la cromatografía de columna de exclusión molecular necesitamos una solución tampón de fosfato de sodio (NaP) 5 mM (pH 7,2) y también una solución de 0,3 M de cloruro de sodio (NaCl).

En la cromatografía de intercambio aniónico o Q-Sepharosa para calibrarla utilizamos un tampón A cuya solución es TrisHCl 10 mM a (pH 8,8) y un tampón B mediante una solución de TrisHCl 10 mM a (pH 8,8) y NaCl 0,1 M.

Las soluciones para la preparación del gel de separación en la electroforesis son: 2,5 mL de acrilamida al 40%; 1,25 mL de 1,5 M de Tris HCl, (pH 8,8) 1,5 M; 0,05 mL de SDS al 20%; 1,125 mL de H₂O, 0,005 mL de TEMED y por último 0,05 mL de APS al 10%. El gel compactado llevaba lo siguiente: 0,6 mL de acrilamida al 40%; 0,75 mL de Tris HCl, (pH 6,8) 0,5 M; 0,03 mL de SDS al 10%, 1,585 mL de agua, 0.005 mL de TEMED y por último 0,05 mL de APS al 10 %. El gel retirado de las placas de vidrio se sumergió en una solución de tinción formada por: colorante Brillante R250 al 0,1% cuya composición es isopropanol al 20% y ácido acético al 10% es de Fluka Sigma-Aldrich.

Para la elaboración de los dos disolventes que equilibran la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); suministrados por Carlo Erba. Disolvente A TFA 0,1% (1 L de agua miliQ y 1000 µL de TFA) y Disolvente B (1 L de acetonitrilo + 0,1 % de TFA).

Técnicas	Soluciones utilizadas
Todas	Agua desionizada
Cromatografía de exclusión molecular	Tampón de fosfato de sodio (NaP) 5 mM (pH 7,2)
	Solución de 0,3 M de cloruro de sodio (NaCl)
	La resina de filtración en gel Sephacryl S-100 es de Amersham Pharmacia Biotech
Cromatografía de intercambio aniónico o Q-Sepharosa	Tampón A: solución TrisHCl 10 mM (pH 8,8)
	Tampón B: solución de TrisHCl 10 mM (pH 8,8) y NaCl 0,1 M
	Q-Sepharosa, es de Amersham Pharmacia Biotech
Electroforesis	Solución de 2,5 mL de acrilamida al 40%; 1,25 mL de 1,5 M de Tris HCl, (pH 8,8) 1,5 M; 0,05 mL de SDS al 20%; 1,125 mL de H ₂ O, 0,005 mL de TEMED y 0,05 mL de APS al 10%
	Poliacrilamida 40% de Amresco (38,96 g de acrilamida y 1,04 g de N,N'-Metilénbisacrilamida)
	Solución de 0,6 mL de acrilamida al 40%; 0,75 mL de Tris HCl, pH 6,8 0,5 M; 0,03 mL de SDS al 10%, 1,585 mL de H ₂ O, 0,005 mL de TEMED y 0,05 mL de APS al 10 %
	Colorante Azul Comassie Brillante R250 al 0,1% (isopropanol al 20% y ácido acético al 10%)
HPLC	Disolvente A TFA 0,1% (1 L de agua miliQ y 1000 µL de TFA)
	Disolvente B (1L de acetonitrilo + 0,1% de TFA)

Tabla 5. Lista de soluciones.

6.1.3 Software utilizado

En el proceso de la caracterización de la mioglobina de reno se han utilizado diferentes programas informáticos y bancos de datos que se detallan a continuación.

Banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) utilizados para la obtención de las secuencias de la mioglobina. Una vez que tenemos las secuencias de aminoácidos de la mioglobina se alinean con la aplicación ClustalW de la suite Mega 6 (version 6.0; <http://www.megasoftware.net>) (Tamura et al. 2013). El alineamiento de las secuencias se representó gráficamente mediante un logo creado con el programa WebLogo 3 (<http://weblogo.threeplusone.com/>) (Crooks et al. 2004).

A continuación la historia evolutiva se dedujo con el método Maximum Likelihood (máxima verosimilitud) basándose en un modelo que utiliza la matriz de Dayhoff (Schwarz & Dayhoff 1979). El análisis evolutivo se realizó con Mega 6 (Tamura et al. 2013).

El modelado de la estructura tridimensional de la mioglobina de reno se realizó en el servidor I-TASSER (Roy et al., 2010) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>).

Como molde se utilizaron las estructuras de la mioglobina de *Physeter macrocephalus* L. (números de acceso 1cio, 1ajg, y 1naz), *Caretta caretta* L. (números de acceso 1lht, y 1lhs), *Homo sapiens* L. (número de acceso 1ut0) y *Equus caballus* L. (número de acceso 1azi). Las estructuras de la mioglobina de *Physeter macrocephalus* (cachalote, número de acceso 1mbn) y *Caretta caretta* (tortuga boba, número de acceso 1lht) están disponibles en el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

El estudio y representación gráfica de la estructura de las proteínas se hizo con la suite Discovery Studio 3.5 (<http://accelrys.com/>).

Procedimiento	Software y bases de datos utilizadas
Obtención de las secuencias de aminoácidos	National Center for Biotechnology Information (NCBI)
Alineamiento de las secuencias de aminoácidos	ClustalW de la suite Mega 6
Representación gráfica del alineamiento	WebLogo 3
Deducción de la historia evolutiva	Mega 6
Modelado de la estructura tridimensional de la mioglobina de reno	Servidor I-TASSER
Molde de las estructuras de la mioglobina	Protein Data Bank
Estudio y representación gráfica de la estructura de las proteínas	Suite Discovery Studio 3.5

Tabla 6. Lista de software y bases de datos.

6.2 Métodos

6.2.1 Preparación del extracto de carne de reno

Para obtener el extracto de carne necesario para la homogeneización descongelamos, en primer lugar, a temperatura ambiente un pedazo de carne de reno (*Rangifer tarandus* L.) procedente de Inglaterra que días anteriores ha estado congelado a -20°C . Se pesaron 44,5 g. Dicho extracto se trituró con una picadora marca Waring Blender y se le añadieron 90 mL de agua desionizada. Cuando se pica la carne se produce calor que puede desnaturalizar las proteínas. Por lo tanto, para mantenerlas a 4°C , se trituró la carne durante un minuto. Luego se metió en un baño con hielo picado durante otro minuto. Al siguiente minuto se volvió a triturar, y así sucesivamente. Una vez que la carne estuvo bien triturada se centrifugó con un rotor F0650 a 14.000 rpm a 4°C durante cuarenta minutos. Se decantó el sobrenadante y se filtró con papel de filtro Miracloth humedecido con agua desionizada. Se obtuvieron 84 mL de extracto de carne que se dializaron 3 veces en una probeta de plástico con 2 L de agua.

6.2.2 Cromatografía de exclusión molecular

Antes de hacer la cromatografía de exclusión molecular se coge todo el volumen de extracto crudo y se divide en dos tubos tipo “falcon” esterilizados. En cada tubo tenemos 42 mL. Se tapa con Parafilm, se hacen agujeros y esperamos hasta que se deshidrate (aproximadamente 2 días). El motivo de liofilizar una muestra es concentrarla. Posteriormente añadimos a nuestra muestra liofilizada 5 mL de agua desionizada con lo que obtenemos un total de 40 mL de disolución de extracto crudo.

Estos 40 mL de disolución se someten a una cromatografía de exclusión molecular aplicándose con la punta de una pipeta Pasteur en una columna de Sephacryl S-100 High Resolution (diámetro 5cm x 89cm; 1.75L de volumen Amersham Pharmacia Bitech).

Antes de añadir el extracto crudo, se tiene que equilibrar la columna por gravedad, con un tampón de fosfato de sodio de 5 mM (pH 7,2) con 0,3 M NaCl. Con todo ello obtenemos diferentes fracciones de 11,5 mL cada una. Las fracciones se recogen en tubos de ensayo que se encuentran en un colector que gira según se van separando. Estas fracciones se analizaron

por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Previamente medimos la absorbancia de todas las fracciones obtenidas con el espectrofotómetro de UV-Vis a dos longitudes de onda: a 409 nm y a 280 nm.

6.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) se lleva a cabo utilizando el método de LaemmLi (1970) en un sistema de electroforesis vertical Bio-Rad/Mini-Protean II (100x105x0,75 mm) con una solución de poliacrilamida del 40% de Amresco que contiene 38,96 g de acrilamida y 1,04 g de N,N'-Metilenbisacrilamida. El gel separador contenía: 2,5 mL de acrilamida; 1,25 mL de 1,5 M de Tris HCl, (pH 8,8) 1,5 M; 0,05 mL de SDS al 20%; 1,125 mL de H₂O, 0,005 mL de TEMED. El gel compactador contenía 0,6 mL de acrilamida al 40%; 0,75 mL de Tris HCl, (pH 6,8) 0,5 M; 0,03 mL de SDS al 10%, 1,585 mL de agua, 0,005 mL de TEMED y por último 0,05 de APS al 10%. El desarrollo de la electroforesis se realizó durante aproximadamente 80 minutos a una intensidad constante de 20 mA/gel.

La electroforesis se detuvo cuando el azul de bromofenol llegaba a la parte inferior del gel. Como patrones de peso molecular se utilizaron 5 µg de albúmina de suero bovino (66.000 Da), ovoalbúmina (45.000 Da), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29.000 Da), mioglobina de caballo (17.000 Da) y citocromo de bovino (13.000 Da).

Los geles se tiñeron durante 4 horas con una solución que contenía 2 gramos de “Azul Comassie Brillante R250” al 0,1% (isopropanol al 20% y ácido acético al 10%). La decoloración se debe hacer a temperatura ambiente y efectuar el lavado con una solución de ácido acético al 10% - 30% de etanol hasta que se visualicen las bandas de electroforesis.

6.2.4 Cromatografía de intercambio aniónico o Q-Sepharosa

La disolución de extracto de carne se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico en una columna Q-Sepharosa (23,5 x 9 cm; 1,5 L de volumen).

La columna se equilibró con 6 L de solución tampón TrisHCl 10 mM (pH 8,8) a un flujo de 4,8 L/h. A continuación se aplicó la muestra y se lavó la columna con 5,5 L de tampón TrisHCl 10 mM (pH 8,8) y NaCl 0,5 M. Para comprobar que está equilibrada medimos la conductividad del eluato y la del tampón. Ambas conductividades tienen que tener el mismo valor.

Cuando conocemos la conductividad que tiene nuestra solución, preparamos dos soluciones tampón, una sin sal y otra con sal: tampón A (TrisHCl 10 mM (pH 8,8) + NaCl 0,1M Vf =500mL) y tampón B (TrisHCl 10 mM (pH 8,8) con Vf =500 mL). Calculamos el tiempo necesario para recoger todas las fracciones y nos mantenemos a la espera (tengo que recoger 176 fracciones a 7 min cada fracción hace un total de 1232min). Después cargamos en la columna Q-Sepharosa (23.5 x 9 cm; 1,5 L de volumen) mediante una pipeta Pasteur 10 mL de solución de mioglobina sin centrifugar.

Las fracciones se van recogiendo en un colector con ayuda de una bomba peristáltica que bombea el tampón A (con sal) y a continuación el tampón B (sin sal). Por último lavamos la columna Q-Sepharosa, mediante la utilización de una solución tampón TrisHCl 10 mM (pH 8,8) + NaCl 0,5M.

Pasamos a utilizar el HPLC y para ello conservamos nuestra muestra en el frigorífico a 4°C para que las proteínas no se desnaturalicen.

6.2.5 HPLC

En la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la fase móvil es un disolvente líquido (TFA) que fluye a través de una columna de fase reversa (Columna C-4 HPLC) que contiene a la fase fija.

La separación cromatográfica en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria. En la cromatografía en columna cuanto más pequeñas sean las partículas de resina y más empaquetada se encuentren, mejor será la disolución de esta técnica separativa. Las separaciones por HPLC ofrecen una resolución y reproducibilidad extremadamente elevadas. Encendemos el equipo HPLC Breeze de Waters. Lavamos durante cinco minutos con el Solvente A (5% de con agua miliQ + 0,1% TFA) y con 95 % B con un flujo de 1 mL. Hay que controlar la presión que no sea superior a 2 Psi. A continuación, equilibramos la columna durante veinte minutos con 95 % de A y 5% de B con un flujo de 1 mL. Mientras pasan estos veinte minutos centrifugamos a 14.000 rpm ya que la duración del centrifugado es de veinte minutos también. Preparamos la jeringuilla de 500 µL y antes de utilizar lavamos tres veces con metanol y tres veces con agua miliQ y cargamos 1 mL de extracto de carne cruda. Tenemos que tener mucho cuidado de no tener ninguna burbuja en la jeringuilla para que así no entre aire en la columna. Seleccionamos un método adecuado en el que haya un tiempo de sesenta minutos y cargamos nuestra muestra.

6.2.6 Espectrometría de masas ESI-Q-TOF

Esta técnica permite determinar la masa molecular, y por lo tanto es muy útil para la confirmación de la estructura. La masa molecular relativa de la mioglobina se determinó usando un espectrómetro de masas Q-TOF Micro equipado con sistema CapLC (Waters, Manchester, UK). El voltaje del capilar y del cono se fijaron a 3.000 V y a 43 V, respectivamente. La temperatura se mantuvo a 80°C y se utilizó nitrógeno como gas secante (flujo de 50 L/h). Se inyectó la mioglobina purificada por RP-HPLC en el sistema a una concentración de 1 pmol/mL a un flujo de 5 mL/min. La adquisición y deconvolución de datos se hicieron con el software Mass Lynx (Waters, Manchester, UK).

6.2.7 Obtención y tratamiento de la secuencia de los datos

Todas las secuencias utilizadas en este trabajo están disponibles en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Solamente se utilizaron aquellas secuencias que contenían toda la cadena polipeptídica de la mioglobina, desechando las secuencias que no estaban completas. La metionina del extremo amino-terminal se eliminó en aquellos casos en los que estaba presente.

6.2.8 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la mioglobina

Las secuencias de aminoácidos de la mioglobina se alinearon utilizando la aplicación ClustalW de la suite Mega 6 (versión 6.0; <http://www.megasoftware.net>) (Tamura et al. 2013). Se utilizaron los parámetros estándar (default) y se revisó y ajustó manualmente la alineación para que fuera la máxima. El alineamiento de las secuencias se representó gráficamente mediante un logo creado con el programa WebLogo 3 (<http://weblogo.threeplusone.com/>) (Crooks et al. 2004).

6.2.9 Análisis filogenético de la mioglobina

La historia evolutiva de la mioglobina en los mamíferos se dedujo usando el método Maximum Likelihood (máxima verosimilitud) basándose en un modelo que utiliza la matriz de Dayhoff (Schwarz & Dayhoff 1979). El árbol consenso bootstrap se dedujo de 1000 repeticiones (Felsenstein 1985) y se considera que representa la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein 1985). El porcentaje de árboles repetidos en los cuales los taxones aparecen juntos en el test bootstrap se indica en las ramificaciones de la figura 16 (Situada en las páginas 64 y 65) (Felsenstein 1985). El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimada usando un modelo JTT (Jones Taylor Thornton) y seleccionando la topología con un valor mayor del logaritmo de la similitud. Todas las posiciones con espacios o falta de datos fueron eliminadas. El análisis evolutivo se realizó con Mega 6 (Tamura et al. 2013).

6.2.10 Modelado molecular de la mioglobina y representación gráfica

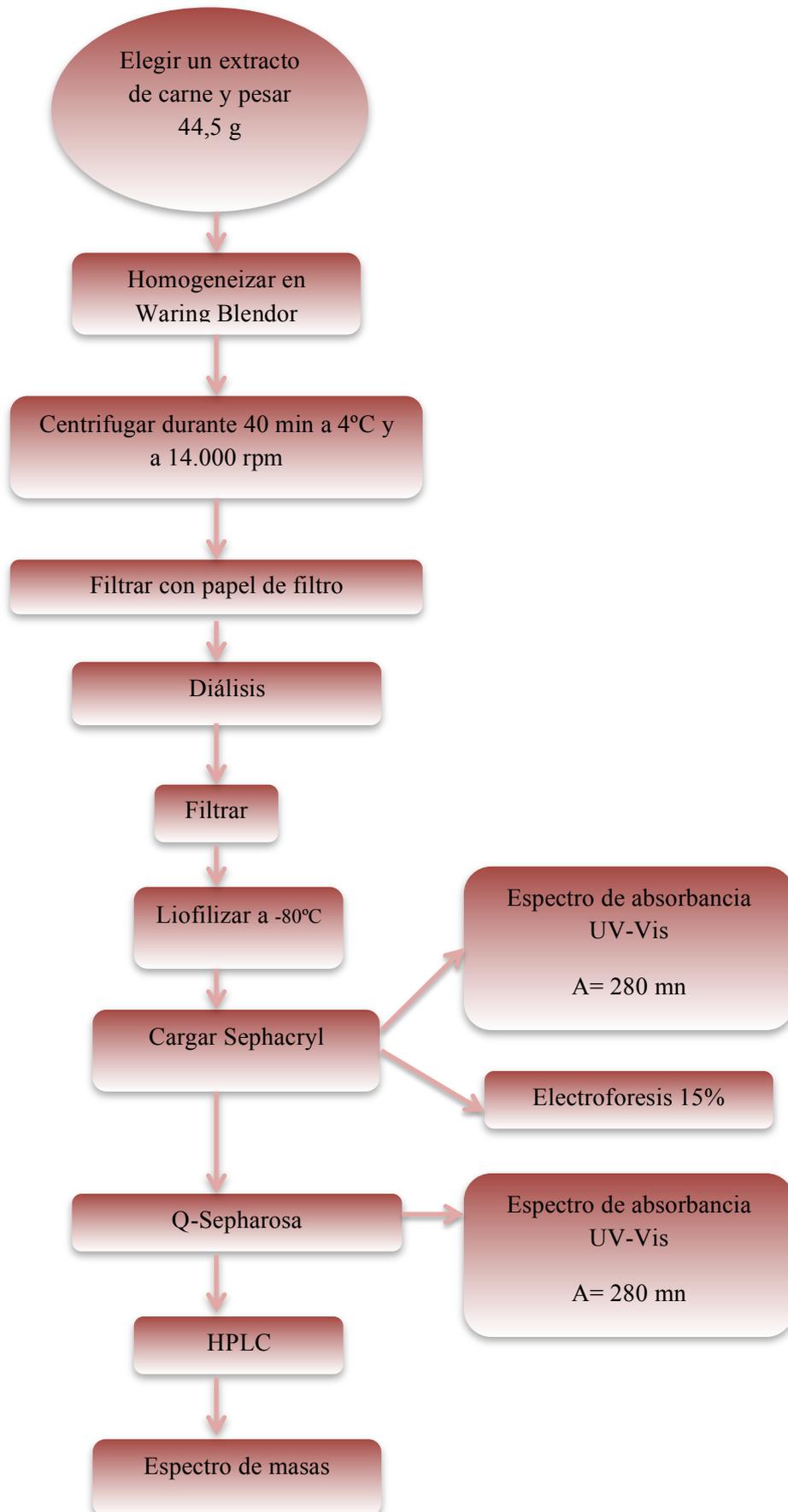
El modelado de la estructura tridimensional de la mioglobina de reno se realizó en el servidor I-TASSER (Roy et al., 2010); <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>).

Como molde se utilizaron las estructuras de la mioglobina de *Physeter macrocephalus* L. (números de acceso 1cio, 1ajg, y 1naz), *Caretta caretta* L. (números de acceso 1lht, y 1lhs), *Homo sapiens* L. (número de acceso 1ut0) y *Equus caballus* L. (número de acceso 1azi). Las estructuras de la mioglobina de *Physeter macrocephalus* (cachalote, número de acceso 1mbn) y *Caretta caretta* (tortuga boba, número de acceso 1lht) están disponibles en el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

El estudio y representación gráfica de la estructura de las proteínas se hizo con la suite Discovery Studio 3.5 suite (<http://accelrys.com/>).

Resultados

Diagrama de flujo de la purificación



7.1 Preparación del extracto de carne de reno

La mioglobina se purificó, como se observa en el diagrama de flujo anterior, a partir de 44,5 g de carne de reno. Después de centrifugar 30 mL de la disolución homogeneizada y triturada con Waring Blendor, se obtuvo una solución de proteínas que denominamos extracto crudo. El extracto crudo se somete a diferentes cromatografías hasta que se obtiene su peso molecular (16.924 Da). A partir de este punto hicimos varias cromatografías. La primera cromatografía es la de exclusión molecular.

7.2 Cromatografía de exclusión molecular

Con la cromatografía de exclusión molecular se separan moléculas en virtud de sus diferencias de tamaño y por lo tanto de su peso molecular. La capacidad separadora reside en el gel cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas. Estas esferas están constituidas por largas cadenas de polímeros unidas entre si por enlaces químicos para formar una red tridimensional. En este caso el extracto crudo está formado por una mezcla de proteínas. En esta cromatografía observamos que la hemoglobina se separa de la mioglobina por diferencia de peso. Se utiliza una columna de Sephacryl S-100 High Resolution (diámetro 5cm x 89cm; 1,75 L de volumen Amersham Pharmacia Bitech). En la parte inferior de la columna, en tono más claro, se observa la hemoglobina (64.000Da) y por encima a ésta la mioglobina (17.800Da).



Figura 3. Cromatografía de exclusión molecular.

A continuación se determina por espectrofotometría de UV-Vis (absorbancia frente al número de fracción).

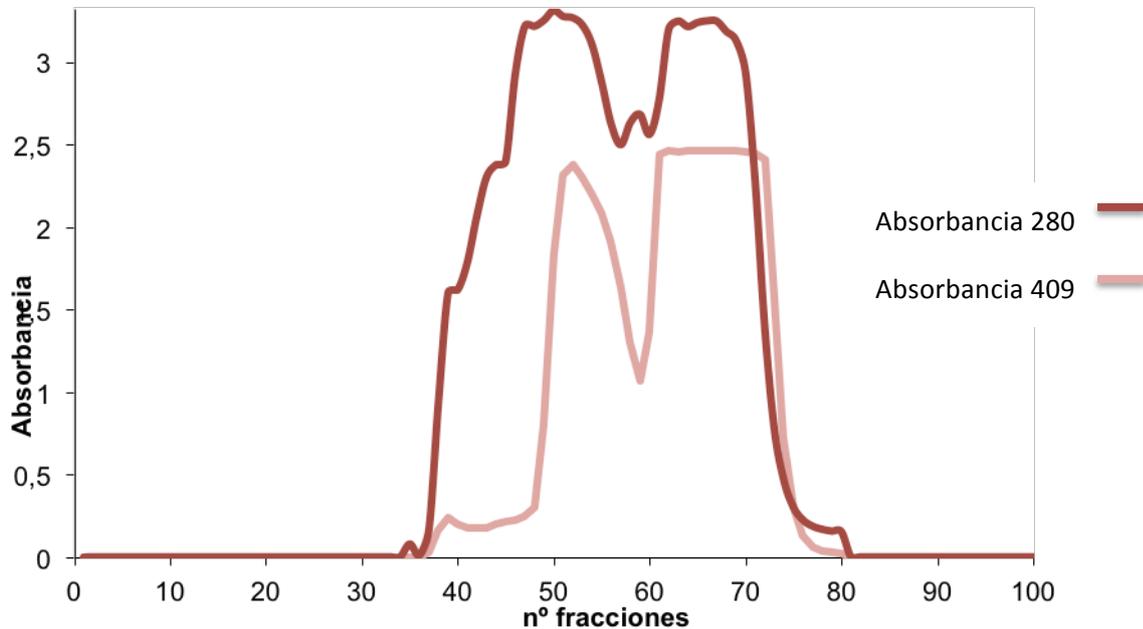


Figura 4. Cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-100.

De la fracción 61 a la fracción 72 inclusive observamos que a una absorbancia de 409 nm (rojo claro) hay mioglobina. Sin embargo de la fracción 48 a la 59 hay hemoglobina.

Las longitudes de onda usadas en el espectro de UV-Vis son: 280 nm para ver las proteínas y 409 nm para ver el grupo hemo. Se observan cuatro partes diferenciadas; Parte 1: de la fracción 1 a la 48 que son prácticamente incoloras y en la absorbancia, su valor es cero (No contienen ni mioglobina ni hemoglobina). Parte 2: de la fracción 48 a la 59, que hacen referencia a la hemoglobina. Parte 3: de la 61 a la 72, que son las fracciones en las que se encuentra la mioglobina y los citocromos. Parte 4: De la 72 en adelante, en las que al igual que en la parte uno, observamos un descenso de valores hasta llegar al cero.

Las moléculas de mayor tamaño saldrán primero, por lo que la hemoglobina que tiene cuatro subunidades, a diferencia de la mioglobina, sale primero es el momento en el que la empezamos a separar.

7.3 Electroforesis de la cromatografía de exclusión molecular

La electroforesis se basa en el desplazamiento de las proteínas cargadas en un campo eléctrico. Se utiliza para purificar proteínas en pequeñas cantidades. Es de suma importancia como método analítico ya que permite a la investigación hacer una estimación rápida del número de proteínas y de la masa molecular de las mismas.

Todas las fracciones de las partes 1, 2 y 4 las mantenemos a 4°C para que no se desnaturalicen. Nuestro nuevo extracto proteico queda conformado por las fracciones 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70 y 72. Las fracciones 62 y 69 no las utilizamos porque como vemos en la figura 4, sus absorbancias se encuentran entre medias del resto de fracciones y al disponer de tan sólo de diez calles para hacer la electroforesis, desechamos las fracciones que no nos van a aportar una información distinta de las restantes. En la primera calle tenemos que poner el patrón de referencia.

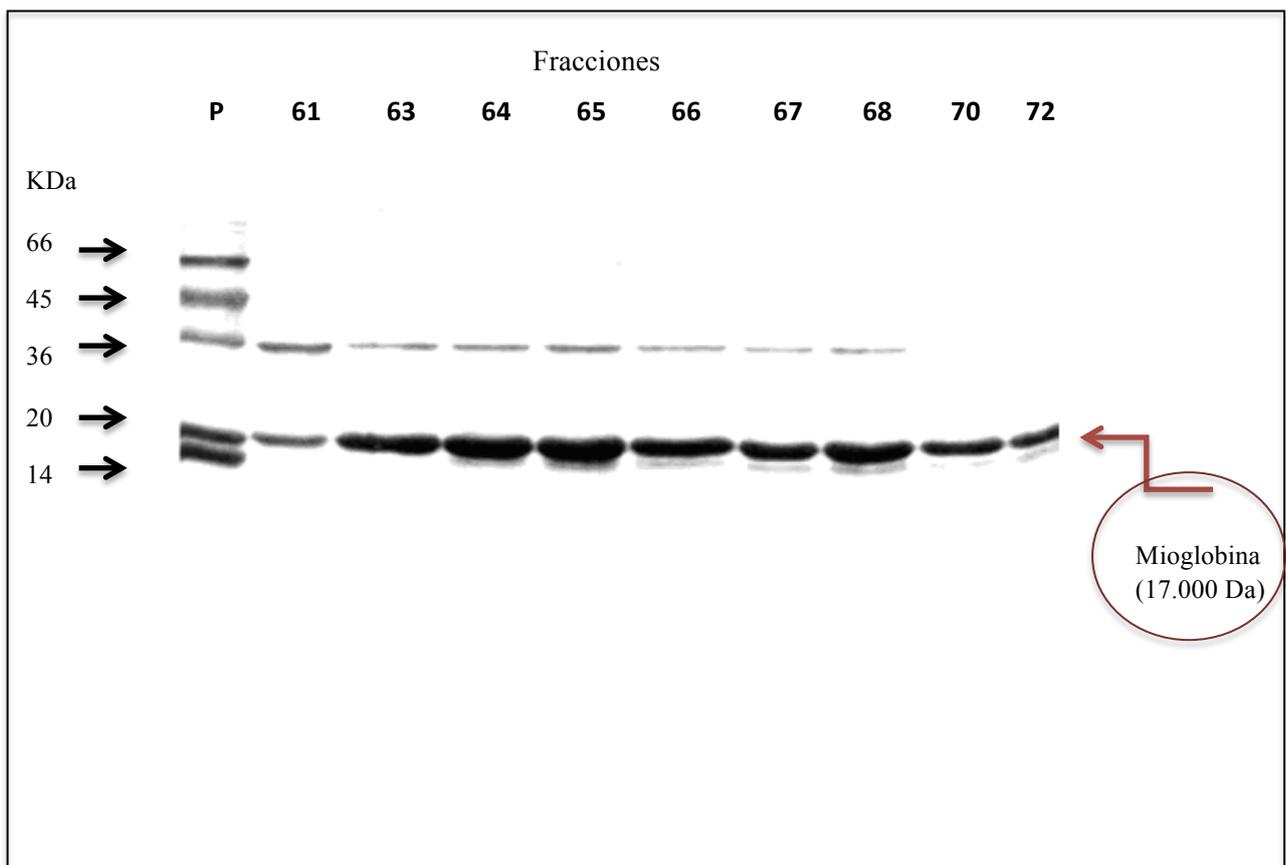


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE). P = proteína Patrón (5µg). En estas fracciones tendremos citocromos y hemoglobina y tomando un patrón vemos que podemos tener mioglobina.

Con la cromatografía en columna de intercambio aniónico y con la electroforesis observamos que en las fracciones 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70 y 72 es donde se encuentra una mayor cantidad de mioglobina.

Por lo tanto, hacemos una diálisis con un cambio en una probeta de plástico que contiene 2L de agua y al día siguiente otro cambio en TrisHCl 10 mM (pH 8,8) manteniendo dicha probeta en el frigorífico para que se mantengan a 4°C y así no se desnaturalicen las proteínas.

Después de la diálisis el volumen que se obtiene es de 57 mL. Se decide hacer otro tipo de cromatografía, la cromatografía en Q-Sepharosa para separar mejor las proteínas.

7.4 Cromatografía en Q-Sepharosa

Para realizar la cromatografía en Q-Sepharosa hay que controlar que la columna esté equilibrada con la medida de la conductividad ($\Omega = 0,18 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$), midiendo la del eluato y comparándola con la del tampón. Una vez obtenido los valores hay que hacer una tabla con ellos y elaborar la representación gráfica de los mismos. Cuando conocemos la conductividad que tiene nuestra solución, preparamos dos soluciones tampón, una sin sal y otra con sal: tampón A (TrisHCl 10 mM (pH 8,8) + NaCl 0,1 M $V_f = 500 \text{ mL}$) y el tampón B (TrisHCl 10 mM (pH 8,8) con $V_f = 500 \text{ mL}$) y a continuación calculamos el tiempo necesario para recoger todas las fracciones (hay que recoger 176 fracciones a 7 min cada fracción hace un total de 1.232min).

A continuación medimos la absorbancia de la fracción 110 a la 121 porque es en las que observamos colores, es decir, donde hay absorbancia.

Número de fracción	Absorbancia 280 nm	Absorbancia 409 nm
110	0,0073	0.0034
111	0,0582	0.1520
112	0,4481	1.3347
113	1,0355	2.3672
114	1,3626	2.4479
115	1.3262	2.4438
116	1,0993	2.4107
117	0,6852	2.0263
118	0,3266	1.0122
119	0,0709	0.2350
120	0,0362	0.1102
121	0,0326	0.0857

Tabla 7. Tabla de Absorbancias del UV-Vis de la Q-Sepharosa.

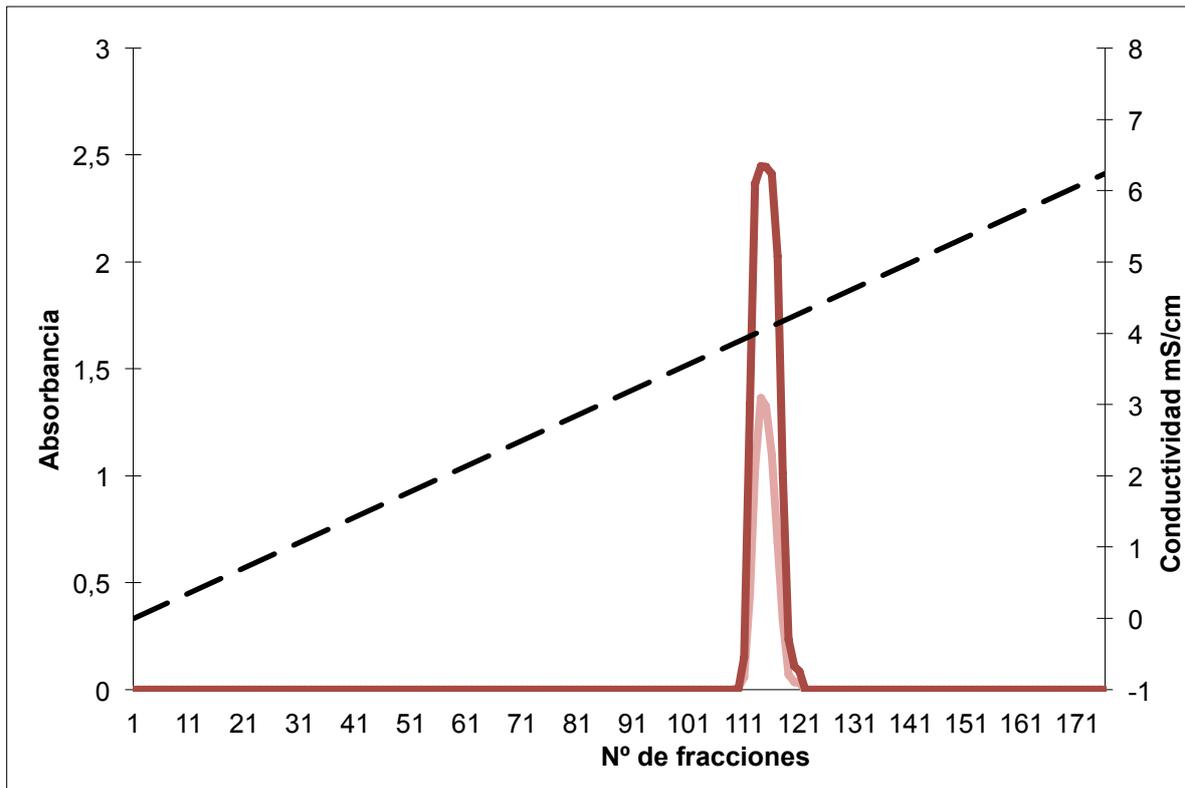


Figura 6. Cromatografía en Q-Sepharosa . Se miden las absorbancias de las fracciones 110 a la 121, a dos longitudes de onda; a 280 nm (Línea roja oscura) para ver las proteínas y a 409 nm (Línea roja clara), porque a 409 nm se ve el grupo hemo. Observamos que se han separado la mioglobina de la hemoglobina. Los valores de la conductividad se representan con una línea discontinua.

7.5 Electroforesis de la cromatografía en Q-Sepharosa

Después de hacer la cromatografía en Q-Sepharosa tomamos las fracciones de la 112 a la 118 incluidas porque es dónde observamos que ha aparecido la mioglobina a una absorbancia de 409 nm, desechamos las fracciones 110, 111, 119, 120 y 121 porque no tenían mioglobina.

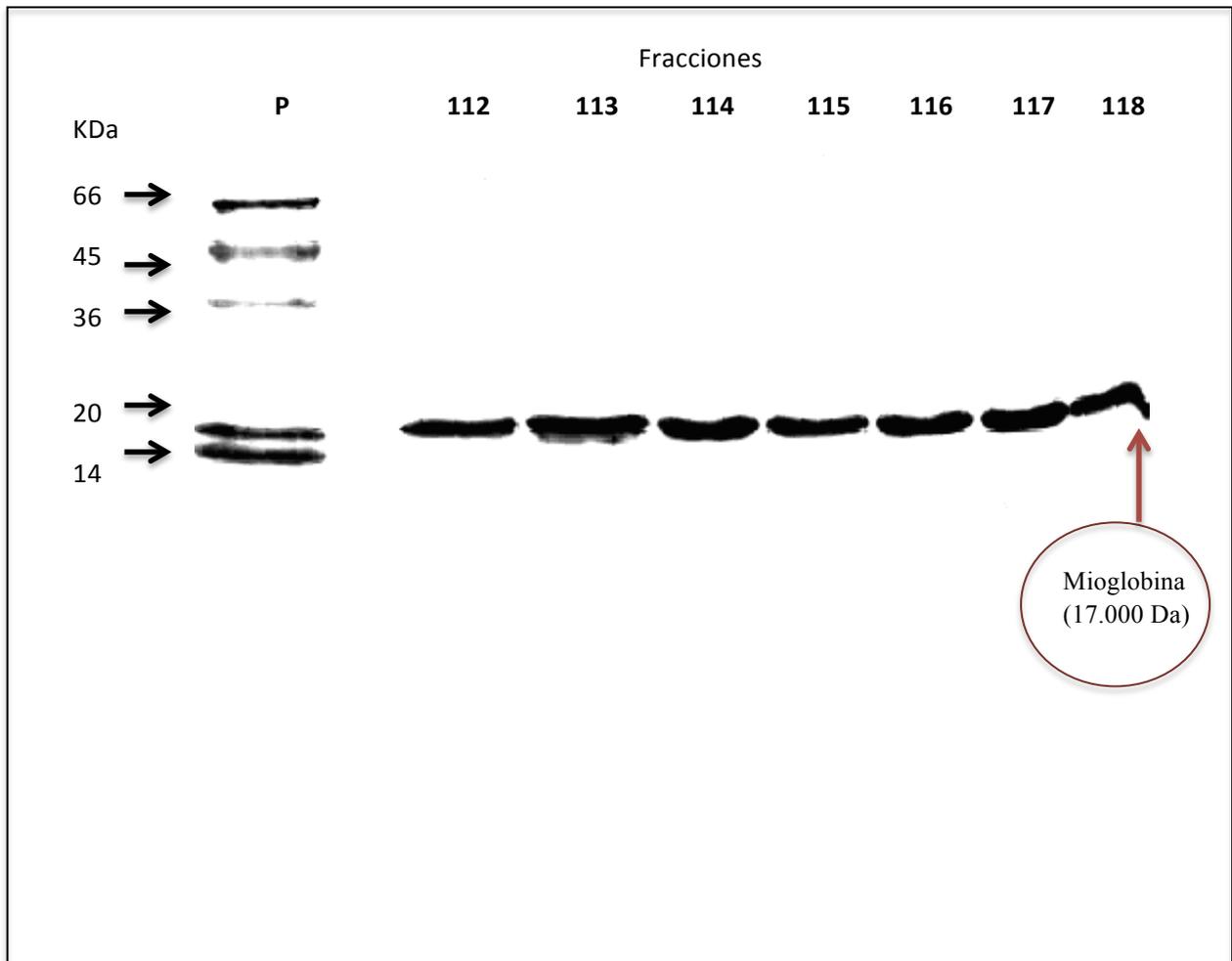


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) de la cromatografía en Q-Sepharosa. P = proteína Patrón (carga 10 mL de extracto crudo).

En las calles cargamos las fracciones 112, 113, 114, 115, 116, 117 y 118. En la fracción 113 correspondiente a la calle 2, vemos que hay citocromos porque su banda es más ancha y que a 17.000 Da tenemos la mioglobina. Al final, en la calle 7, se observa contaminación por lo que no aparece una línea recta. Sabemos que tenemos ya mioglobina y la hemos separado de la hemoglobina. A continuación pasamos a hacer el HPLC.

7.6 HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)

Cargamos 100 μg de extracto crudo, es decir, en base a la absorbancia ($A=0,1$) cargamos 1 mL. En primer lugar hacemos un blanco con 1 mL de metanol y vemos que el tiempo de elución de la apomioglobina (sin el grupo hemo) es de 33 minutos y lo recogemos en el eppendorf n° 3, que es en el momento que observamos un pico creciente y el eppendorf n°4 uno descendente.

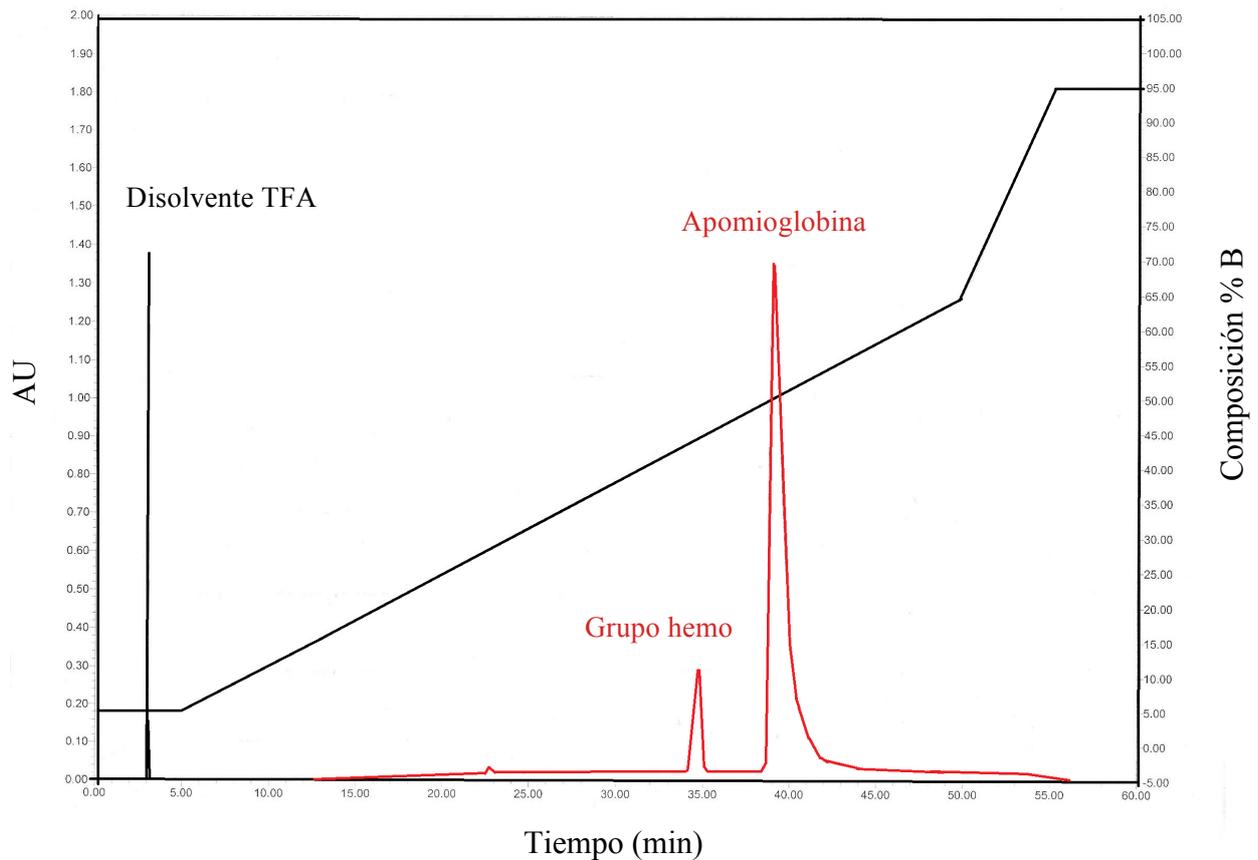


Figura 8. HPLC. Cromatografía líquida de alta resolución. El eje de coordenadas x corresponde al tiempo de elución de la columna. Cuando la mioglobina ya no tiene grupo hemo, se llama apomioglobina. Esta técnica nos sirve para purificar y separar el grupo hemo de la apomioglobina,

7.1 Espectro de masas

Para finalizar la purificación de la mioglobina de reno necesitamos conocer su masa molecular y para ello utilizamos un espectrómetro de masas Q-TOF Micro equipado con sistema CapLC (Waters, Manchester, UK). Para realizar este ensayo necesitamos unas condiciones determinadas: Voltaje del capilar a 3.000 V. Voltaje del cono a 43 V. La Temperatura a 80°C. Nitrógeno como gas secante (flujo de 50 L/h). Para desarrollar el ensayo inyectamos la mioglobina purificada por RP-HPLC en el sistema a una concentración de 1 pmol/mL a un flujo de 5 mL/min. La adquisición y deconvolución de datos se hicieron con el software Mass Lynx (Waters, Manchester, UK).

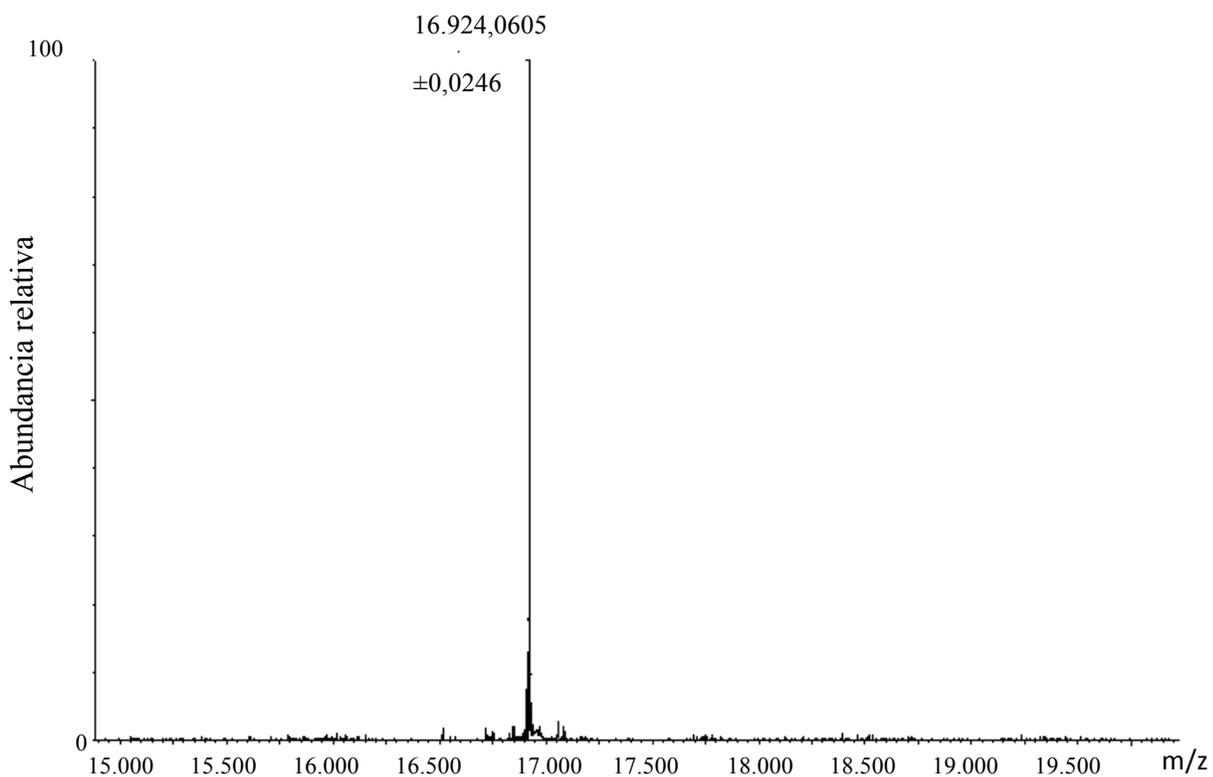


Figura 9. Espectrometría de masas (ESI-Q-TOF). En la figura se observa un pico a 16.924 dalton que es el peso molecular de la mioglobina de reno.

7.8 Secuencia de la mioglobina de reno

La mioglobina de reno presentó una masa de 16924 Da, dos daltons mayor que la que teóricamente corresponde con la de la secuencia de la mioglobina del ciervo común o ciervo europeo (*Cervus elaphus* L., número de acceso P02191), especie que como el reno pertenece a la familia Cervidae. Por eso tomamos esta secuencia como la secuencia de la mioglobina de reno. Un análisis posterior llevado a cabo por el grupo del Dr. Antimo Di Maro, realizado mediante la digestión con proteasas y una combinación de técnicas de espectrometría de masas confirmó esta secuencia (comunicación personal del Dr. Di Maro). La secuencia se muestra en la Fig. 10 comparada con la secuencia de la mioglobina de cachalote, que es la proteína más estudiada y mejor conocida. Como se puede observar las dos proteínas tienen 153 aminoácidos y una homología del 82%. La mioglobina de reno tiene una secuencia similar a la de la mioglobina de cachalote con solamente 28 aminoácidos diferentes. Los aminoácidos diferentes están muy conservados o moderadamente conservados y solamente cuatro aminoácidos no están conservados.

```

Rangifer_tarandus  GLSDGEWQLVLNAWGKVEADVAGHGQEVLIIRLFTGHPETL 40
Physeter_catodon  VLSEGEWQLVLHVWAKVEADVAGHGQDILIRLFKSHPETL 40
                   **:*****:.*.*****:*****.*****

Rangifer_tarandus  EKFDKFKHLKTEAEMKASEDLKKHGNTVLTALGGILKKG 80
Physeter_catodon  EKFDKFKHLKTEAEMKASEDLKKHGVTVLTALGAILKKG 80
                   ****:***** *****.*****

Rangifer_tarandus  HHEAEVKHLAESHANKHKIPVKYLEFISDAIIHVLHAKHP 120
Physeter_catodon  HHEAELKPLAQSHATKHKIPIKYLEFISEAIIHVLHSRHP 120
                   *****:* **:***.*****:*****:*****:***

Rangifer_tarandus  SNFGADAQGAMSKALELFRNDMAAQYKVLGFQG 153
Physeter_catodon  GDFGADAQGAMNKALELFRKDIAAKYKELGYQG 153
                   .:*****.*****:***:** **:**

```

Figura 10. Secuencia de la mioglobina de reno. La secuencia de la mioglobina de reno se compara con la de la mioglobina de cachalote. Se indican los aminoácidos idénticos (*), muy conservados (:) y moderadamente conservados (.).

7.9 Comparación con otras mioglobinas de mamífero

La secuencia de la mioglobina de reno se comparó con todas las secuencias de mioglobina de mamíferos conocidas. En la Fig. 11 se muestra un logo que compara las secuencias de la mioglobina de 151 especies de mamífero. La mioglobina es una proteína muy conservada ya que está altamente especializada en transporte de oxígeno. Todas las mioglobinas de mamífero tienen 153 aminoácidos, de los cuales 48 son invariables (el 31,4%). Algunos han sido ya descritos como claves para las funciones de la mioglobina. La H93 (histidina proximal) es el aminoácido que se une al Fe (Cammarata & Brodbelt 2014). La H64 (histidina distal) forma enlaces de hidrógeno con el oxígeno evitando que su unión sea irreversible (Cammarata & Brodbelt 2014). Además previene en parte la unión del CO₂. Los aminoácidos K42, A71, L89, L104 e I107 son esenciales para la unión del grupo hemo (del Sol et al 2006). Algunos de estos y otros forman las cavidades Xe1 (L89 y L104), Xe2 (L104 e I107) y Xe3 (L69 e I107) que forman parte del canal interior de la mioglobina que permite el intercambio de gases (del Sol et al 2006). W14 y M131 se han descrito como aminoácidos que participan en las reacciones redox que cataliza la mioglobina (del Sol et al 2006). Algunos se han identificado como aminoácidos que participan en la estructura o la capacidad para intercambiar O₂ o CO₂: W14, K16, H36, L61, L69, I107, S108, A130, F138 y R139 (Cohen et al 2006). L29 evita que se bloquee el CO en el sitio Xe1 (Nierhaus et al 2005). V68 entra en el bolsillo del grupo hemo permitiendo la discriminación entre CO y O₂ (Dantsker et al 2005). Sin embargo nuestro análisis descubre 33 aminoácidos invariables cuya función en la mioglobina de mamíferos está todavía por determinar: E6, W7, V10, L11, E18, G25, L32, F33, P37, E38, T39, K42, F43, L49, L50, M55, L61, G65, A71, L72, G73, K78, A90, A94, K96, H97, K98, E105, I111, F123, A134, L135 y G150. Esto demuestra que a pesar de los numerosos estudios realizados sobre la estructura y función de la mioglobina (hasta el punto que es junto con la hemoglobina la proteína mejor conocida) aún queda mucho por estudiar y descubrir de esta proteína y además abre nuevas vías para investigar la mioglobina señalando nuevos aminoácidos que sin duda desempeñan una función relevante.

En la mioglobina de reno se conservan lógicamente todos los aminoácidos invariables, pero además se conservan también la mayoría de aminoácidos que son mayoritarios en las secuencias de mioglobina (secuencia consenso). Únicamente no se conservan 17 aminoácidos: V13 (A en la mioglobina de reno), L21 (V), K34 (T), S51 (T), D53 (A), L86 (V), P88 (H), Q91 (E), T95 (N), E109 (D), Q116 (H), S117 (A), G121 (S), D122 (N), I142

(M), K145 (Q) y E148 (V). De los cambios, la mayoría son muy conservados o moderadamente conservados (A13, T34, N95, S121) y únicamente hay 3 cambios no conservados (A53, H88, V148). Estos cambios le podrían conferir unas características estructurales y funcionales diferentes a la mioglobina de reno respecto a otras mioglobinas de mamífero.

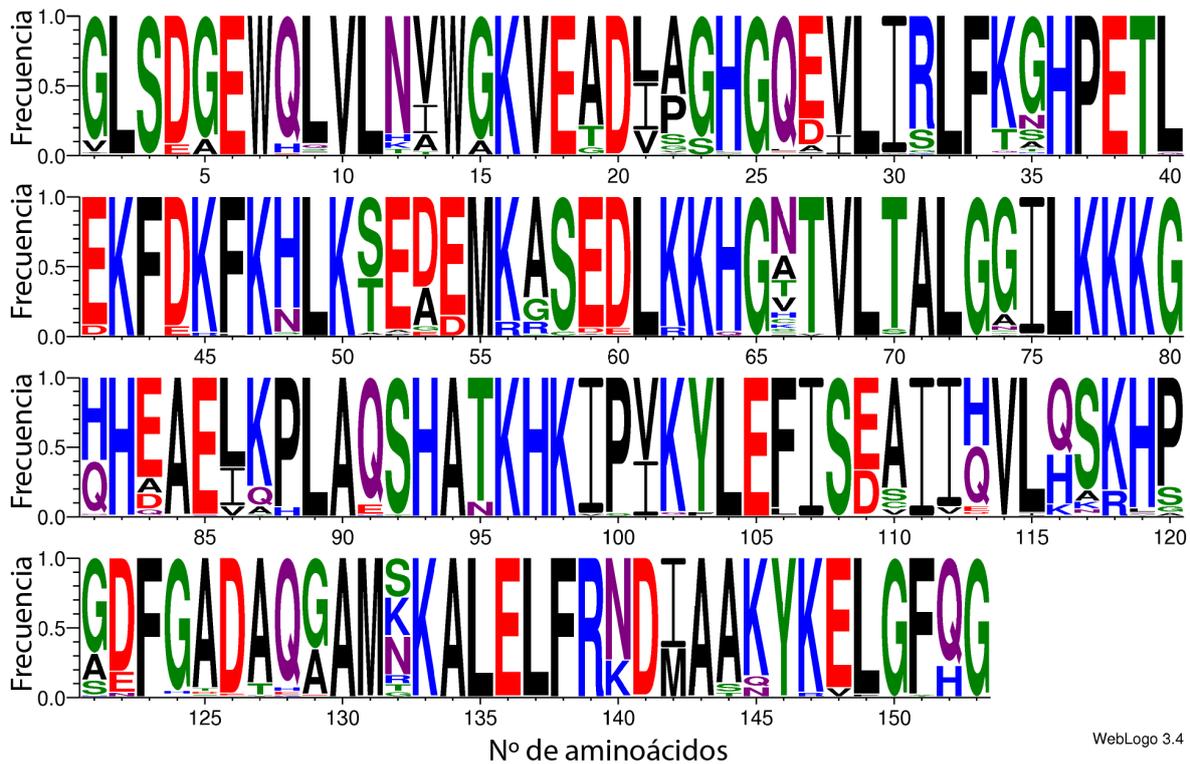


Figura 11. Logo de la secuencia de la mioglobina de los mamíferos. La figura compara la secuencia de la mioglobina de 151 especies de mamíferos. La altura de las letras representa la frecuencia del aminoácido en una posición determinada y la anchura la frecuencia pero sin considerar las deleciones. Se indican también los aminoácidos hidrofóbicos (negro), neutros (morado), polares (verde), básicos (azul) y ácidos (rojo).

7.10 Estructura de la mioglobina de reno

Para estudiar las principales características estructurales de la mioglobina de reno se construyó un modelo de estructura 3D por modelado comparativo utilizando el servidor I-TASSER (Roy et al., 2010). Como molde se utilizaron las estructuras de la mioglobina de *Physeter macrocephalus* (cachalote), *Caretta caretta* (tortuga boba), *Homo sapiens* (hombre) y *Equus caballus* (caballo). El modelo seleccionado presentó un C-score = 1,27 (-5 es el valor mínimo e indica un modelo muy malo, 2 es el valor máximo e indica un modelo óptimo; Zhang & Skolnick 2004), un Tm score = $0,89 \pm 0,07$ (un TM-score > 0.5 indica un modelo de topología correcta y un TM-score < 0,17 significa una similitud casual; Zhang & Skolnick 2004) y un RMSD (Root-mean-square deviation) = $2,4 \pm 1,8 \text{ \AA}$, satisfaciendo el rango de los parámetros de modelado molecular. La Fig. 12 muestra el modelo de la estructura de la mioglobina de reno. Está formada por ocho hélices alfa unidas por lazos tal y como se ha descrito para la mioglobina de otros mamíferos (Cammarata & Brodbelt 2014). En el amino terminal presenta una extensión de tres aminoácidos (G1, L2 y S3). La hélice A abarca desde el aminoácido 4 al 19. El aminoácido D20 conecta esta hélice con la hélice B que incluye los aminoácidos desde el 21 al 36. La P37 conecta la hélice B con la C que incluye los aminoácidos desde el 38 al 42. Le siguen el lazo CD (aminoácidos 43 al 51) y la hélice D (aminoácidos 52 al 57). Los aminoácidos S58 y E59 conectan la hélice D con la hélice E (aminoácidos 60 al 77), y el lazo EF (aminoácidos 78 al 82) conecta esta hélice con la hélice F (aminoácidos 83 al 94). A continuación está, el lazo FG (aminoácidos 95 al 100), la hélice G (aminoácido 101 al 118), el lazo GH (aminoácido 119 al 124), y la hélice H (aminoácido 125 al 149). El extremo carboxilo terminal tiene una extensión de cuatro aminoácidos.

Esta estructura es, salvo pequeñas diferencias, muy similar a las de la mioglobina de otras especies de mamíferos. En la Fig. 13 se compara la mioglobina de reno con las mioglobinas de cachalote y tortuga. La estructura de la mioglobina de reno es muy similar a la del cachalote con una RMSD (Root-mean-square deviation) = $0,54 \text{ \AA}$ mientras que la diferencia con la de la tortuga es mayor (RMSD = $0,70$).

Una de las partes más importantes de la mioglobina es el bolsillo hidrofóbico que une el grupo hemo (Cammarata & Brodbelt 2014). En la mioglobina de reno este bolsillo está formado por 21 aminoácidos: L29, L32, F33, T39, K42, F43, H64, T67, V68, A71, L72, I75,

L89, S92, H93, H97, I99, P100, Y103, L104 e I107 (Fig. 14). La mayoría de ellos son aminoácidos hidrofóbicos y los que no lo son tienen los grupos hidrofílicos alejados del grupo hemo (Fig. 14). La única excepción es la H93 (histidina proximal), cuyo N1 forma un enlace con el átomo de Fe del grupo hemo (Fig. 15). Como se puede ver en la figura, la disposición de esta histidina es diferente cuando no lleva unido el grupo hemo, y gira ligeramente para unirse al átomo de Fe de este grupo. El O₂ se une al Fe y además forma un enlace con la H64 o histidina distal (Fig. 15).

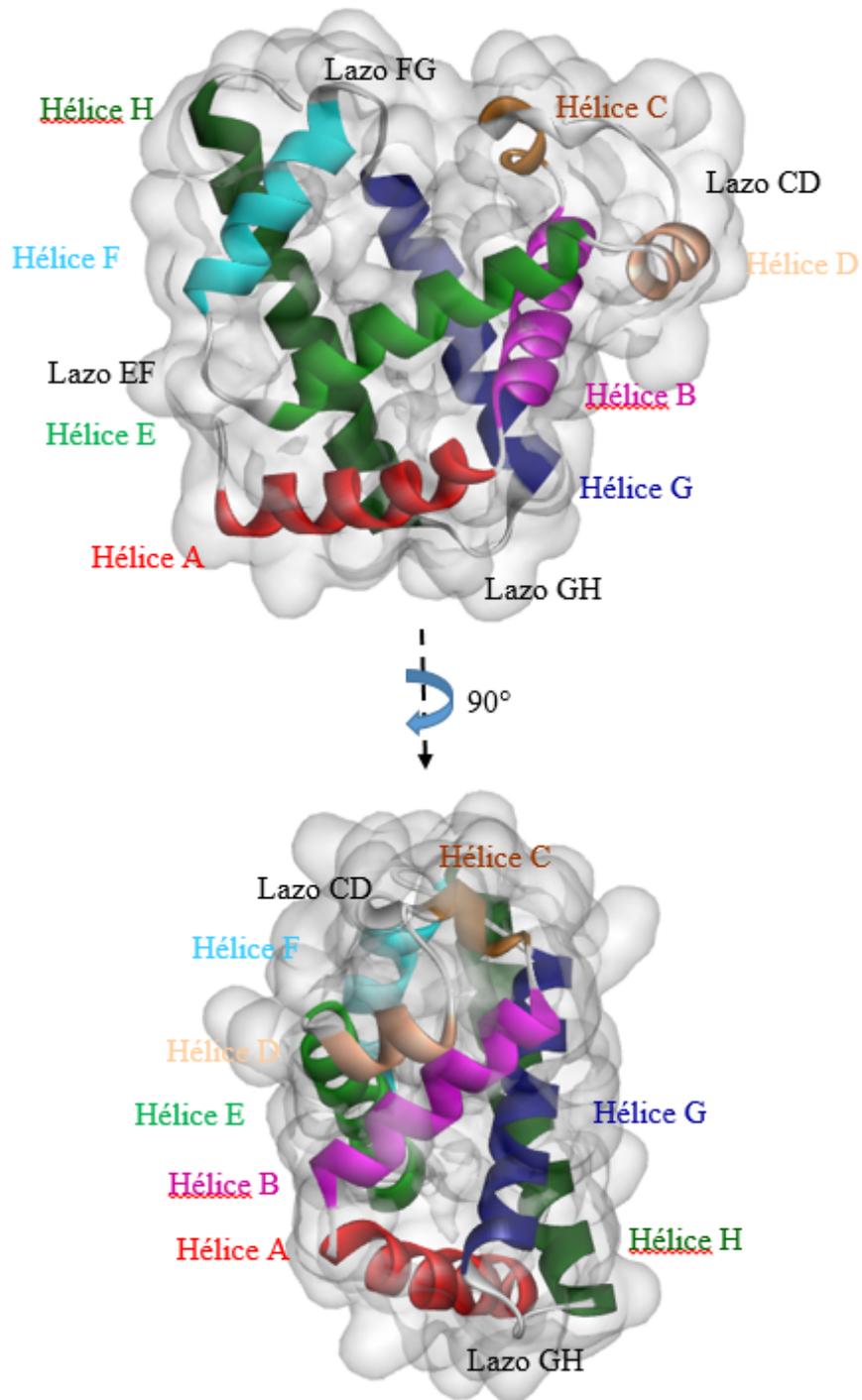


Figura 12. Estructura tridimensional de la mioglobina de reno. En la figura se representan la superficie de la proteína y las estructuras secundarias.

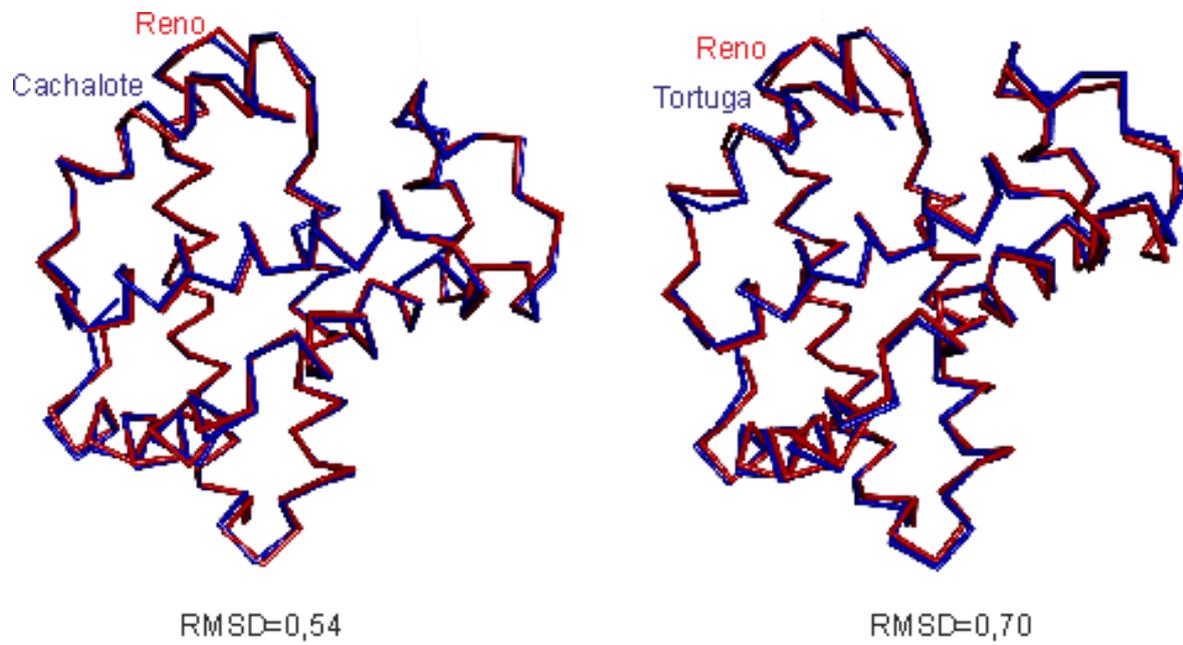


Figura 13. Comparación de la estructura de la mioglobina de reno con las estructuras de la mioglobina del cachalote y la tortuga. Se representa una línea que une los carbonos alfa de color rojo (reno) o azul (cachalote y tortuga). Se indican también los valores RMSD (Root-mean-square deviation) en ångströms.

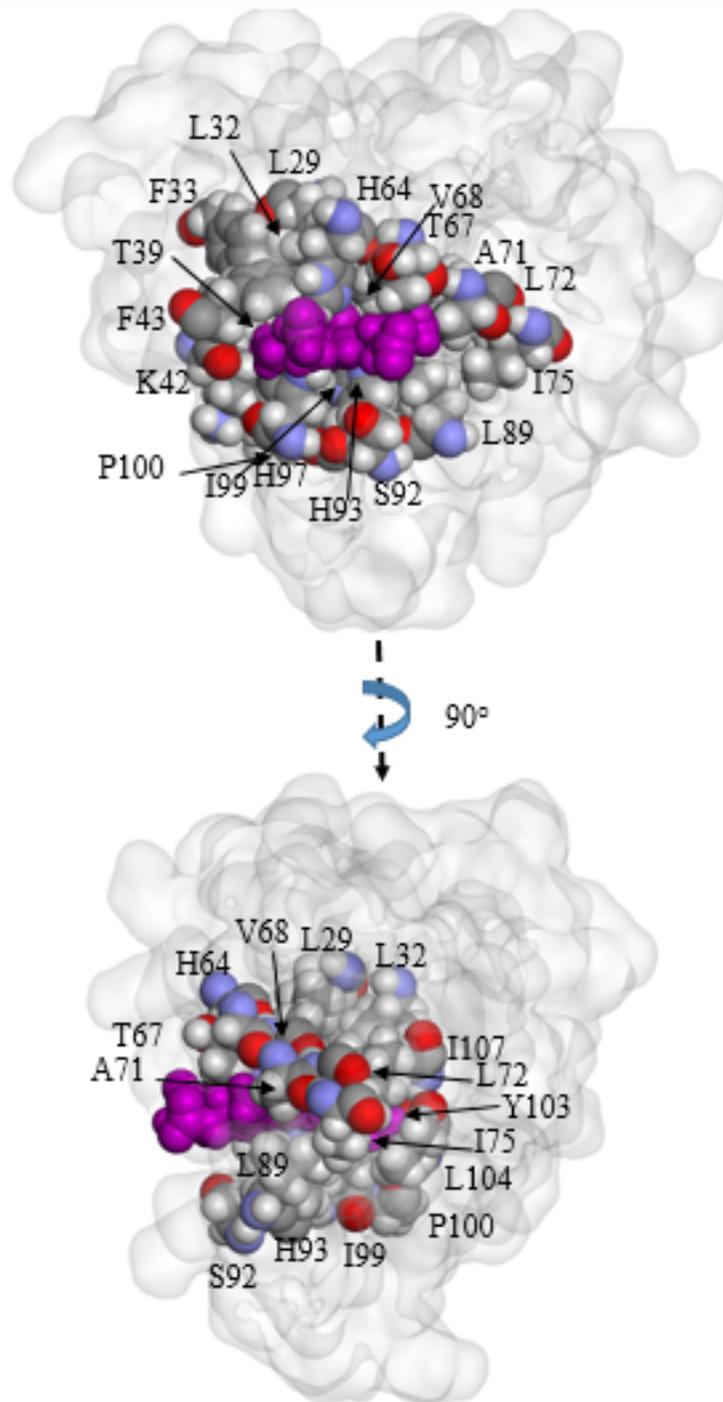


Figura 14. Bolsillo hidrofóbico de la mioglobina de reno en el que se inserta el grupo hemo (representado en color morado).

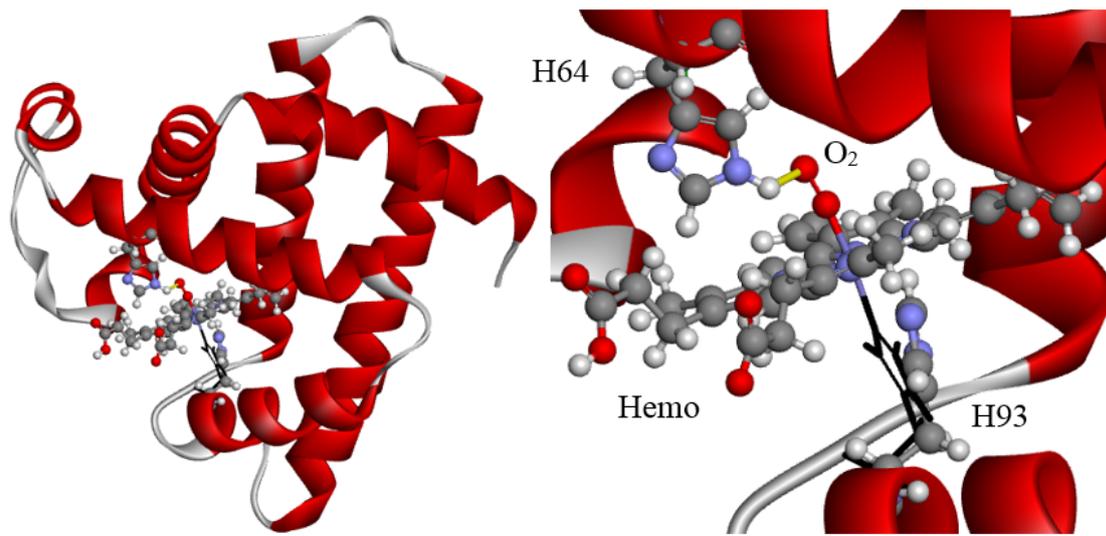


Figura 15. Grupo hemo de la mioglobina de reno (derecha) y detalle ampliado (izquierda). Se muestra como se une el Fe a la histidina proximal (H93) y como se une el oxígeno al Fe. Se forma un enlace de hidrógeno entre la histidina distal (H64) y el oxígeno (representado de color amarillo). La histidina proximal gira ligeramente cuando se une al grupo hemo (representada en negro).

7.11 Evolución de la mioglobina en los mamíferos

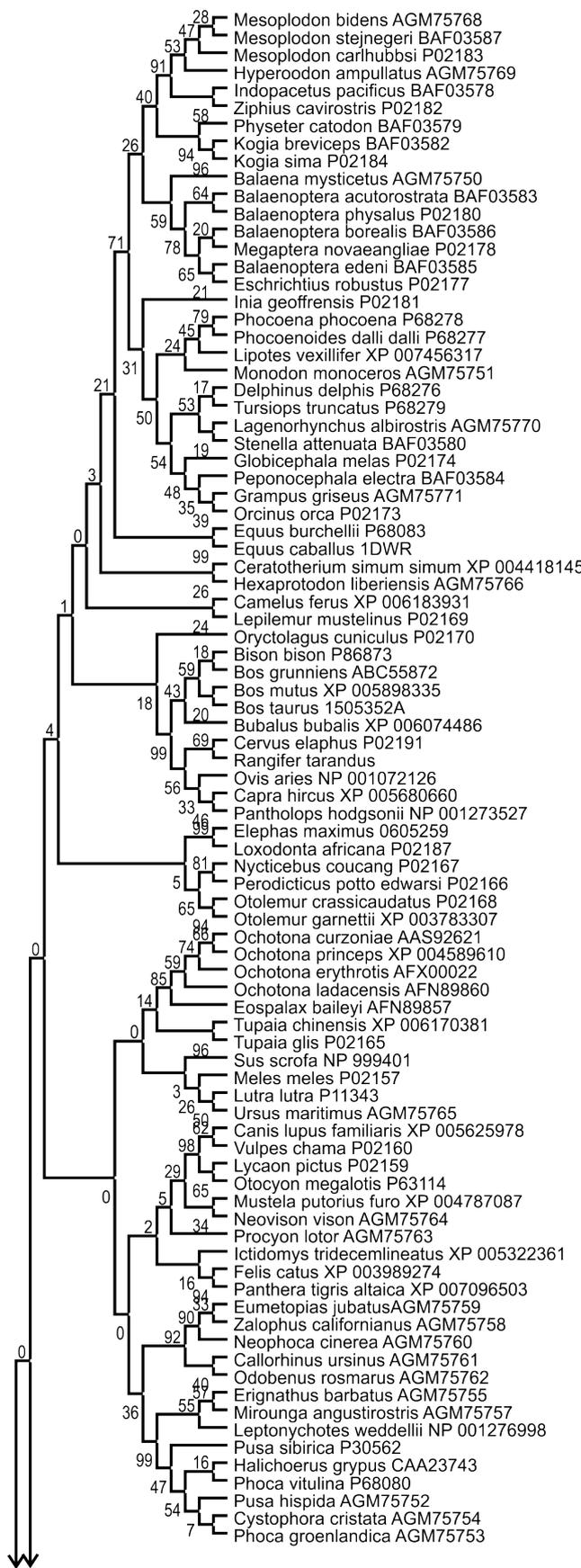
La historia evolutiva de la mioglobina en los mamíferos se dedujo usando el método Maximum Likelihood. Esta es la primera vez que se hace un análisis de este tipo. Se utilizaron las secuencias de la mioglobina de 151 especies de mamíferos pertenecientes a 73 familias y 21 órdenes diferentes (Fig. 16). Se compararon también con secuencias representativas de otros vertebrados, diez de peces, ocho de reptiles y nueve de aves. Se utilizaron las secuencias de la mioglobina de cinco especies de moluscos como grupo externo para enraizar el árbol (Fig. 16). La Fig. 16 representa un árbol consenso bootstrap que se dedujo de 1000 repeticiones. El porcentaje de árboles repetidos en los cuales los taxones aparecen juntos en el test bootstrap se indica en las ramificaciones de la figura. Estos valores, en general, son bastante altos lo que indica que el árbol es fiable, aunque en varias ramificaciones los valores son bajos y hay que considerar dichas ramificaciones con cautela. Las mioglobinas más primitivas son las de los peces, a estas les siguen por orden de antigüedad las de los reptiles, aves y finalmente los mamíferos. Esta parte del árbol es muy fiable, pues los valores del test bootstrap varían entre 42 y 95. Por lo tanto la mioglobina fue evolucionando a la vez que los vertebrados fueron evolucionando desde los peces al resto de vertebrados.

En la Fig. 17 se muestra un árbol que representa la evolución de los distintos órdenes de mamíferos para que se pueda comparar con la evolución de la mioglobina. Dentro de los mamíferos la mioglobina ha ido evolucionando, en parte, a medida que se han ido diversificando las especies. Así, por ejemplo, las especies pertenecientes a los órdenes de los cetáceos, carnívoros, roedores, primates, monotremados y marsupiales (*Didelphimorpha* y *Dasyuromorpha*) aparecen agrupadas con las de su orden en la misma rama del árbol filogenético.

Las mioglobinas de monotremados y marsupiales son las más primitivas (Fig. 16), tal y como se refleja también en la evolución de los mamíferos (Fig. 17). Además, por ejemplo, las mioglobinas de los cetáceos aparecen relacionadas con las de los perisodáctilos. Sin embargo las mioglobinas de los artiodáctilos se dividen en dos clados, uno de ellos relacionado con las de los cetáceos y perisodáctilos y otra con las de los carnívoros. Pero estas no están relacionadas con las de cetáceos ni perisodáctilos. Sin embargo en la mayoría de los casos no existe la misma relación entre los clados de las mioglobinas y sus correspondientes en la

evolución de los mamíferos. Por ejemplo, las mioglobinas de los quirópteros aparecen relacionadas con las de los primates, cuando estos taxones se encuentran distantes en la evolución de los mamíferos. En otros casos taxones relacionados en la evolución de los mamíferos aparecen separados cuando se comparan sus mioglobinas.

Todo esto indica que aunque, en parte, ha habido una diversificación de las mioglobinas a medida que se diversifican las especies, en su mayor parte la evolución de las mioglobinas se ha producido de manera independiente, muy probablemente debido a que han ido evolucionando adaptándose a las necesidades fisiológicas particulares de cada especie.



Familia	Orden
<i>Ziphiidae</i>	Mamíferos
<i>Physeteridae</i>	
<i>Kogiidae</i>	
<i>Balaenidae</i>	
<i>Balaenopteridae</i>	
<i>Eschrichtiidae</i>	
<i>Iniidae</i>	
<i>Phocoenidae</i>	
<i>Iniidae</i>	
<i>Monodontidae</i>	
<i>Delphinidae</i>	
<i>Equidae</i>	
<i>Rhinocerotidae</i>	
<i>Hexaprotodon liberiensis</i>	
<i>Camelidae</i>	
<i>Lepilemuridae</i>	
<i>Leporidae</i>	
<i>Bovidae</i>	
<i>Cervidae</i>	
<i>Bovidae</i>	
<i>Elephantidae</i>	
<i>Lorisidae</i>	
<i>Galagidae</i>	
<i>Ochotonidae</i>	
<i>Spalacidae</i>	
<i>Tupaiaidae</i>	
<i>Suidae</i>	
<i>Mustelidae</i>	
<i>Ursidae</i>	
<i>Canidae</i>	
<i>Mustelidae</i>	
<i>Procyonidae</i>	
<i>Sciuridae</i>	
<i>Felidae</i>	
<i>Otariidae</i>	
<i>Odobenidae</i>	
<i>Phocidae</i>	

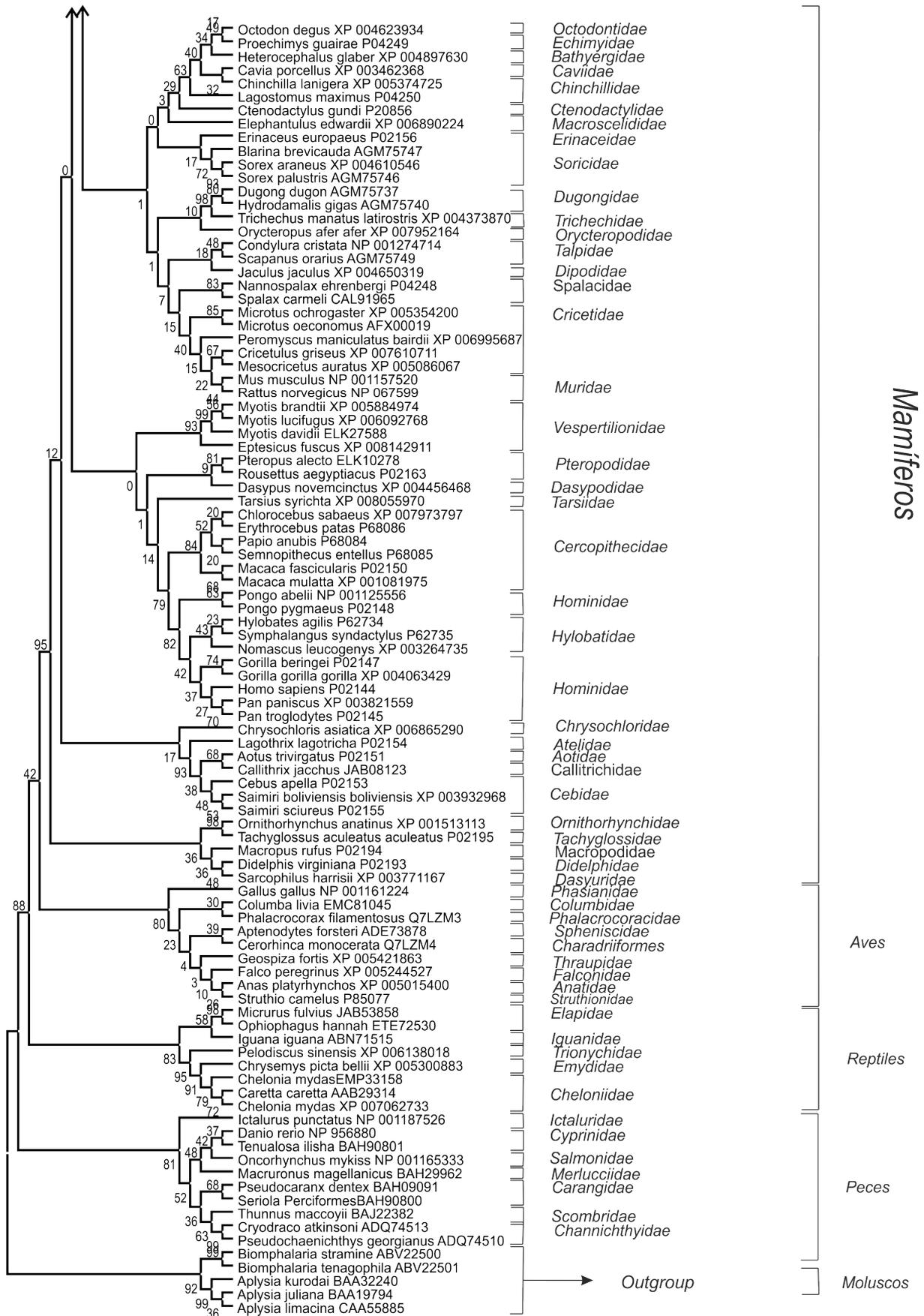


Figura 16. Filogenia de las mioglobinas de los mamíferos.

Filogenia de las mioglobinas de los mamíferos (Figura 16). La historia evolutiva de la mioglobina en los mamíferos se dedujo tal y como se indica en la sección experimental usando el método Maximum Likelihood. El árbol consenso bootstrap se dedujo de 1000 repeticiones y se considera que representa la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein 1985). El porcentaje de árboles repetidos en los cuales los taxones aparecen juntos en el test bootstrap se indica en las ramificaciones de la figura. Se comparan también algunas mioglobinas representativas de peces, reptiles y aves. Como grupo externo se utilizaron secuencias de mioglobinas de moluscos.

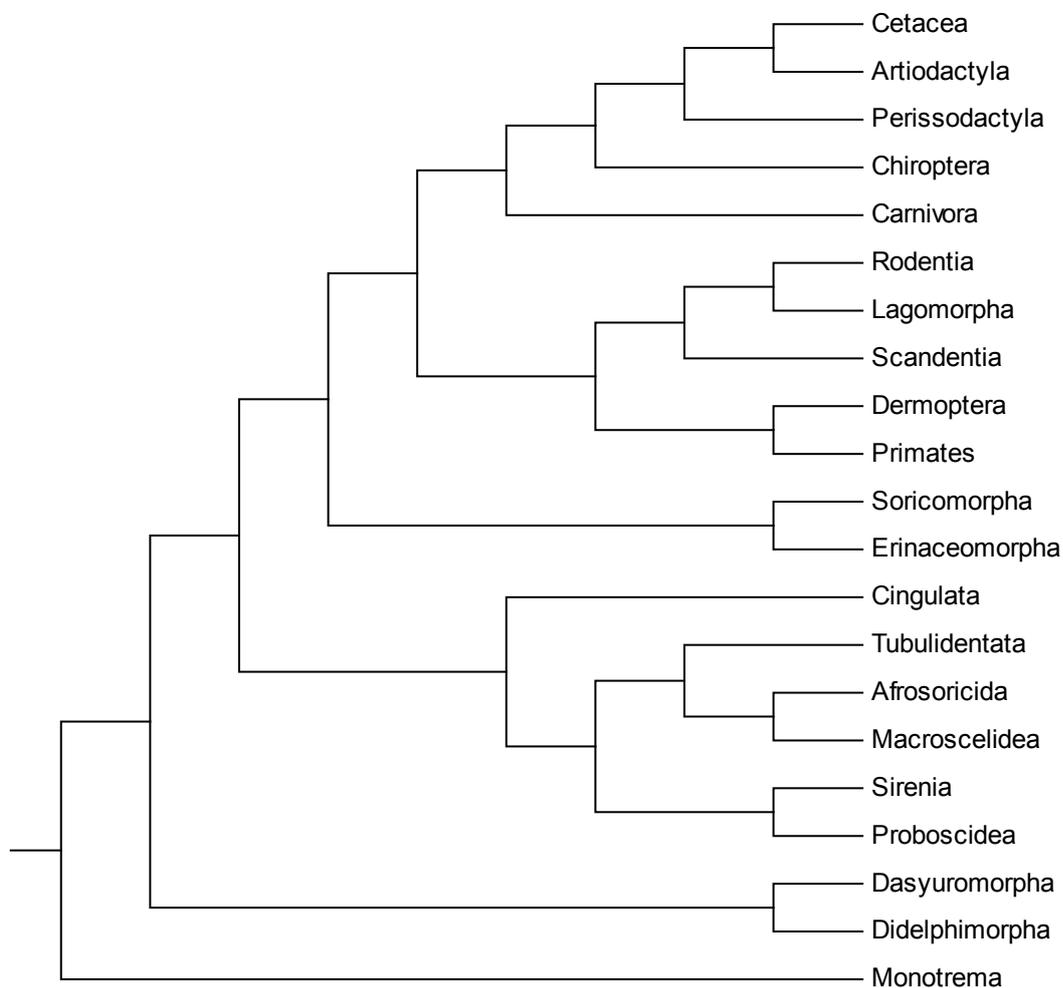


Figura 17. Filogenia de los órdenes de mamíferos representados en la Fig. 16. La figura se ha adaptado de Meredith et al. 2011.

Conclusiones

En el presente trabajo de fin de grado, purificación y caracterización de la mioglobina de reno, se han obtenido las siguientes conclusiones:

Primera. Se ha purificado la mioglobina de reno a partir de un extracto de carne mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-100 y cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharosa.

Segunda. La masa molecular de la mioglobina de reno, obtenida por espectrometría de masas, es de 16.924 Da.

Tercera. La secuencia de la mioglobina de reno coincide con la de la mioglobina del ciervo europeo (*Cervus elaphus* L.).

Cuarta. La mioglobina de reno está formada por ocho hélices alfa y cuatro lazos. En el amino terminal presenta una extensión de tres aminoácidos (G1, L2 y S3). La hélice A abarca desde el aminoácido 4 al 19. El aminoácido D20 conecta esta hélice con la hélice B que incluye los aminoácidos desde el 21 al 36. La P37 conecta la hélice B con la C que incluye los aminoácidos desde el 38 al 42. Le siguen el lazo CD (aminoácidos 43 al 51) y la hélice D (aminoácidos 52 al 57). Los aminoácidos S58 y E59 conectan la hélice D con la hélice E (aminoácidos 60 al 77), y el lazo EF (aminoácidos 78 al 82) conecta esta hélice con la hélice F (aminoácidos 83 al 94). A continuación están, el lazo FG (aminoácidos 95 al 100), la hélice G (aminoácido 101 al 118), el lazo GH (aminoácido 119 al 124), y la hélice H (aminoácido 125 al 149). El extremo carboxilo terminal tiene una extensión de cuatro aminoácidos.

Quinta. El grupo hemo se inserta en un bolsillo hidrofóbico formado por 21 aminoácidos en los que predominan las cadenas laterales apolares.

Sexta. La comparación de las secuencias de mioglobina de los mamíferos muestra la presencia de 48 aminoácidos invariables de los cuales solamente se ha descrito la función de 15.

Séptima. La mioglobina de reno presenta 17 cambios respecto a la secuencia consenso de los cuales tres son cambios no conservados (A53, H88, V148).

Octava. El análisis filogenético de la mioglobina de mamíferos muestra que esta proteína ha evolucionado debido a la divergencia de las distintas especies pero sobre todo debido a las necesidades fisiológicas específicas de los distintos animales.

Referencias

Bibliografía

Brunori M. *Nitric oxide moves myoglobin centre stage*. **Trends Biochem Sci**. 2001 Apr; 26(4):209-10.

Canbay E, Sahin B, Kiran M, Akyilmaz E. *MWCNT-cysteamine-Nafion modified gold electrode based on myoglobin for determination of hydrogen peroxide and nitrite*. **Bioelectrochemistry**. 2015 Feb; 101: 126-31. doi: 10.1016/j.bioelechem.2014.09.001.

Conley KE1, Jones C. *Myoglobin content and oxygen diffusion: model analysis of horse and steer muscle*. **Am J Physiol**. 1996 Dec;271(6 Pt 1):C2027-36.

Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) *WebLogo: a sequence logo generator*. **Genome Res** 14:1188–1190.

del Sol A1, Fujihashi H, Amoros D, Nussinov R. *Residues crucial for maintaining short paths in network communication mediate signaling in proteins*. **Mol Syst Biol**. 2006;2:2006.0019.

Felsenstein J (1985) *Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap*. **Evolution** 39:783–791.

Giaretta N, Di Giuseppe AM, Lippert M, Parente A, Di Maro A. *Myoglobin as marker in meat adulteration: a UPLC method for determining the presence of pork meat in raw beef burger*. **Food Chem**. 2013 Dec 1;141(3):1814-20. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.124.

Guo C1, Sun H, Zhao XS. *Myoglobin within graphene oxide sheets and Nafion composite films as highly sensitive biosensor*. **Sens Actuators B Chem**. 2012 Mar 31;164(1-2):82-89.

Hendgen-Cotta UB, Kelm M, Rassaf T. *Myoglobin functions in the heart*. **Free Radic Biol Med**. 2014 Aug;73:252-9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.005.

Hochachka PW. *Two research paths for probing the roles of oxygen in metabolic regulation*. **Braz J Med Biol Res**. 1999 Jun;32(6):661-72.

Kooyman GL1, Ponganis PJ. *The physiological basis of diving to depth: birds and mammals*. **Annu Rev Physiol**. 1998;60:19-32.

Liu CY, Hu JM. *Hydrogen peroxide biosensor based on the direct electrochemistry of myoglobin immobilized on silver nanoparticles doped carbon nanotubes film*. **Biosens Bioelectron**. 2009 Mar 15;24(7):2149-54. doi: 10.1016/j.bios.2008.11.007.

Meredith RW1, Janečka JE, Gatesy J, Ryder OA, Fisher CA, Teeling EC, Goodbla A, Eizirik E, Simão TL, Stadler T, Rabosky DL, Honeycutt RL, Flynn JJ, Ingram CM, Steiner C, Williams TL, Robinson TJ, Burk-Herrick A, Westerman M, Ayoub NA, Springer MS, Murphy WJ. *Impacts of the Cretaceous Terrestrial Revolution and KPg extinction on mammal diversification*. **Science**. 2011 Oct 28;334(6055):521-4. doi: 10.1126/science.1211028.

Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. *I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction*. **Nat.Protoc**. 5, 725-738.

Schwarz R. and Dayhoff M. (1979). *Matrices for detecting distant relationships*. In Dayhoff M., editor, Atlas of protein sequences, pages 353-58. **National Biomedical Research Foundation**.

Sidell BD, Vayda ME, Small DJ, Moylan TJ, Londraville RL, Yuan ML, Rodnick KJ, Eppley ZA, Costello L. *Variable expression of myoglobin among the hemoglobinless Antarctic icefishes*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1997 Apr 1;94(7):3420-4.

Song HN, Jang JH, Kim YW, Kim DH, Park SG, Lee MK, Paek SH, Woo EJ. *Refolded scFv Antibody Fragment against Myoglobin Shows Rapid Reaction Kinetics*. **Int J Mol Sci**. 2014 Dec 18;15(12):23658-71. doi: 10.3390/ijms151223658.

Spiro TG1, Kozlowski PM. *Is the CO adduct of myoglobin bent, and does it matter?* **Acc Chem Res**. 2001 Feb; 34(2): 137-44.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. **Molecular Biology and Evolution**30: 2725-2729.

Wang Q, Liu F, Yang X, Wang K, Wang H, Deng X. *Sensitive point-of-care monitoring of cardiac biomarker myoglobin using aptamer and ubiquitous personal glucose meter*. **Biosens Bioelectron**. 2015 Feb 15;64:161-4. doi: 10.1016/j.bios.2014.08.079.

Zhang and Skolnick, *Scoring function for automated assessment of protein structure template quality*. **Proteins**, 2004 57: 702-710.

Anexos

10.1 Listado de tablas

Número de tabla	Contenido de la tabla	Página
Tabla 1	Cantidad de proteínas en función de los diversos animales	24
Tabla 2	Lista de objetivos	26
Tabla 3	Lista de equipos de laboratorio	31
Tabla 4	Lista de materiales	32
Tabla 5	Lista de soluciones	34
Tabla 6	Lista de software y bases de datos	36
Tabla 7	Tabla de Absorbancia del UV-Vis de la Q-Sepharosa	49

10.2 Listado de figuras

Número de Figura	Contenido de la Figura	Página
Figura 1	Estructura de la mioglobina del cachalote	19
Figura 2	Representación del grupo hemo	21
Figura 3	Cromatografía de exclusión molecular	45
Figura 4	Cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-100	46
Figura 5	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE)	47
Figura 6	Cromatografía en Q-Sepharosa	49
Figura 7	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) de la cromatografía en Q-Sepharosa	50
Figura 8	HPLC. Cromatografía líquida de alta resolución	51
Figura 9	Espectrometría de masas (ESI-Q-TOF)	52
Figura 10	Secuencia de la mioglobina de reno	53
Figura 11	Logo de la secuencia de la mioglobina de los mamíferos	55
Figura 12	Estructura tridimensional de la mioglobina de reno	58
Figura 13	Comparación de la estructura de la mioglobina de reno con las estructuras de la mioglobina del cachalote y la tortuga	59

Figura 14	Bolsillo hidrofóbico de la mioglobina de reno en el que se inserta el grupo hemo	60
Figura 15	Grupo hemo de la mioglobina de reno (derecha) y detalle ampliado (izquierda)	61
Figura 16	Filogenia de las mioglobinas de los mamíferos	64 y 65
Figura 17	Filogenia de los órdenes de mamíferos representados en la figura 16	66