

# Trabajo final de carrera

**Mariana Pejo**

**Orientadora: Dra. Ivanna Tomasco**

**Laboratorio de Evolución  
Facultad de Ciencias, Udelar  
2019**



**UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY**

# Adaptaciones moleculares en la $\beta$ -globina de roedores Octodontoideos.

## Resumen

En la superfamilia de roedores caviomorfos Octodontoidea existen dos linajes independientes donde han evolucionado recientemente a estilos de vida totalmente subterráneos: el género *Ctenomys* (tucu-tucus) y el género *Spalacopus* (coruro). El hábitat subterráneo se caracteriza por ser hipóxico (bajo en oxígeno) e hipercápnico (alto en dióxido de carbono), por lo que el intercambio de gases es uno de los desafíos más importante que enfrentan estos animales. La invasión del nicho subterráneo podría haber modificado los regímenes selectivos de proteínas involucradas en la respiración y el transporte de  $O_2$  de estos roedores, seleccionando positivamente alguna de éstas proteínas. Aquí examinamos la variación de secuencia en el gen de la subunidad beta de la hemoglobina en estos dos linajes, dentro de un contexto filogenético robusto. Para identificar señales de selección se utilizó el test  $\omega$ , y se utilizaron diferentes métodos: el más conocido que compara la proporción de cambios sinónimos (dS) y no sinónimos (dN) en las secuencias, utilizando máxima verosimilitud e inferencia bayesiana (PAML / Datamonkey) y métodos alternativos que evalúan el impacto en las propiedades fisicoquímicas del reemplazo aminoacídico (TreeSAAP). En forma congruente, los tres métodos encontraron al menos 3 sitios bajo selección, concentrándose más en los linajes subterráneos, especialmente en la rama basal que conduce a la familia Octodontidae y en la rama que conduce al coruro, sugiriendo algunos cambios adaptativos a la vida subterránea.

## Introducción

En la superfamilia de roedores caviomorfos Octodontoidea existen dos linajes independientes que han evolucionado recientemente a estilos de vida totalmente subterráneos. El género *Ctenomys*, perteneciente a la familia Ctenomyidae, cuyas especies son conocidas comúnmente como tucu-tucus, y el género *Spalacopus*, incluido en la familia hermana Octodontidae, el cual es monotípico y cuya única especie *S. cyanus* es conocida como coruro (Patton *et al.*, 2015).

Se reconoce que los tucu-tucus y el coruro presentan una amplia gama de adaptaciones con relación a la excavación, que van desde comportamientos hasta cambios en la morfología. Las especies excavadoras han pasado por profundos cambios fisiológicos, así como también en la conformación de su sistema mioesquelético, ya que durante los períodos de intensa actividad de excavación es necesario producir y transmitir gran fuerza (Lessa *et al.*, 2008). Dentro de la familia Octodontidae, el coruro ha evolucionado a una vida completamente subterránea y ha adquirido numerosos cambios morfológicos en los últimos 2 a 3 millones de años (Ma) (Lessa *et al.*, 2008). A diferencia de estos últimos, en Ctenomyidae (familia hermana de Octodontidae), los tucu-tucus, han acumulado cambios asociados a la vida subterránea en forma de mosaico a lo largo de varios linajes, en un proceso que ha tomado al menos 8 Ma (Lessa *et al.*, 2008). Una ventaja es que la relación filogenética de estos roedores subterráneos con las especies no subterráneas más emparentadas está bien establecida (Upham y Patterson, 2012).

Sin embargo, el vivir debajo de la tierra implica más retos. La composición de los gases de las galerías subterráneas es muy diferente a la que se encuentra en la atmósfera sobre el suelo. Según estudios realizados, la atmósfera subterránea se caracteriza por ser hipóxica (baja en oxígeno) e hipercápnica (alta en dióxido de carbono), por lo que el intercambio de gases es uno de los desafíos más importantes que subyace en este tipo de hábitats (Buffenstein, 2000). Por lo tanto, estos grupos ofrecen una gran oportunidad de estudiar la evolución adaptativa de genes involucrados en la respiración como respuesta a la hipoxia del nicho subterráneo. De forma similar a los vertebrados que viven a gran altura, donde la hipoxia hipobárica es un factor de estrés ambiental constante que no puede ser mitigado tan solo por cambios en el comportamiento (Storz *et al.*, 2010), es de esperar en los ambientes subterráneos un escenario similar.

Las adaptaciones a la hipoxia se manifiestan a nivel organismo, a nivel celular y molecular. Las primeras se refieren a estructura, función y eficiencia en órganos respiratorios, mientras que las segundas se refieren principalmente a cambios en la concentración, estructura y función de la hemoglobina y a los ajustes en condiciones de funcionamiento celular (Weber, 2007). La base de la tolerancia a la hipoxia de los vertebrados fue un misterio durante mucho tiempo, pero varios estudios fundamentalmente en aves, mamíferos y anfibios, han arrojado mucha evidencia de que las modificaciones en la función de la hemoglobina estarían cumpliendo un rol esencial en la respuesta a la hipoxia en la vida en las alturas (Storz y Moriyama, 2008). En condiciones de hipoxia severa, los resultados teóricos y experimentales indican que generalmente es ventajoso tener una afinidad elevada de  $O_2$  en sangre (Scott y Milsom, 2006). Por ejemplo, se ha visto que en especies nativas de ambientes de gran altitud, el conjunto de cambios fisiológicos que ayudan a tolerar la hipoxia en su mayoría representan adaptaciones con base genética que han evolucionado bajo la influencia de la selección natural (Weber *et al.*, 1991; Weber, 2007; Storz *et al.*, 2010; Natarajan *et al.*, 2015; Storz *et al.*, 2019).

La hemoglobina (HB) es la proteína transportadora de  $O_2$  en la sangre de los vertebrados. Es un tetrámero, constituida por dos cadenas  $\alpha$  (alfa) y dos cadenas  $\beta$  (beta) (HBB) (Weber, 2007). Bajo una hipoxia severa, aumentar la afinidad por el  $O_2$  en la sangre resuelve varios problemas: ayuda a asegurar el suministro de  $O_2$  en la sangre al mantener la saturación de  $O_2$  arterial y también a preservar el gradiente de presión que impulsa la difusión de  $O_2$  desde los capilares periféricos a las células de los tejidos respiratorios (Natarajan *et al.*, 2015). Para aumentar la afinidad del  $O_2$  en sangre hay varios caminos. Uno de ellos es a través de cambios en la afinidad intrínseca al  $O_2$  de la HB, otro viene dado por cambios en la sensibilidad de la HB a los efectores alostéricos y/o cambios en las concentraciones de los efectores alostéricos dentro del eritrocito (Revsbech *et al.*, 2013). En los glóbulos rojos de mamíferos, el principal efector orgánico de fosfato es el 2,3-difosfoglicerato (DPG), el cual disminuye la afinidad de HB por el  $O_2$  al unirse estereoquímicamente a residuos específicos cargados positivamente en la cavidad central de HB desoxigenada (o estado Tenso de la HB, Arnone, 1972). La estabilización resultante de esta última, desplaza el equilibrio alostérico entre el estado Tenso de baja afinidad y el estado Relajado de alta afinidad en favor de la estructura cuaternaria de baja afinidad estado Tenso (Perutz, 1970). Otros efectores alostéricos que reducen la afinidad de la HB por el  $O_2$  son los iones  $Cl^-$ , así como el  $H^+$  y el  $CO_2$ , que facilitan la descarga de  $O_2$  en los capilares tisulares a través del efecto Bohr (disminución de la afinidad HB –  $O_2$  a pH bajo) (Weber y Fago, 2004). Las funciones de transporte de  $O_2$  de la HB dependen de los efectos homotrópicos (la cooperatividad de las subunidades con la unión de  $O_2$ ) y los efectos heterotrópicos (la sensibilidad de la unión de  $O_2$  a las concentraciones de protones, iones de cloruro,  $CO_2$  y fosfatos orgánicos) (Storz y Moriyama, 2008). Todas estas adaptaciones han sido encontradas en aves, anfibios y reptiles que viven a gran altitud (Winslow, 2007; Weber, 2007). En el estudio de Jessen *et al.*, 1991, se ha argumentado que dichas adaptaciones surgen

de una o unas pocas sustituciones de aminoácidos en posiciones clave, mientras que la mayoría de las sustituciones entre especies son funcionalmente neutrales.

Al ser la atmósfera de las cuevas hipóxica, es posible que la invasión del nicho subterráneo modificara los regímenes selectivos de proteínas involucradas en la respiración y el transporte de  $O_2$  de estos roedores, teniendo como consecuencia selección direccional positiva en alguna variante de éstas. Estudios previos han mostrado que las tasas de sustitución de reemplazo aminoacídicas en el gen del citocromo b mitocondrial de diversos linajes subterráneos estarían aceleradas con respecto a sus parientes de vida superficial (Da Silva *et al.*, 2009). Para roedores octodontoideos subterráneos en particular, se muestra un resultado similar en varias proteínas involucradas en la respiración celular codificadas por el genoma mitocondrial (Tomasco y Lessa, 2011), y con un muestreo más denso se ha mostrado evolución adaptativa en sitios particulares de la subunidad 2 de la citocromo oxidasa (Tomasco y Lessa, 2014). Más recientemente, se ha estudiado la subunidad  $\alpha$  de la HB de estos roedores y específicamente se encontraron 2 sitios con evidencia de selección positiva en la rama basal de Octodontidae, sugiriendo adaptaciones con respecto a la fosforialidad (organismos que excavan cuevas donde viven gran parte de sus días pero también algunas actividades se desarrollan en la superficie), pero no estrictamente a la vida subterránea, ya que además de los organismos subterráneos, en este grupo hay especies fosoriales (Tomasco *et al.*, 2017).

En los estudios anteriores, la herramienta utilizada para identificar la potencial existencia de selección positiva a nivel molecular fue el test dN/dS, el cual consiste en evaluar la relación entre la proporción de cambios sinónimos (dS) y no sinónimos o de reemplazo aminoácido (dN), donde dicho cociente dará un parámetro conocido con la letra griega  $\omega$ . (Yang y Bielawski, 2000). En general, bajo neutralidad, se espera que dS sea mayor que dN en genes codificantes de proteínas, o a lo sumo similares en casos de pseudogenes. Si en cambio, la relación se invierte, y  $\omega$  es mayor a 1, puede ser interpretado como aceleración de fijación de cambios no sinónimos debido a la selección natural positiva, infiriendo que estos cambios son beneficiosos. Por lo tanto, cuando  $\omega$  es significativamente mayor que uno es evidencia convincente para identificar selección positiva, es decir, una adaptación molecular (Nielsen y Yang, 1997).

Si bien los resultados a nivel de la subunidad  $\alpha$  son interesantes, es necesario conocer y estudiar lo sucedido con la subunidad  $\beta$ , para tener un panorama completo de la evolución de la HB en su globalidad, como una proteína funcional. En este estudio se evaluará si la invasión del nicho subterráneo involucró modificaciones adaptativas en el gen que codifica la HBB en roedores octodontoideos, en particular en los géneros de especies subterráneas *Ctenomys* y *Spalacopus*.

## **Materiales y métodos**

### **Especies elegidas**

Para todas las especies, menos *Chinchilla laringera*, se seleccionaron dos individuos por especie como control interno de estar evidenciando sustituciones, y no polimorfismos. Específicamente, se trabajó con especies de dos géneros subterráneos y de otras no subterráneas emparentadas, todas pertenecientes a la superfamilia Octodontoidea. Las especies subterráneas fueron los tucu-tucus (*C. sociabilis*, *C. rionegrenis* y *C. torquatus*) y el coruro (*S. cyanus*). En el caso de las no subterráneas se eligieron a el degu (*Octodon degus*), la rata vizcacha colorada (*Tympanoctomys barrerae*) y la chinchilla (*Chinchilla laringera*). Se

utilizó como grupo externo una especie del género *Cavia* (*C. porcellus*). La elección de 3 especies de tuco-tucos responde a que este género tiene una gran cantidad de especies (69 según Bidau *et al.*, 2015) y con esta selección se intenta poder representar la diversidad interna del grupo: *C. sociabilis* es la hermana del resto de los tucu-tucus, *C. rionegrensis* y *C. torquatus* forman parte de grupos filogenéticamente diferentes (Parada *et al.*, 2011).

### **Obtención de secuencias nucleotídicas y procesamiento**

En muchos casos se trabajó a partir de tejidos conservados en etanol, presentes en el Laboratorio de Evolución de la Facultad de Ciencias (ver tabla 1). En esos casos, se realizó extracción de ADN total a partir de tejidos, usando un protocolo estándar (modificado de Miller *et al.*, 1998). Luego se amplificó el gen HBB mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siguiendo las condiciones primarias sugeridas en Tomasco *et al.*, 2017. Los primers para la PCR fueron diseñados considerando las secuencias consenso flanqueantes a las regiones a amplificar del gen de la HBB, teniendo como referencia la secuencia de *C. porcellus*, ya que la secuencia de este gen se encuentra depositada en la base de datos de GenBank (Voucher de acceso a GenBank:XM\_00346527). Los primers utilizados son: AGO 1F para el cebador forward: 3' ATTCTCACTTGTATAATAAAAAT 5'; y AGO 6R en el caso del reverse: 3' AACTTAGAATAATATATAGCAAAA5'. La PCR se realizó en un volumen total de 10 µl que contenía las siguientes concentraciones finales: 5 µl de ADN (dilución 1:100 de la extracción) usado como molde, 1 µL de Taq Polymerase Buffer 10X, 0,2 µL a 10mM de cada dNTP, 0,2 µL a 10uM de cada cebador, 0,2 µL Taq Polymerase (5U/uL) y 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM). Las amplificaciones por PCR se realizaron en un PXE0.2 Termociclador (Thermo – Electron Corporation), con una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de asociación a 45°C y 30 s de extensión a 72°C, y un extensión final de 2 min a 72° C. En cada corrida de PCR, se incluyó una reacción sin ADN molde, correspondiente al el control negativo. Los productos de PCR se visualizaron mediante una electroforesis en minigeles de agarosa 0.8% en TBE 1X, teñidos con Bromuro de Etidio. Una vez que fue obtenida una banda del tamaño deseado y sin productos secundarios, el producto fue enviado para ser purificado y secuenciado por el método Sanger a MacroGen INC (macrogen.com), a partir de ambos extremos. Las secuencias obtenidas se editaron manualmente en ProSeq (Filatov, 2002), verificando cada cambio, la estructura intrón-exón y la ausencia de codones stop e inserciones / deleciones que generan cambio de marco de lectura. Posteriormente se alinearon con Clustal en MEGAX (Kumar *et al.*, 2018).

Además de la técnica de PCR y secuenciación Sanger para la obtención del gen de la HBB para las especies elegidas, se utilizó la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Tool), para buscar la secuencia más parecida a la HBB de *C. porcellus* en transcriptomas reportados en Genbank para los casos de *C. laringera*, *O. degus* y *C. porcellus* (ver tabla 1). Para el gen de HBB en *C. rionegrensis*, *C. sociabilis*, *C. torquatus* y *S. cyanusse* se realizó una búsqueda de genes homólogos a través del software BLAST utilizando como base de datos transcritomas obtenidos en el Laboratorio de Evolución de Facultad de Ciencias (UdelaR) aún no publicados (Ver tabla 1), los cuales fueron obtenidos con Illumina (macrogen.com)

### **Análisis de selección**

Para establecer la posición de los géneros de la filogenia para este estudio se tuvo en cuenta los árboles propuestos por Upham y Patterson (2012) para los octodontidos y por Parada *et al.* (2011) para las relaciones internas al género *Ctenomys*.

Para identificar selección positiva a nivel molecular, y de esta forma evolución molecular adaptativa en un contexto filogenético se utilizó el test  $\omega$ , el cual compara la proporción dN/dS

(Yang y Bielawski, 2000). El programa Codeml es el más utilizado para este fin y es implementado en el paquete PAML (Phylogenetic Inference with Automatic Likelihood Model) (Yang, 2009). Este es un enfoque conservador e identifica selección natural positiva en sitios (Yang y Nielsen, 1998) o ramas (Yang *et al.*, 2000) con un árbol y una alineación dada. También el programa es capaz de detectar selección natural en sitios y ramas simultáneamente, ya que la evolución adaptativa en su mayoría ocurre en ráfagas episódicas, en unos pocos sitios dentro de un gen y en un número reducido de linajes en un árbol. Esta última opción, llamada “*Branch-site*”, proporciona un marco estadístico para buscar evidencia de selección episódica, pero especificando las ramas donde esta pueda ocurrir *a priori* (ramas “*foreground*”) y en donde no (ramas “*background*”) (Yang y Nielsen, 2002; Yang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Por lo tanto, utilizamos estas tres aproximaciones en la versión PAML4.6. La variación en los valores para  $\omega$  se estimaron: 1) a lo largo de diferentes linajes mientras se mantienen las tasas constantes a través de los codones (Yang y Nielsen, 1998), 2) a través de los codones mientras se mantienen las tasas constantes a lo largo de las ramas (Yang *et al.*, 2000), y 3) simultáneamente a través de los codones y a lo largo de los linajes (Yang y Nielsen, 2002; Yang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Los dos últimos enfoques utilizan probabilidades posteriores bayesianas (BEB) para determinar la probabilidad de que una posición de codón haya experimentado una presión selectiva positiva.

**Tabla 1.** Especies utilizadas, especificando el Voucher de Museo (en el caso de tenerlo), procedencia de la muestra, número de acceso a GenBank y detalle del procedimiento con que fue realizado. Los casos donde el número de acceso a GenBank es XXXXXX, son porque aún no fue subida la secuencia a dicha base de datos. (\*\*\*: Secuencia de *S. cyanus* cedida por Gladyshev V.N, utilizada en el trabajo Fang *et al.*, 2014)

Especie	Voucher/procedencia	GenBank	Procedimiento
<i>C. sociabilis</i>	EAL533 (Universidad de California)	MF169881	BLAST/transcriptoma en GenBank
		SRR488153	BLAST/transcriptoma en GenBank
<i>C. rionegrensis</i>	EV1996 (Lab. de Evolución, Udelar)	XXXXXX	BLAST/ transcriptoma no publicado
	EV1064 (Lab, de Evolución, Udelar)	XXXXXX	PCR y secuenciación Sanger
<i>C. torquatus</i>	EV1925 (Lab. de Evolución, Udelar)	XXXXXX	BLAST/ transcriptoma no publicado
	EV1924 (Lab. de Evolución, Udelar)	XXXXXX	BLAST/ transcriptoma no publicado
<i>O. degus</i>	109251(Universidad Católica de Chile)	XXXXXX	PCR y secuenciación Sanger
	-	XM_00464199	BLAST/transcriptoma en GenBank
<i>S. cyanus</i>	DG657 (Universidad Austral de Chile)	XXXXXX	PCR y secuenciación Sanger
	*** (Lab. de Evolución, Udelar)	XXXXXX	BLAST/ transcriptoma no publicado

<i>T. barrerae</i>	AO73 (MF169894)(CONICET. Argentina)	XXXXXX	PCR y secuenciación Sanger
	AK13811 (MF169894)(IADIZA-CCT)	XXXXXX	PCR y secuenciación Sanger
<i>C. laringera</i>	615717501 (GBDJ01074194)	GBDJ01074194	BLAST/transcriptoma en GenBank
<i>C. porcellus</i>	CP (MF169896)(Inst. Pasteur, Montevideo)	XXXXXX	PCR y secuenciación Sanger
	-	XM_00346527	BLAST/transcriptoma en GenBank

#### Análisis con PAML

##### 1) Modelo de ramas:

Para obtener estimaciones distintas de  $\omega$  para diferentes linajes, realizamos (i) un modelo nulo con un solo  $\omega$  para todas las ramas en la filogenia; (ii) un modelo completo en el que todas las ramas de la filogenia tienen valores de  $\omega$  diferentes, y (iii) modelos de complejidad intermedia que permiten valores de  $\omega$  diferentes para cada clado o rama de interés (filogenética, por ejemplo, por familia y/o “ecológico”, es decir, distinguiendo taxones subterráneos y no subterráneos).

##### 2) Modelo de sitios:

Para explorar la variación de la tasa entre los codones, comparamos la probabilidad de ajuste del modelo bajo selección, llamado M8, contra el modelo sin selección M8a (como el anterior pero con  $\omega=1$ ,  $\omega=1$  en el archivo control), que es la prueba recomendada por los autores (Yang *et al.*, 2000).

##### 3) Modelo de sitios y ramas simultáneamente:

Al buscar selección positiva en sitios individuales a lo largo de linajes específicos simultáneamente, utilizamos dos variantes del Modelo A de “Branch-site” y el LRT ((Likelihood Ratio Test,) entre ellos (Modelo A y Modelo A modificado), también como se recomienda (Yang y Nielsen., 2002; Yang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Como PAML4.6 sólo permite dos tipos de ramas, elegimos realizar comparaciones de variación entre linajes, considerando diferentes combinaciones de linajes subterráneos (las ramas de primer plano, es decir, el coruro, los tuco-tucos o ambos) versus sus contrapartes no subterráneas.

Para los modelos de sitio y sitio y rama, cuando la prueba de verosimilitud fue significativa, se usó el Bayes Empirical (BEB) para identificar las posiciones de codones con probabilidades posteriores mayores a 0,95 de haber experimentado una selección positiva ( $\omega > 1$ ).

En todos los casos, PAML se ejecutó tres veces con diferentes valores de inicio de  $\omega$  (0,4, 1 y 4), como se recomienda en el manual, para verificar múltiples óptimos locales, y el nivel de significación fue de 0,05.

#### Análisis con REL (Random Effect Likelihood) y MEME (Mixed Effect Model of Evolution)

Más recientemente, se han desarrollado nuevos métodos para detectar ramas y sitios simultáneamente utilizando un marco más flexible en relación con el Codeml: REL (Kosakovsky Pond *et al.*, 2011) y MEME (Murrell *et al.*, 2012). Ambos son implementados en el servidor web de Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>), son más sensibles en relación con PAML y utilizan enfoques alternativos. REL evalúa la variación en  $\omega$  a lo largo del alineamiento y luego evalúa su ubicación probable en el árbol filogenético, mientras que MEME evalúa la variación en  $\omega$  a lo largo de las ramas, y luego evalúa qué sitios contribuyen a la variación en  $\omega$ . A diferencia de Codeml, REL y MEME permiten que dS varíe entre los sitios. Para ambas aproximaciones, se evaluó la variación entre linajes y sitios simultáneamente y el nivel de

significancia fue 0,05 para el sitio y, sujeto a eso, un Factor de Bayes Empírico (EBF) > 20 para la rama o ramas.

Finalmente, un enfoque complementario es implementado en el programa TreeSAAP (Woolley *et al.*, 2003), donde se compara la distribución observada de los cambios fisicoquímicos derivados de un árbol filogenético con una distribución basada en el supuesto reemplazo aleatorio de aminoácidos esperado bajo neutralidad. Esta prueba se muestra mucho más sensible que las anteriores y tiene la ventaja de proporcionar información sobre las propiedades fisicoquímicas involucradas en los reemplazos aminoácidos. En este estudio, el enfoque fue aplicar todas estas pruebas complementarias. Se consideró que los cambios no sinónimos eran el resultado de una selección positiva y desestabilizadora (de ahora en adelante, "cambios radicales") solo si cumplían con dos criterios estrictos: se asignaron a las categorías más extremas de cambios estructurales o funcionales (categorías 6, 7 y 8 de Woolley *et al.*, 2003); y fueron significativos a la  $p < 0,001$ .

## **Resultados**

En este trabajo se analizaron los cambios aminoácidos en el gen de la HBB en 7 especies pertenecientes a la superfamilia Octodontoidea, dos individuos por especie, menos para *C. laringera*, teniendo en cuenta 4 estrategias (PAML, MEME, BsREL, TreeSAAP)

En general, los grupos subterráneos muestran mayor número de sitios bajo selección positiva en contrapartida de sus parientes no subterráneos. También concentran los cambios más radicales en los aminoácidos involucrados en estos sitios. Además, los diferentes métodos utilizados, son mayormente concordantes, señalando los mismos sitios bajo selección positiva. Por ejemplo, los sitios que el paquete PAML detectó bajo selección positiva también fueron identificados por el programa TreeSAAP, que usa una aproximación completamente diferente (resumen en tabla 2 y figura 1).

Los resultados más significativos obtenidos con PAML se resumen en la tabla 2. La estimación por sitio del programa PAML identificó 2 sitios con aceleración, el sitio 16 y el 125 en todas las ramas. En este modelo, M8 (que asume sitios con  $\omega$  mayor a 1) fue significativamente mejor que M8a ( $p < 0,01$ ). Los sitios con probabilidad posterior mayor a 0,95 de presentar  $\omega$  mayor 1 fueron el 125 para NEB (0,981), mientras que para BEB fueron el 125 (0,980) y el 16 (0,952).

Al permitir estimaciones de  $\omega$  diferentes según las ramas, el modelo más complejo que asigna un valor distinto de  $\omega$  para cada rama, fue significativamente mejor que el nulo ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, de todas las comparaciones con modelos intermedios, solo el que tenía un componente filogenético y se le daba un  $\omega$  a la rama basal de los octodontoideos (Ctenomyidae + Octodontidae) fue significativamente mejor que el nulo ( $p < 0,05$ ) pero peor que el full ( $p < 0,05$ ). Esta rama basal presenta un valor de  $\omega$  dos órdenes de magnitud menor que el resto del árbol. El resto de los modelos intermedios no se diferenciaron significativamente del nulo.

El modelo por ramas y sitios no dio ningún valor significativo.

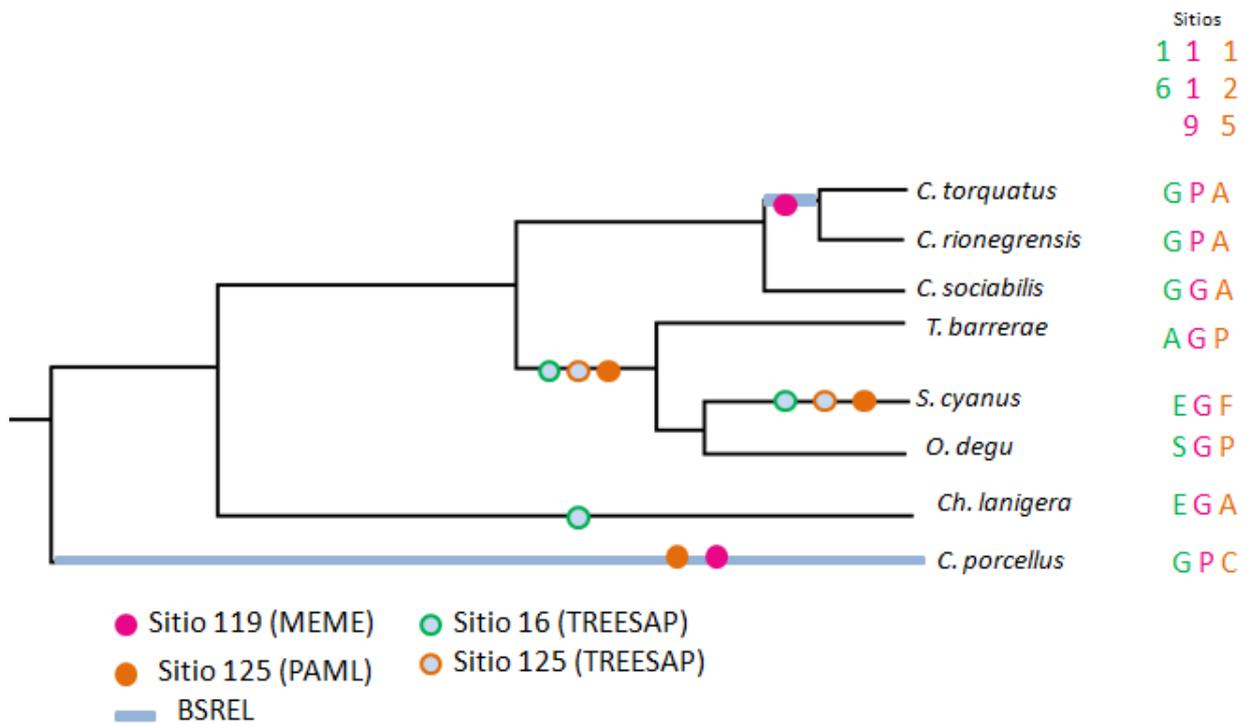


Figura 1. Relación filogenética entre roedores incluidos en este estudio. Los círculos muestran sitios de aminoácidos del gen de la HBB por estar identificado bajo selección natural por diferentes métodos. Del lado derecho de la imagen se especifica qué aminoácido aparece en cada sitio.

El análisis de Branch-siteRel, el cual es complementario al MEME (Murrell *et al.*, 2012) muestra dos ramas con aceleración significativa en su  $\omega$  ( $p=0,001$ ), la rama basal al clado *C. rionegrensis* + *C. torquatus* y a la rama terminal de *C. porcellus*. El programa MEME identificó aceleración en el sitio 119 en la rama basal que lleva al grupo *C. rionegrensis* + *C. torquatus* y la rama que conduce hacia *C. porcellus* con probabilidades posteriores mayores a 0,95 ( $p=0,983$ , y  $p=0,980$ ). En este sitio el aminoácido ancestral es Glicina, y sufre un cambio hacia Prolina en la rama que lleva a *C. porcellus*, y la rama que separa *C. rionegrensis* y *C. torquatus* de *C. sociabilis*. Por otra parte, MEME muestra que los sitios 16 y 125, que el PAML identifica bajo selección, son los que presentan los mayores valores de  $\omega$ , pero no son significativos y no muestran ramas aceleradas particulares.

El programa TreeSAAP muestra los sitios identificados anteriormente (125 y 16) con cambios radicales significativos ( $p<0,001$ ) en diferentes ramas (ver figura 1 y tabla 2). Los cambios aminoacídicos reportados para el sitio 16 fueron de Glicina hacia Glutamato en la rama que conduce a chinchilla con  $p<0,01$ , luego aparece un cambio de Glicina a Alanina en la rama basal de los octodontinos con  $p<0,01$ . También fue reportado el cambio de Alanina a Glutamato en *S. cyanus* con  $p<0,001$ . El sitio 125 cambia en tres oportunidades, de Cisteína a Alanina en la rama basal que conduce a Chinchilla y los demás octodontinos, el cual no obtuvo un valor significativo según este programa. Luego hay un cambio de Alanina a Prolina en la rama basal de los octodontinos con  $p<0,01$ , la cual cambia por Fenilalanina en la rama que conduce a *S. cyanus* con  $p<0,001$ .

Tabla 2. Descripción de sitios relevantes que se mostraron por diferentes métodos bajo selección positiva.

Sitio	Cambio	Rama seleccionada	p valor o probabilidad posterior según algoritmo			
			PAML	MEME	BSREL	TREESAAP
119	Gly>Pro	<i>C. rionegrensis</i> + <i>C. torquatus</i>	-	$p=0,893$	$p=0,001$	-

		<i>C. porcellus</i>	-			p=0,980	p= 0,001	-
125	Ala>Cys	<i>C. porcellus</i>		BEB	NEB			-
	Ala> Pro	basal octodontinos	p < 0,05	0,980	0,981	-	-	p < 0.01
	Pro>Phe	<i>S. cyanus</i>						p < 0.001
16	Gly>Ala	basal Octodontidae		0,952	-	-	-	p< 0.01
	Ala>Glu	<i>S. cyanus</i>	p<0, 05					p< 0.001
	Gly>Glu	<i>C. Laringera</i>						p< 0.01

## Discusión

Los métodos utilizados concuerdan con que los sitios 125 y 16 están bajo la influencia de una selección positiva débil o episódica en todas las ramas de la superfamilia Octodontoidea. Además, el sitio 119 aparece con aceleración en la rama que separa a *C. sociabilis* de sus parientes *C. rionegrensis* y *C. torquatus*. Nuestros resultados con respecto a  $\omega$  también se respaldaron utilizando un método con enfoque diferente para detectar la selección en secuencias de aminoácidos, es decir, examinar la magnitud de los cambios en las propiedades estructurales y bioquímicas de los aminoácidos como resultado de sustituciones no sinónimas a través de una filogenia usando TreeSAAP (Woolley *et al.*, 2003). En general, los linajes subterráneos tienen más sitios bajo selección desestabilizadora positiva y mayores cambios en las propiedades de estos sitios que sus parientes no subterráneos. Además, los sitios que PAML detectó que estaban bajo selección positiva también fueron detectados por TreeSAAP. A continuación se interpretarán los resultados sitio a sitio, y se discutirá para cada uno los aspectos más relevantes en relación a lo encontrado en la bibliografía.

En línea con el resultado del PAML, donde el sitio 125 fue identificado bajo selección, TreeSAAP muestra valores significativos en los cambios aminoacídicos en este sitio, en las ramas basal de los octodontinos, y además en la rama que separa a *S. cyanus* de *O. degu*. Los cambios fueron de Alanina a Prolinalina en el primer caso, mientras que en el segundo de Prolina a Fenilalanina. Ambos casos son cambios radicales ya que Alanina es un aminoácido de tamaño pequeño, apolar, mientras que Prolina, aumenta de tamaño por su cadena lateral, además que desde el punto de vista de propiedades agrega un grupo amino, y la Fenilalanina es aún más grande y contiene un grupo aromático en su cadena lateral. En el trabajo de Storz y Moriyama (2008), sugieren que el sitio 125 estaría involucrado en los cambios de afinidad de la HBB por el O<sub>2</sub> en el ganso cabeza de gallo (*Anser indicus*), habiendo un reemplazo en este sitio, de Glutamato por Aspartato en la cadena  $\beta$  respecto a su pariente de tierras bajas (*Anser anser*). En dicho estudio, los aminoácidos que se intercambian son similares en sus propiedades, pero aun así, sería el responsable del aumento de afinidad. En el caso de los roedores de este estudio el cambio no es el mismo, pero podría ser que igualmente se estuviera modificando la afinidad de la molécula por el oxígeno ya que el sitio coincide y además los cambios son más radicales que los descritos para el ganso (respaldado por los valores de TreeSAAP).

El sitio 16, ha sido identificado como candidato bajo selección por los programas PAML y TreeSAAP, pero hasta nuestro conocimiento en la bibliografía revisada, no ha sido reportado que cambios en este sitio generen un aumento de la afinidad de la HB por el O<sub>2</sub>, aunque no se descarta que en estos roedores si pueda estar generando esta característica. Sería necesario realizar estudios bioquímicos para corroborarlo.

Los datos arrojados por el MEME y complementariamente el BSRel, el sitio 119 presenta una aceleración en la rama que separa a *C. sociabilis* de sus parientes *C. rionegrensis* y *C. torquatus*. Este resultado tiene sentido biológico, ya que *C. sociabilis* desde el punto de vista del comportamiento es bastante distinto de otras especies de tucu-tucus, es la especie más divergente del género (Cutrera y Lacey, 2007; Parada *et al.*, 2011). Esta especie es social y siempre mantiene madrigueras abiertas (Pearson y Christie, 1985), evitando así fluctuaciones significativas en las concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en relación con las condiciones sobre el suelo. Este resultado coincide con el obtenido en el trabajo de Tomasco y Lessa (2011), donde se analiza la evolución molecular de todos los genes mitocondriales codificantes de proteínas asociados con la respiración mitocondrial. En este trabajo se observa un patrón similar al aquí obtenido, y los grupos subterráneos presentan mayor cantidad de cambios radicales, salvo *C. sociabilis*, quien presenta una tasa de cambios similar a los grupos no subterráneos. Esto puede sugerir que la presión selectiva en este último es menor por su estilo de vida.

Una observación interesante es que, en términos generales, la rama terminal que conduce a *S. cyanus* concentra varios de los cambios (ver figura 1). Esto está en línea con los resultados morfológicos. Lessa *et al.*, 2008, plantean que el linaje que al que pertenece especie evolucionó a una vida totalmente subterránea y adquirió numerosos cambios morfológicos hace unos 2,2 Ma, lo que es bastante reciente. Esta especie, y sus parientes de la familia Octodontidae, son por tanto un excelente modelo de estudio para continuar los estudios de adaptaciones fisiológicas en la HB y analizar el efecto de los diferentes cambios encontrados bajo selección en el grupo.

Por otro lado, vale destacar que en el trabajo realizado por Pairet *et al.*, 2010, hallaron que en la HB del cobayo (*Cavia porcellus*) se encuentra una Histidina voluminosa en lugar de Prolina en la posición 44 (sitio muy conservado en vertebrados) de la subunidad  $\alpha$  (cadena  $\alpha 1$ ), lo que inevitablemente dará como resultado un impedimento estérico entre Histidina44  $\alpha 1$  y Histidina 97 de la subunidad  $\beta 2$ . Este obstáculo estérico hace que el estado T (tenso) de la HB de cobayo sea menos estable y, por lo tanto, dará como resultado una mayor afinidad por el oxígeno, ya que el equilibrio entre el estado T, R y R2 se desplazará hacia los estados relajados (R o R2- estado), que tienen una mayor afinidad por el oxígeno. En las secuencias genicas de nuestros roedores (los incluidos en este estudio) coinciden con el cambio de Prolina 44->Histidina en la cadena  $\alpha$ , y en el sitio 97 de la cadena  $\beta$  efectivamente hay Histidina. Por lo que es de esperar que la HB de los roedores en cuestión tenga el mismo comportamiento, presentando una afinidad mayor por el oxígeno por lo anteriormente descrito. Con esto presente, podemos sugerir que la Hb de todas las especies presentes en nuestro árbol empleado en los análisis ya tiene de forma intrínseca una afinidad aumentada por el O<sub>2</sub>. Esto es interesante porque la superfamilia Octodontoidea presenta además de los géneros subterráneos, especies fosoriales que cavan cuevas y viven en ellas parte del día, lo que este cambio en la afinidad sería una ventaja adaptativa del grupo en general, y podría generar un ambiente propicio para la posterior adaptación a la vida subterránea. De ser así, es posible que los tests utilizados no sean capaces de identificarlos, ya que esta característica está presente en todo el set de datos. Los casos que nosotros identificamos, en principio estaría aumentando aún más la afinidad por el O<sub>2</sub>, que de por sí es mayor que en otros grupos.

Por otra parte, en el estudio con cetáceos (Tian *et al.*, 2016), mamíferos que enfrentan hipoxia e hipercapnia asociada a la apneas prolongadas de la vida subacuática, muestra que las especies adaptadas al buceo, tienen más modificaciones a nivel de la cadena  $\beta$  que las especies pelágicas, por lo que se podría pensar que la HBB es la subunidad de la HB que está más involucrada en la afinidad por el  $O_2$  y de forma global, cualquiera de sus cambios estarían aumentando la afinidad por el  $O_2$ .

Finalmente, vale decir que cuando múltiples especies evolucionan con cambios similares en el fenotipo en respuesta a un desafío ambiental compartido, esto sugiere que el estado de carácter evolutivamente convergente es adaptativo bajo un ambiente similar y habría evolucionado bajo la influencia de la selección direccional (Natarajan *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que la evolución de la HBB en octodontoideos fue en parte modelada por selección natural positiva. Para poder identificar los detalles del proceso, y el efecto de cada uno de estos cambios en la proteína de estos roedores se necesitan estudios adicionales para identificar el rol real de las sustituciones de aminoácidos seleccionados. En investigaciones posteriores se debería hacer mutagénesis dirigida en los sitios 125, 119 y 16, y cuantificar si realmente la afinidad del  $O_2$  aumenta por parte de la HB, y también tener en cuenta de qué manera se modifican los cofactores, ya que el aumento de la afinidad puede estar dado por el cambio de concentraciones de estos. También sería de gran aporte ver la estructura en 3D de la HB de estos roedores, y de qué manera están interaccionando las 4 cadenas, ya que en varios estudios se ha visto que las modificaciones en la afinidad viene dada por cambios en estas interacciones.

### **Perspectivas**

La HB, como se ha mencionado anteriormente, es la principal proteína transportadora de  $O_2$  de los vertebrados (Weber, 2007), pero existen muchas otras proteínas involucradas en la respiración y el metabolismo del  $O_2$  en dichos organismos. Estudiarlas específicamente en estos roedores, al igual que como se hizo con la HB, agregaría valor a esta línea de investigación, generando más conocimientos acerca de las adaptaciones en respuesta a la hipoxia en ellos. Un ejemplo a seguir es la comparación de genomas que se realizó en el trabajo de Davis *et al.* 2018. En este caso se evalúan posibles genes bajo selección positiva en la colonización del nicho subterráneo y las restricciones impuestas por éste.

En futuros estudios, para la mejor comprensión de la evolución de esta proteína, sería útil realizar estudios bioquímicos similares a los que se realizaron en el trabajo de Storz *et al.*, 2010. Dichos estudios se deberían enfocar principalmente en evaluar si la HB de los roedores estudiados realmente tiene aumentada la afinidad por el  $O_2$ , y cuantificar los cambios en relación a los demás cofactores. También sería de gran aporte realizar estudios a nivel genómico y transcritómico así como de mutagénesis dirigida en los sitios encontrados bajo selección, en ambas subunidades de esta proteína, teniendo en cuenta los descubiertos en el estudio de Tomasco *et al.* 2017, para poder observar si dichos cambios generan un aumento en la afinidad por el  $O_2$  en la proteína, teniendo como referencia los estudios hechos en el trabajo de Galen *et al.* 2015, donde sus experimentos tienen un fin muy similar. Además, ver la estructura 3D de la HB integralmente, teniendo en cuenta la interacción de las subunidades de alfa y beta globinas, como se realizó en el trabajo de Parinet *et al.*, 2010, podría ayudar a comprender las consecuencias de estos cambios aminoácidos en dichas subunidades, y si están o no generando un aumento de afinidad por el  $O_2$ , sea mediante un efecto directo, un impedimento estérico, el cambio en las cargas, o la incorporación de grupos aromáticos, entre otros. Estos estudios en conjunto complementarían los resultados de esta investigación que muestra selección a nivel molecular con una aproximación comparativa.

## **Bibliografía**

Arnone A., 1972. X-ray Diffraction Study of Binding of 2,3-Diphosphoglycerate to Human Deoxyhaemoglobin. *Nature* 237: 146–149.

Baldwin J, Chothia C (1979) Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *J Mol Biol* 129: 175–220.

Buffenstein, R., 2000. Ecophysiological responses of subterranean rodents to underground habitats. In: Lacey, E.A., Patton, J.L., Cameron, G.N. (Eds.), *Life Underground, the Biology of Subterranean Rodents*, pp. 63–110.

Cheviron, Z.A., Natarajan, C., Projecto-Garcia, Joana, Eddy, Douglas K., Jones, Jennifer, Carling, Matthew D., Witt, Christopher C., Moriyama, Hideaki, Weber, Roy E., Fago, Angela, Storz, Jay F., 2014. Integrating evolutionary and functional tests of adaptive hypotheses: A case study of altitudinal differentiation in hemoglobin function in an andean sparrow, *zonotrichiacapensis*. *Molecular Biology and Evolution*, 2948-2962.

Cutrera A. P., Lacey E. A., 2008. Trans-species polymorphism and evidence of selection on class II MHC loci in tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Immunogenetics* 59(12):937-48.

Davies, K. T.J., Bennett, N.C., Faulkes, C. G., Rossiter, S. J., 2018. Limited evidence for parallel molecular adaptations associated with the subterranean niche in mammals: A comparative study of three superorders. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 2544-2559.

Da Silva, C. C., Tomasco, I. H., Hoffmann, F. G., Lessa, E. P., 2009. Genes and Ecology: Accelerated Rates of Replacement Substitutions in the Cytochrome b Gene of Subterranean Rodents. *The Open Evolution Journal*, 17-30.

Filatov, D. A., 2002. A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Resource*, 2 (4):621-624.

Galen, S.C., Natarajan, Ch., Moriyama, H., Weber, R. E., Fago, A., Benham, P. M., Chavez, A. N., Cheviron, Z. A., Storz, J. F., Witt, Ch. C., 2015. Contribution of a mutational hot spot to hemoglobin adaptation in high-altitude Andean house wrens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 13958-13963.

Honeycutt, R.L., Rowe, D.L., Gallardo, M.H., 2003. Molecular systematics of the South American caviomorph rodents: relationships among species and genera in the family Octodontidae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 26: 476–489.

Jessen, T.H., Weber, R.E., Fermit, G., Tameoi, J., Braunitzer, G., 1991. Adaptation of bird hemoglobins to high altitudes: Demonstration of molecular mechanism by protein engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 6519-6522.

Kosakovsky Pond, S.L., Murrell, B., Fourment, M., Frost, S.D.W., Delport, W., Scheffler, K., 2011. A random effects branch-site model for detecting episodic diversifying selection. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 3033–3043.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

Lessa, Enrique P., Vassallo, Aldo I., Verzi, Diego H., Mora, Matías S., 2008. Evolution of morphological adaptations for digging in living and extinct ctenomyid and octodontid rodents. *Biological Journal of the Linnean Society*, 267-283.

Miller, S.A., Dikes, D.D., Polesky, H.H., 1988. A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16: 215

Murrell, B., Wertheim, J.O., Moola, S., Weighill, T., Scheffler, K., Kosakovsky Pond, S.L., 2012. Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genet.* 8.

Natarajan, C., Projecto-Garcia, J., Moriyama, H., Weber, R.E., Muñoz-Fuentes, V., Green, A.J., Kopuchian, C., Tubaro, P.L., Alza, L., Bulgarella, M., Smith, M.M., Wilson, R.E., Fago, A., McCracken, K.G., Storz, J.F., 2015. Convergent evolution of hemoglobin function in high-altitude Andean waterfowl involves limited parallelism at the molecular sequence level. *PLoS Genet.* 11: 1–25.

Nielsen R, Yang Z (1997) Likelihood Models for Detecting Positively Selected Amino Acid Sites and Applications to the HIV-1 Envelope Gene. *Genetics* 148:929-936.

Opazo, J.C., 2005. A molecular timescale for caviomorph rodents (Mammalia, Hystricognathi). *Mol. Phylogenet. Evol.* 37: 932–937.

Pairet, B., Jaenicke, E., 2010. Structure of the altitude adapted hemoglobin of guinea pig in the R2-state. *PLoS ONE* 5 (8):12389.

Parada, A., D'Elía, G., Bidau, C.J., Lessa, E.P., 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *J. Mammal.* 92: 671–682.

Patton, J.L., Paradiñas, U.F.J., D'Elía, G. (Eds.), 2015. *Mammals of South America*. University of Chicago Press, Chicago London.

Pearson y Christie, 1985. Social TucoTuco, *Ctenomys sociabilis*. *Historia Natural (Corrientes)* 5(37): 337-343.

Perutz, M. F., 1970. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem–Haem Interaction and the Problem of Allostery. *Nature*, 228: 726–734.

Tian R., Wang Z., Niu X., Zhou K., Xu S., Yang G., 2016. Evolutionary Genetics of Hypoxia Tolerance in Cetaceans during Diving. *Genome Biol. Evol.* 8(3):827–839.

Revsbech, I.G., Tufts, D.M., Projecto-Garcia, J., Moriyama, H., Weber, R.E., Storz, J.F., Fago, A., 2013. Hemoglobin function and allosteric regulation in semi-fossorial rodents (family Sciuridae) with different altitudinal ranges. *J. Exp. Biol.* 216: 4264–4271.

Scott, G. R. and Milsom, W. K. (2006). Flying high: a theoretical analysis of the factors limiting exercise performance in birds at altitude. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154: 284-301

- Storz J. F. and Moriyama H., 2008. Mechanisms of Hemoglobin Adaptation to High Altitude Hypoxia. *HIGH ALTITUDE MEDICINE & BIOLOGY*. 148-157
- Storz, J.F., Scott, G.R., Cheviron, Z. A., 2010. Phenotypic plasticity and genetic adaptation to high-altitude hypoxia in vertebrates. *Journal of Experimental Biology*. 4125-4136.
- Storz, J.F., Runck, A.M., Moriyama, H., Weber, R.E., Fago, A., 2010. Genetic differences in hemoglobin function between highland and lowland deer mice. *Journal of Experimental Biology*. 213: 2565-2574.
- Storz, J. F., Cheviron, Z. A., McClelland, G. B., Scott, G. R., 2019. Evolution of physiological performance capacities and environmental adaptation: insights from high-elevation deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Journal of Mammalogy*, 100: 910-922.
- Storz, J. F., Scott, G. R., Cheviron, Z. A. 2010. Phenotypic plasticity and genetic adaptation to high-altitude hypoxia in vertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 4125-4136.
- Tian, R., Wang, Z., Niu, X., Zhou, K., Xu, S., Yang, G., 2016. Evolutionary genetics of hypoxia tolerance in cetaceans during diving. *Genome Biology and Evolution*. 827-839.
- Tomasco, I.H., Lessa, E.P., 2011. The evolution of mitochondrial genomes in subterranean caviomorph rodents: Adaptation against a background of purifying selection. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 64-70.
- Tomasco, I.H., Lessa, E.P., 2014. Two mitochondrial genes under episodic positive selection in subterranean octodontoid rodents. *Gene* 534: 371-378.
- Tomasco, I. H., Boullosa, N., Hoffmann, F. G., Lessa, E. P., 2017. Molecular adaptive convergence in the  $\alpha$ -globin in subterranean octodontid rodents. *Gene*. 275-280.
- Upham, N.S., Patterson, B.D., 2012. Diversification and biogeography of the Neotropical caviomorph lineage Octodontoidea (Rodentia: Hystricognathi). *Mol. Phylogenet. Evol.* 63: 417-429.
- Weber, R. E., Fermi, G., Tame, J., Braunitzer, G. 1991. Adaptation of bird hemoglobins to high altitudes: Demonstration of molecular mechanism by protein engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6519-6522
- Weber, R.E., Fago, A., 2004. Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 141-159.
- Weber, R.E., 2007. High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 158: 132-142.
- Weber, R. E., Jessen T. H., Malte, H., Tame, J., 2018. Mutant hemoglobins ( $\alpha$ 119-Ala and  $\beta$ 55-Ser) functions related to high-altitude respiration. *American Physiological Society*. 2646-2655
- Winslow, R.M. 2007. The role of hemoglobin oxygen affinity in oxygen transport at high altitude. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 158: 121-127
- Woolley, S., Johnson, J., Smith, M.J., Crandall, K.A., McClellan, D.A., 2003. TreeSAAP: selection on amino acid properties using phylogenetic trees. *Bioinformatics* 19: 671-672.

Fang X., Seim I., Huang Z., Gerashchenko M.V., Xiong Z., Turanov A. A., Zhu Y., Lobanov A.V., Fan D., Yim S., Yao X., Ma S., Yang L., Lee S., Kim E., Bronson R. T., Šumbera R., Buffenstein R., Zhou X., Krogh A., Park T. J., Zhang G., Wang J., Gladyshev V.N., 2014. Adaptations to a Subterranean Environment and Longevity Revealed by the Analysis of Mole Rat Genomes. *Cell Reports*, 8: 1354-1364.

Yang, Z., Nielsen, R., 1998. Synonymous and nonsynonymous rate variation in nuclear genes of mammals. *J. Mol. Evol.* 46: 409–418.

Yang, Z., Bielawski, J.R., 2000. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol. Evol.* 15:496–503.

Yang, Z., Swanson, W.J., Vacquier, V.D., 2000. Maximum-likelihood analysis of molecular adaptation in abalone sperm lysin reveals variable selective pressures among lineages and sites. *Mol. Biol. Evol.* 17:1446–1455

Yang, Z., Nielsen, R., 2002. Codon-substitution models for detecting molecular adaptation at individual sites along specific lineages. *Mol. Biol. Evol.* 19: 908–917

Yang, Z., Wong, W.S.W., Nielsen, R., 2005. Bayes empirical Bayes inference of amino acid sites under positive selection. *Mol. Biol. Evol.* 22:1107–1118.

Yang, Z. 2007. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1586-1591

Yang, Z., 2009. User guide PAML: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 3

Zhang, J., Nielsen, R., Yang, Z., 2005. Evaluation of an improved branch-site likelihood method for detecting positive selection at the molecular level. *Mol. Biol. Evol.* 22: 2472–2479.