



Pasantía de grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Búsqueda de adaptaciones moleculares
en la α -globina en respuesta a la hipoxia
en roedores caviomorfos

Nicolás Boullosa

ORIENTADORA: Dra Ivanna Tomasco

Departamento de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias,
UdelaR

Agosto, 2014

Índice

- Resumen.....	Pág. 3
- Introducción.....	Pág. 4
- Materiales y métodos.....	Pág. 6
Estrategia general.....	Pág. 6
Elección de especies.....	Pág. 6
Laboratorio.....	Pág. 7
Análisis.....	Pág. 9
- Resultados.....	Pág. 11
Descripción de las secuencias obtenidas.....	Pág. 11
Detección de Selección positiva.....	Pág. 14
Servidor DataMonkey.....	Pág. 14
MEME.....	Pág. 14
Branch-siteREL y GA-Branch.....	Pág. 16
Prime.....	Pág. 16
PAML.....	Pág. 17
TreeSAAP.....	Pág. 17
- Discusión.....	Pág. 18

Resumen

Los ambientes hipóxicos representan un gran desafío fisiológico para los animales por generar severas restricciones al metabolismo aeróbico. Aunque las bases genéticas de la adaptación a la hipoxia no son conocidas completamente, abundante evidencia indica que cambios en la hemoglobina han jugado un papel clave en vertebrados. Varios trabajos relacionan cambios aminoacídicos en la hemoglobina con modificaciones en sus propiedades bioquímicas y funcionales en respuesta a la altura en anfibios, aves y mamíferos, haciéndola una candidata natural para estudios de adaptaciones a la hipoxia. Este trabajo pretendió evaluar si la evolución de la tolerancia a la hipoxia en roedores caviomorfos involucra modificaciones adaptativas en la α -globina (componente constitutivo de la hemoglobina). Estos roedores constituyen un modelo atractivo para este estudio, ya que los géneros *Ctenomys* y *Spalacopus* han invadido el nicho subterráneo reciente e independientemente y viven a diferentes alturas. Ambas situaciones, tanto la vida en altura como bajo superficie, son dos situaciones conocidas que disminuyen las concentraciones de O_2 disponible. Para estos dos géneros y otros caviomorfos no subterráneos emparentados, se amplificó por PCR y se secuenció el gen de la α -globina y posteriormente se realizó un análisis bioinformático detectándose huellas de selección positiva (en particular un exceso de cambios de reemplazo aminoacídico en relación a la cantidad de cambios sinónimos) en diferentes especies dentro de un contexto filogenético conocido. Los sitios 58 y 72 fueron detectados bajo selección por tres programas que estiman selección de manera independiente como lo son el MEME, PAML4 y TreeSAAP, estos cambios fueron encontrados no precisamente en la rama que se esperaba, sino en la rama basal del grupo de especies denominados octodóntidos, considerados ampliamente en la literatura de hábitos fosoriales. En particular el sitio 58 es adyacente a una histidina altamente conservada en los mamíferos, cuyo grupo imidazol interactúa directamente con uno de los grupos Hemo de la proteína. Es decir que un solo cambio aminoacídico podría estar explicando diferencias en las afinidades de las proteínas por el oxígeno, facilitando la carga y descarga de oxígeno de la proteína y podría implicar que los cambios de reemplazo seleccionados, lo sean para la fosorialidad en general y no únicamente para la subterrneidad.

Introducción

Los cambios ambientales pueden modificar las presiones selectivas a las que están sujetos los individuos y generar adaptaciones (Futuyma 2005). La búsqueda de adaptaciones es un aspecto clave en el desarrollo de la biología evolutiva desde su formulación. Los ambientes con bajas concentraciones de O₂ (hipóxicos), representan un gran desafío fisiológico para los animales por generar severas restricciones al metabolismo aeróbico. Uno de estos ambientes hipóxico lo constituye la vida bajo tierra (Arieli & Ar 1979, Ar et al. 1977, Avivi 2005, Avivi 2006). Sin embargo pese a su importancia, las adaptaciones al nicho subterráneo han sido poco exploradas (Buffenstein 2000).

Se conocen varias adaptaciones fisiológicas al nicho subterráneo relacionadas con tolerar mayores niveles de CO₂ y menores de O₂, como el presentar mayor concentración de Hemoglobina (Hb) en sangre y/o mayor afinidad de ésta por el O₂ (Broekman 2006, Nevo 1999). Las estrategias generales para el mantenimiento de un adecuado transporte de O₂ a los tejidos para un mamífero que enfrenta una situación de hipoxia/hipercapnia representan un compromiso entre el aumento en el aporte de O₂ y su consumo, por los gastos energéticos que implica (Nevo 1999). Por un lado, aumentar la presión parcial de O₂ alveolar incrementando la ventilación implica elevar el gasto energético, lo que requiere mayor consumo de O₂. Otra estrategia es aumentar la concentración de Hb en sangre de forma de transportar más O₂, pero esto aumenta la viscosidad de la sangre y por lo tanto la energía requerida para su propulsión. Estas características fueron evaluadas en pocas especies subterráneas, que son especies que desempeñan casi la totalidad de sus actividades en cuevas cerradas bajo tierra incluido el forrajeo y apareamiento (Begall et al. 2007), . fundamentalmente en los géneros de roedores *Spalax* (mediterráneo) (Arieli & Nevo 1991), *Heterocephalus* (africano) y *Thomomys* (norteamericano) (Lechner 1977). Además, los grupos subterráneos estudiados son muy divergentes de sus hermanos no subterráneos, a veces desconocidos, dificultando la asignación de las diferencias encontradas a la vida subterránea. Algunas de las adaptaciones morfológicas convergentes más llamativas que exhiben estos linajes, extremadamente distantes evolutivamente entre ellos, incluyen la forma compacta y cilíndrica del cuerpo, cola y cuello cortos, reducción de los ojos y oído externo, y patas delanteras, parrilla costal y músculos asociados grandes y fuertes (Nevo 1999).

A nivel molecular, la información es escasa y se ha comenzado a trabajar recientemente en el tema. En las últimas décadas el desarrollo conjunto de la biología

molecular y la informática ha permitido desarrollar potentes análisis que permiten detectar las huellas de la selección natural positiva a nivel nucleotídico. La prueba más convincente de selección positiva es encontrar una mayor tasa de cambio no sinónimo dN (cambios nucleotídicos que determinan cambios aminoacídicos) respecto de la tasa de cambio sinónimo dS (cambios nucleotídicos que no determinan cambios aminoacídicos). Valores de la relación dN/dS (ω) mayores que uno representan sitios sujetos a selección direccional positiva. La búsqueda de adaptaciones a nivel molecular asociadas a un cambio ecológico en un contexto filogenético conocido es clave en el desarrollo de una teoría evolutiva completa, sin embargo existen pocos ejemplos concretos (Nei 2005). Recientemente se ha sugerido eventos de selección direccional positiva asociada a la invasión del nicho subterráneo en genes mitocondriales (Da Silva et al. 2009, Tomasco & Lessa 2011, Tomasco & Lessa 2014). Sin embargo, dada la importancia funcional de estos genes, es cuestionable pensar en un efecto superlativo de estas mutaciones sobre la fisiología respiratoria, habiendo seguramente otros genes responsables de las diferencias adaptativas encontradas en los roedores subterráneos, como aquellos relacionados con el transporte del O₂ en sangre.

Existe abundante evidencia de que cambios en la hemoglobina juegan un papel importante en la respuesta adaptativa a ambientes hipóxicos debido a la vida en altura (Weber 2007, Storz & Moriyama 2008). Esta proteína es muy estudiada tanto en su estructura como función, está encargada en el transporte de O₂ en sangre en vertebrados y está formada por dos dímeros de α y β globina. La hemoglobina es usada como ejemplo de cambios adaptativos a ambientes particulares (Li 1997). Estudios de adaptaciones de esta proteína fueron realizados en especies que viven en altas altitudes como ser en una especie de ganso andino (Hiebl et al. 1987) y en Llama (Piccinini et al. 1990). Sin embargo, las adaptaciones de esta proteína en ambientes subterráneos no han sido estudiadas. En general, las “adaptaciones” de corto plazo involucran cambios transitorios en la expresión génica, incremento en el número de eritrocitos en sangre, o cambios en el ritmo respiratorio, pero las modificaciones de más largo impacto son generalmente de tipo genético e involucran cambios en la estructura de la hemoglobina (Weber 2007). Es común que mamíferos y aves que viven en ambientes de alta montaña posean hemoglobinas con mayor afinidad por el O₂ en relación con grupos que no viven en ambientes tan extremos. Estas modificaciones moleculares no han sido estudiadas en especies subterráneas y es razonable preguntarse si las adaptaciones fisiológicas observadas en roedores

subterráneos, tienen su correlato molecular en adaptaciones de proteínas como ser el caso de la hemoglobina.

Los roedores caviomorfos, endémicos de Sudamérica, constituyen una oportunidad única para estudiar la evolución adaptativa asociada a la invasión del nicho subterráneo, en un marco filogenético y temporal conocido, ya que los tuco-tucos (género *Ctenomys*) y el coruro (*Spalacopus cyanus*), han colonizado reciente e independientemente el nicho subterráneo. Además la relación filogenética con las especies no subterráneas más emparentadas está bien establecida. Datos de secuencia genómica del caviomorfo *Cavia porcellus* (cobayo o conejillo de indias), especie de referencia en este grupo, se encuentran disponibles en bases de datos públicas, con una cobertura y anotación satisfactoria de los agrupamientos de las alfa y beta globinas (Hoffmann et al. 2008 a y b, Storz et al. 2008). Estas secuencias constituyen un sólido punto de partida para el proyecto: el análisis comparativo de los agrupamientos indica que esta especie presenta una única copia de los genes de las hemoglobinas adultas, tanto alfa como beta y sugiere que esta es la condición ancestral de la radiación de los roedores. Es por tanto razonable esperar que el resto de los caviomorfos presente el mismo patrón y esto facilitaría la identificación de genes ortólogos, un punto crítico a la hora de realizar los análisis de evolución molecular.

Por lo anterior, se establece como objetivo de esta investigación evaluar si la evolución de la tolerancia a la hipoxia en roedores caviomorfos involucra modificaciones adaptativas en el gen que codifica para la alfa-globina. Estos datos serán de suma importancia para complementar la información existente sobre la evolución adaptativa de este grupo tan particular de mamíferos a la hipoxia del nicho subterráneo.

Materiales y métodos

Estrategia general.

Se secuenció el gen de la alfa-globina en especies subterráneas y no subterráneas de roedores caviomorfos emparentadas filogenéticamente (un total de 10 especies), utilizando dos individuos por especie como control interno (salvo 3, ver Fig. 1). Estas muestras de tejido conservadas en etanol 95% se encuentran disponibles en la colección del Laboratorio de Evolución. Luego se aplicaron test para identificar huellas de selección a nivel molecular y se comparó entre grupos.

Elección de especies

Se eligieron para el estudio diez especies de roedores caviomorfos, dentro de una filogenia conocida, que difieren en sus características ecológicas en relación a sus hábitos subterráneos o no (Fig. 1). Dentro del género *Ctenomys* se eligieron tres especies para poder representar la diversidad del género (Tomasco & Lessa 2011), que cuenta con más de 60 especies descritas (Wilson & reeder 2005). Estas tres junto con el coruro forman el grupo de las subterráneas.

Subterráneas: tucu-tucus (*Ctenomys sociabilis*, *C. rionegrenis* y *C. leucodon*) y *Spalacopus cyanus*. Los otros tres octodóntidos (Fig. 1) el degu (*Octodon degus*), el tunduco (*Aconaemys fuscus*), una vizcacha (*Tympanoctomys barrerae*), son especies que construyen cuevas pero realizan parte de sus actividades en la superficie y son llamadas fosoriales.

Además se cuenta con una rata espinosa (*Proechimys longicaudatus*) y la Chinchilla de cola larga (*Chinchilla lanígera*). Como grupo externo se escogió el género *Cavia* (*Cavia porcellus*).

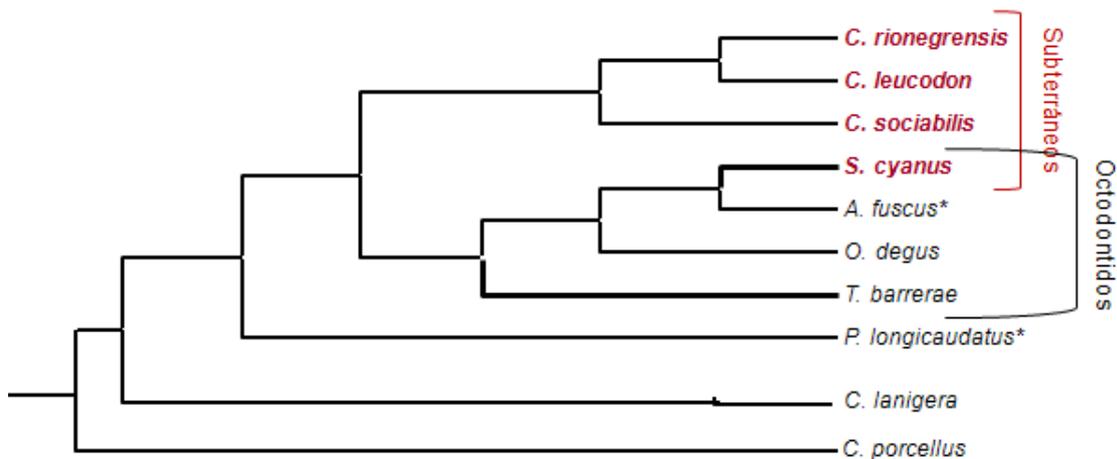


Figura 1. Filogenia de roedores caviomorfos que se utilizarán en este trabajo. Las especies marcadas en rojo presentan hábitos subterráneos, de las especies con asterisco (*) existe un solo ejemplar en la sección Evolución de Facultad de Ciencias.

Laboratorio

Las extracciones de ADN total se realizaron con SDS, digestión con proteinasa K, precipitación proteica con NaCl y precipitación de ADN con alcohol (modificado de Miller et al. 1988) a partir de hígado conservado al 95% en etanol. En el diseño de oligonucleótidos para la PCR se consideró las secuencias consenso flanqueantes a las regiones a amplificar del genoma de roedores, es decir que el método de elaboración de los oligonucleótidos incluye una comparación entre secuencias de hemoglobinas de diferentes especies de roedores, aquellas regiones del entorno de los 20 nucleótidos altamente conservadas que se encontraran 5´ respecto del primer exón y 3´ respecto

del último, eran buenos candidatos a cebadores de la PCR, Algunos oligonucleótidos fueron diseñados para que solapen con regiones exónicas, con la ventaja de aumentar las posibilidades de que el cebador hibridase con el ADN molde por ser este último más conservado que en las regiones intrónicas, pero disminuyendo el largo del producto. Un total de 12 oligonucleótidos fueron diseñados y se contempló que tuviera un adecuado contenido en GC y que no fueran complementarios ni consigo mismo ni con otro oligonucleótido. Posteriormente fueron puestos a prueba y se seleccionaron los que obtuvieron más cantidad de producto de amplificación. El par de cebadores utilizados para cada muestra se detalla en Tabla 2. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 μ L. Las extracciones de ADN en proporción 1:100 representaban la mitad de ese volumen (12.5 μ L), la otra mitad corresponde al mix de PCR constituido de la siguiente manera: 3.45 μ L de H₂O, 2.50 μ L de buffer 10X 2mM de Mg. 0.50 μ L de DNTPs (10 mM c/u), 1.50 μ L de cada cebador (10 μ M c/u), 1.50 μ L de MgCl₂ (50 mM) y 0.05 U/ μ L de enzima Taq polimerasa.

La PCR comenzó con una fase de desnaturalización a 95°C de 3 minutos, seguido por, 40 ciclos cada uno de los cuales consistió en 20 segundos a 94°C (desnaturalización), 20 segundos a 62°C (asociación) y 20 segundos a 72°C (extensión). La reacción finalizó con una fase de extensión durante 5 minutos a 72°C.

Los controles de los productos de PCR fueron realizados mediante electroforesis en minigeles de agarosa (0.8% de agarosa en TBE 1X) con posterior tinción en Bromuro de Etidio.

Los controles negativos se realizaron para cada reacción de PCR con el mismo set de cebadores y remplazando el ADN por agua destilada.

Se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) sintético desde 100 pares de bases (Pb) hasta 2000 Pb distanciados de a 100Pb que permitió la lectura de todos los geles de agarosa. Este MPM contempla el rango esperado de los productos de PCR dado que las α -globinas presentan tamaños entre 500 y 1000 Pb.

Los productos de PCR que presentaron un tamaño de banda en concordancia con lo esperado, (entre 500 y 1000Pb), fueron seleccionados y mandados a secuenciar. La purificación y secuenciación (por el método de Sanger) de los productos de PCR estuvo a cargo de la empresa MacroGen Inc. (<http://www.macrogen.com>). Cada uno de los productos de PCR fue secuenciado utilizando los dos cebadores utilizados en la amplificación, se obtuvo entonces dos secuencias por gen por individuo y se pudo controlar si ambas fueron idénticas.

Análisis

Los cromatogramas se editaron y alinearon con programas de rutina Proseq (Filatov 2002), CLUSTAL_X (Thompson et al. 1997), MEGA5 (Tamura et al. 2011). Se evaluó la diversidad general de las secuencias, por ejemplo, el patrón de cambios según la posición del codón y las fronteras entre exones e intrones, luego se generó la secuencia sin los intrones. Una vez obtenidas las secuencias codificantes de alfa-globina para todas las especies se buscaron huellas de selección positiva en los exones. El concepto básico es comparar, mediante los valores de verosimilitud, el ajuste de diferentes modelos donde la relación dN/dS toma diferentes valores, igual, mayores o menores que 1. En caso de que la selección darwiniana positiva sea la fuerza preponderante en la evolución del gen en estudio, se espera observar un exceso sustituciones no sinónimas, $dN/dS > 1$. Estas estimaciones es posible hacerlas por sitio (codón), por linajes o por ambos simultáneamente. Se realizaron aproximaciones clásicas implementadas en el programa PAML4 (Yang 2007) y otras más recientes y sensibles que permiten estimaciones de la relación dN/dS por codón y linaje simultáneamente, como branch-siteREL (Kosakovsky et al. 2011), MEME (Murrell et al. 2012) y PRIME implementados en DataMonkey (<http://www.datamonkey.org/>). Dentro de este servidor, se probaron diferentes alternativas, muchas de ellas complementarias. Por ejemplo Branch-site REL y MEME. Branch-site REL permite determinar linajes bajo selección, pero no en que codones específicos ocurre selección, es un método menos sensible que otros de similares características como el GA-Branch (Kosakovsky et al. 2004), pero es menos propenso a detectar falsos positivos.

MEME (Mixed Effects Model of Evolution). Permite determinar selección en codones y puede sugerir la rama donde se concentra el cambio, es un método capaz de detectar evolución episódica y generalizada al nivel de sitios individuales, la acción de la selección positiva episódica es subestimada en otros métodos anteriores e incorporada en éste.

PAML4 (Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood) el PAML es un paquete de programas para el análisis filogenético del ADN, tiene un amplio repertorio de modelos evolutivos implementados, que pueden ser utilizados para estimar parámetros en los modelos se basa en estimación de ω por sitio, por linaje y por sitios y linajes (simultáneamente) utilizando reconstrucción de secuencias ancestrales. Para detectar evidencia de selección positiva sobre diferentes linajes se ensayaron varios modelos. Los modelos denominados completos estiman un ω para cada rama de la filogenia o para cada codón de la filogenia (modelo de ramas y modelo de sitios, respectivamente), adicionalmente puede estimar un ω para una combinación de ramas y sitios, pudiendo ω como máximo tomar dos valores independientes. El modelo nulo

asume que todas las tasas de variación nucleotídicas, siguen el mismo patrón para todos los sitios, linajes o combinación de ambos, es decir no hay ni codones ni ramas que están siendo seleccionadas por sobre las otras comparaciones entre modelos anidados

La comparación entre ambos modelos, analizando si son significativamente diferentes, permite determinar si está ocurriendo selección en la secuencia de interés. Si el modelo nulo es significativamente diferente del modelo complejo, los sitios y/o ramas que se encuentran en este último bajo selección pueden ser interpretados como posibles adaptaciones moleculares. Para comparar los modelos complejo y nulo se realiza un RLT (Ratio Likelihood Test) calculando el doble de la diferencia de los logaritmos neperianos de la verosimilitud de cada modelo ($2 \cdot \Delta \ln L$). El $\ln L$ representa el ajuste del modelo entre datos y el escenario planteado por el modelo. La distribución de RLT se ajusta a la de Chi^2 y entonces se evalúa si el modelo complejo es significativamente distinto del nulo utilizando la tabla de Chi^2 . Para el caso del modelo de ramas y sitios el valor crítico de significancia estadística es 2.71 para un p-valor de 0.05 según el manual de uso de PAML, y para el modelo de ramas, el número de grados de libertad es el número de los diferentes ω asignados al modelo complejo menos uno (que corresponde con el ω de todas las ramas del modelo nulo), estas son las únicas variables que varían entre ambos modelos.

El modelo de sitios permite que ω varíe entre los sitios, en este estudio se utilizó el modelo 8 como modelo complejo, y se comparo con el modelo 8a (que mantiene fijos los valores de ω para todos los sitios) como se sugiere en el manual de uso de PAML.

Una alternativa es el programa TreeSAAP (Woolley et al. 2003), es utilizado para detectar selección en linajes y sitios estimando la magnitud de los cambios aminoacídicos, evalúa la influencia de los cambios no sinónimos basándose en 31 propiedades estructurales y bioquímicas de los mismos. Las sustituciones no sinónimas son clasificadas en 8 categorías, dependiendo de la magnitud del cambio en las propiedades, ordenadas de 1 a 8 siendo 1 la categoría donde se encuentran los cambios menos influyentes y 8 donde se encuentran los cambios más radicales. Aquellas ramas en las cuales hay aminoácidos que presentan cambios radicales en las propiedades respecto de la reconstrucción ancestral, son posibles de estar bajo selección. En este trabajo solo se conservaron los cambios aminoacídicos que tuvieron una probabilidad menor a 0.01 de presentar un cambio radical (categorías 6, 7 y 8) en las propiedades estructurales y bioquímicas.

Los resultados obtenidos por los métodos arriba descritos para el set de datos utilizado, se compararon entre ellos y con la estructura de la hemoglobina disponible

en las bases de datos públicas para integrar, en la medida de lo posible, estos datos a los aspectos estructurales y funcionales de las moléculas de hemoglobinas.

Resultados

Descripción de las secuencias obtenidas

Se diseñaron un conjunto de cebadores que fueron puestos a prueba realizando combinaciones entre ellos a la hora de diseñar las PCR. Una fracción de estas combinaciones amplificó la región del genoma de interés. Se logró secuenciar exitosamente las cadenas nucleotídicas de alfa-globina de 15 ejemplares de diferentes especies. Los cebadores utilizados para tal fin están especificados en tabla 1 y se ubican en la región génica según se presenta en la figura 2. También, se obtuvieron de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 3 secuencias más, que corresponden a un análisis computacional automatizado de un fragmento de mRNA maduro de las especies *C.porcillus*, *C.lanigera* y *O.degus* cuyos códigos de acceso de GenBank son XM_003478407.2, XM_005391672.1 y XM_004627947.1 respectivamente. De las especies *C.aperea*, *A.fuscus*, *P.longicaudatus*, *T.barrerae* y *C.lanigera* se obtuvo la secuencia de un individuo por especie, mientras que de *C.sociabilis*, *C.rionegrensis*, *C.leucodon*, *S.cyanus* y *O.degus* se obtuvieron de dos. De la especie *O.degus* una tercera secuencia se obtuvo de GenBank.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación del gen de alfa-globina. Nombre y secuencia de los cebadores efectivamente utilizados para la amplificación del gen de alfa-globina

Nombre del cebador	Secuencia del cebador en sentido 5' – 3'
N	ACACCCTTCTGGTTCTGACA
HAF 3	CCAgCCAATGArCGTGGCTGTGCAGGGCTT
HAF 4	TTCTGGTTCTGACACAGACTCAGrAAG
P	CTTTATTCAAAGACCAAGAGGT
I	AGACTTTATTCAAAGACCAAGAGGT
HAR 6	CTTAGCGGTATTTGGAAGTCAGCACG

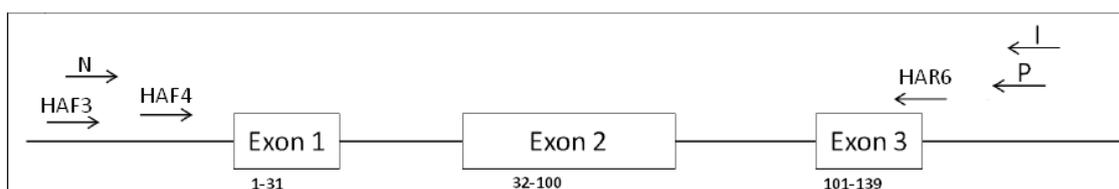


Figura 2. Posición de cebadores utilizados para la amplificación del gen de alfa-globina. HAR6 se encuentra sobre el exón 3. Los números debajo de cada exón representan los aminoácidos extremos de cada uno de ellos.

En aquellas especies en las cuales se cuenta con dos o tres secuencias del gen, se realizó una comparación entre las mismas de modo de tener un control interno, evaluando el número de cambios pareados en exones e intrones (tabla 2).

Tabla 2. Detalle de secuencias utilizadas por especie. Listado de las especies para los que se obtuvo la secuencia de la alfa globina (indicando los cebadores correspondientes) y aquellas tomadas de Genbank (*), Se especifica: el largo efectivamente legible de cada secuencia (menor para las obtenidas en Genbank porque carecen de intrones), se presenta la posición donde comienza y finaliza cada secuencia respecto de *Cavia porcellus* reportada en GenBank y se resume el número de cambios intraespecíficos presentes entre los intrones y exones.

	Cebadores	Largo (pb)	Posición respecto a <i>C. porcellus</i>		# de cambios	
			primer exón	último exón	exones	intrones
<i>C. porcellus</i> *	HAF3/HAR6	672	-29 en 5'	-17 en 3'	1	0
	-----	562	-29 en 5'	+104 en 3'		
<i>C. aperea</i>	N	566	-26 en 5'	-120 en 3'	-----	-----
<i>C. lanígera</i> *	-----	562	-29 en 5'	+104 en 3'	-----	-----
<i>C. sociabilis</i>	N/P	551	-29 en 5'	-131 en 3'	2	2
<i>C. rionegrensis</i>	HAF4/HAR6	605	+35 en 5'	-13 en 3'		
	HAF4/HAR6	663	-20 en 5'	-11 en 3'	0	0
<i>C. leucodon</i>	HAF4/HAR6	606	+36 en 5'	-11 en 3'		
	HAF4/HAR6	659	-20 en 5'	-15 en 3'	-----	-----
<i>O. degus</i> *	HAF4/HAR6	-----	-----	-----		
	-----	429	0 en 5'	0 en 3'	0	-----
<i>S. cyanus</i>	HAF3/HAR6	669	-29 en 5'	-11 en 3'		2
	HAF4/HAR6	667	-29 en 5'	-13 en 3'		
	N/I	753	-26 en 5'	+77 en 3'	0	0
<i>A. fuscus</i>	HAF4/HAR6	363	+185 en 5'	-107 en 3'		
<i>P. longicaudatus</i>	HAF3/HAR6	669	-29 en 5'	-11 en 3'	-----	-----
<i>T. barrerae</i>	N/I	749	-29 en 5'	+77 en 3'	-----	-----
	N/I	755	-26 en 5'	+75 en 3'	-----	-----

Entre las regiones exónicas de *S. cyanus*, *O. degus* y *C. rionegrensis* no existe ningún cambio nucleotídico a nivel intraespecífico. Los dos cambios que presenta la región exónica de *C. sociabilis*, corresponde con una disminución en la calidad de la secuencia de uno de los individuos cercana al extremo 3' de la cadena nucleotídica. Lo mismo ocurre con el cambio que ocurre entre las secuencias de *C. porcellus*. En ambos casos se seleccionó la secuencia por especie que presentara mejor calidad en los cromatogramas para los nucleótidos donde hubo diferencias para continuar estudios. Una vez seleccionadas las secuencias por calidad, se trabajó con 10 secuencias, una por especie, manteniendo únicamente la región exónica sobre la que se aplicaron las pruebas para identificar señales de selección positiva. Para las tres especies de

Ctenomys y *Aconaemys fuscus*, no fue posible la secuenciación total del gen faltando de 12 a 15 nucleótidos en la región 3', perteneciente al último exón. La secuencia codificante completa de este gen para estas especies es de 429 nucleótidos, para los siguientes análisis se utilizaron los primeros 414 nucleótidos que son los que se encuentran disponibles en las 10 especies. El número de nucleótidos en que difieren las secuencias de la α -globina entre pares de especies se presenta en la tabla 3, y es lo esperado de acuerdo a la filogenia aceptada del grupo (Opazo 2005): a pesar de que se presenten en torno a 20 diferencias entre cualquier *Ctenomys* (3 especies) con cualquier octodóntido (4 especies), y que estos últimos tengan mucha menor variación entre sí, no pareciera haber variación en las diferencias entre cualquiera de las siete especies mencionadas, respecto de las tres restantes (*P. longicaudatus*, *C. lanigera*, *C. porcellus*), consecuencia evidente de los eventos de especiación desde el oligoceno temprano (Opazo 2005).

En todos los casos se trabajó con la concatenación de los 3 exones que codifican para la alfa-globina adulta de las 10 especies. Se asume como válida la filogenia que se muestra en la figura 1, que es ampliamente aceptada para estos roedores (Honeycutt et al. 2003, Opazo 2005) y fue recobrada por en este estudio.

Tabla 3. **Diferencias pareadas entre las secuencias nucleotídicas del gen de la α -globina de las 10 especies en estudio.** Las diferencias se contabilizan como el número de nucleótidos diferentes. En amarillo comparaciones internas del género *Ctenomys*, en rojo las diferencias internas entre octodontidos, en verde las diferencias entre *Ctenomys* y octodontidos, en celeste las diferencias entre *P. longicaudatus* y todos los anteriores, en gris las diferencias entre *C. lanigera* y todos los anteriores, y en rosado las diferencias entre *C. porcellus* y todas las anteriores.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>C. rionegrensis</i>		1	1	20	22	21	24	36	45	62
2. <i>C. leucodon</i>			2	21	23	22	25	37	46	63
3. <i>C. sociabilis</i>				19	21	20	23	37	46	61
4. <i>A. fuscus</i>					2	3	4	32	44	58
5. <i>S. cyanus</i>						5	6	34	44	58
6. <i>O. degus</i>							7	35	47	61
7. <i>T. barrerae</i>								36	47	61
8. <i>P. longicaudatus</i>									47	63
9. <i>C. lanigera</i>										64
10. <i>C. porcellus</i>										

Detección de selección positiva

[Servidor DataMonkey](#)

MEME

El programa MEME, es el sugerido por el servidor para buscar evidencia de selección diversificadora y episódica en sitios individuales. El programa muestra 2 sitios posibles de haber estado bajo la acción de la selección direccional positiva con un P-valor menor al 0.05: el sitio 58 en la rama basal de los octodontidos y el 131 en la rama que conduce a *P.longicaudatus* (Figura 3). Otros 3 sitios: el 13, el 72 y el 112 presentan una probabilidad menor al 0.1 de haber estado bajo el mismo efecto (figura 4) .El programa identificó en el sitio 13 la rama que conduce al ancestro común de *C. rionegrensis* y *C. leucodon*. En el sitio 72, 4 ramas diferentes, tres de ellas dentro del grupo de los octodontidos. Y en el sitio 112 se registra selección en la rama basal de los *Ctenomys* produciéndose dos cambios no sinónimos en dicho codón para dichos linajes.

El Factor Empírico de Bayes (EBF) es un valor empírico que da una medida de la probabilidad de tener ω mayor que uno. Cuanto más roja la rama se presente, mayor el valor de EBF La notación 0:2 sobre la rama en la figura 3 indica el número de cambios sinónimos (0), respecto del número de cambios no sinónimos (2), que se acumularon en ese codón.

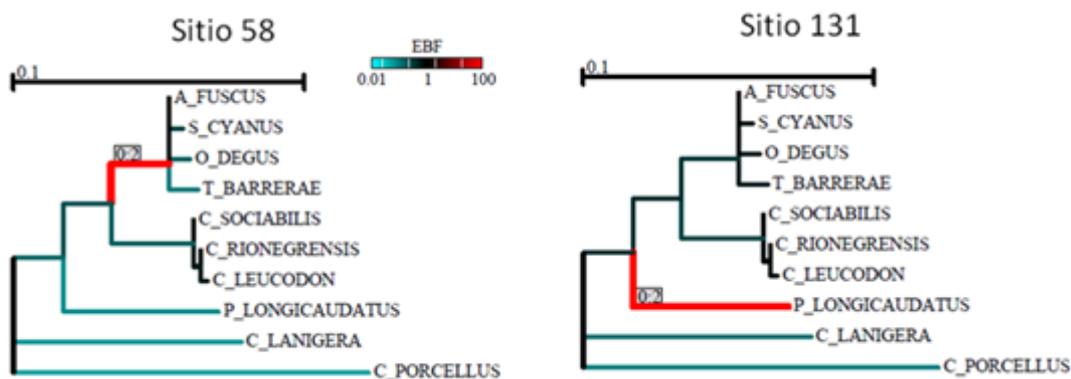


Figura 3. **Resultados del programa MEME en las secuencias nucleotídicas de alfa-globinas.** En rojo se muestran las ramas que el programa MEME encontró bajo selección, con un p-valor menor a 0.05. Los recuadros en gris muestran el número de cambios sinónimos (izquierda), respecto de los no sinónimos (derecha) para ese sitio únicamente para la rama sobre la que aparece.

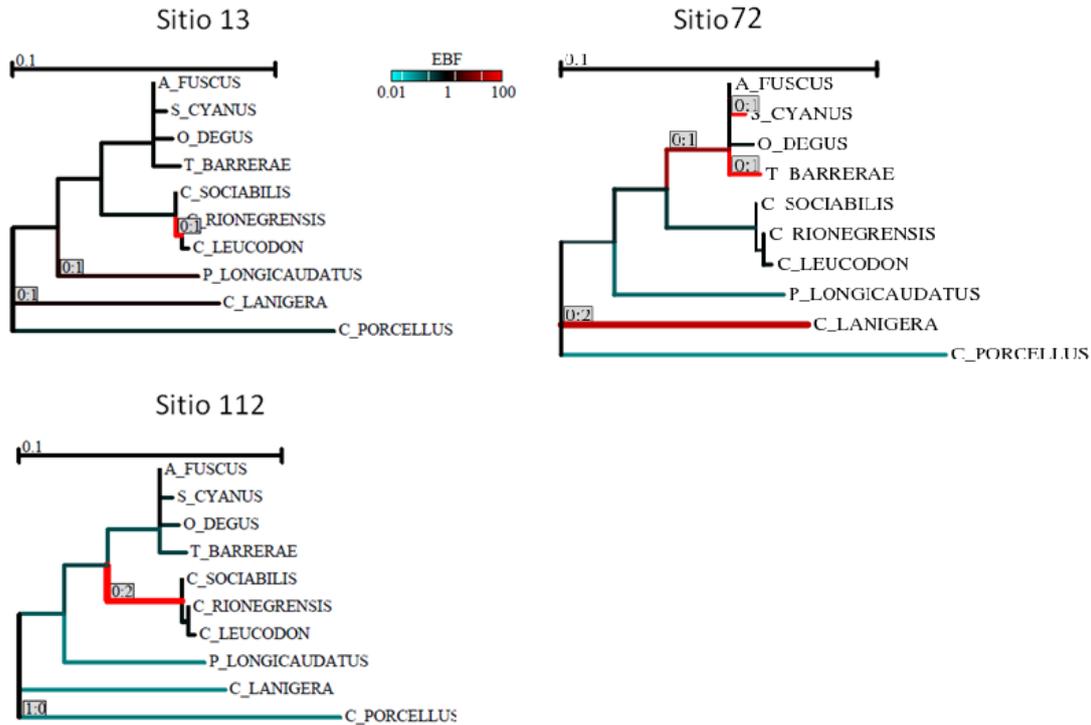


Figura 4. **Resultados del programa MEME con las secuencias nucleotídicas de alfa-globinas.** En rojo se muestran las ramas que el programa MEME encontró bajo selección, con un p-valor entre 0.05 y 0.1. Los recuadros en gris muestran el número de cambios sinónimos (izquierda), respecto de los no sinónimos (derecha) para ese sitio únicamente para la rama sobre la que aparece.

Los cambios aminoacídicos implicados en los sitios que el programa MEME detectó bajo selección se detallan a continuación y resumen en la tabla 4. En el sitio 58 una alanina es sustituida por una serina en la rama basal de los octodóntidos. En el sitio 131 También hay cambio de alanina por serina en la rama que conduce a *P. longicaudatus*. En el sitio 13 una treonina es sustituida por alanina en al menos dos linajes independientes. En el sitio 72 son varios los cambios nucleotídicos no sinónimos que aparecen, por un lado en la rama basal de los octodontidos ocurre un cambio de glicina por ácido glutámico. Luego internamente en este grupo ocurren dos cambios no sinónimos independientes: el ácido glutámico es sustituido por asparagina en *S.cyanus* y por ácido aspártico en *T.barrerae*. En la rama que conduce a *C.lanigera* la glicina es sustituida por asparagina. Por último en el sitio 112 ocurre cambio de alanina por leucina en la rama basal del género *Ctenomys*.

Tabla 4. Se presentan los cambios de aminoácidos (y nucleotídicos) en las posiciones señaladas en el MEME bajo selección

Cambio aminoacídico (codón) en sitio						
Especie	13	58	72	112	131	
<i>C. rionegrensis</i>	A (GCT)	A (GCC)	G (GGC)	L (CTC)	A (GGC)	
<i>C. leucodon</i>	A (GCT)	A (GCC)	G (GGC)	L (CTC)	A (GGC)	
<i>C. socibilis</i>	T (ACT)	A (GCC)	G (GGC)	L (CTC)	A (GGC)	
<i>A. fuscus</i>	T (ACT)	S (AGC)	D (GAC)	A (GCC)	A (GGC)	
<i>S. cyanus</i>	T (ACT)	S (AGC)	N (AAC)	A (GCC)	A (GGC)	
<i>O. degus</i>	T (ACT)	S (AGC)	D (GAC)	A (GCC)	A (GGC)	
<i>T. barrerae</i>	T (ACT)	S (AGC)	E (GAA)	A (GCC)	A (GGC)	
<i>P. longicauda</i>	A (GCT)	A (GCC)	G (GGC)	A (GCC)	S (GAG)	
<i>C. lanígera</i>	A (GCT)	A (GCC)	N (AAC)	A (GCC)	A (GGC)	
<i>C. porcellus</i>	T (ACT)	A (GCC)	G (GGC)	A (GCT)	A (TGC)	

Branch-siteREL y GA-Branch

El programa branch-siteREL, no encontró ramas bajo selección. El programa GABranch, sugiere eventos selectivos en la rama que conduce a *S. cyanus* y la rama que conduce a *C. rionegrensis* y *C. leucodon* (Fig. 5).

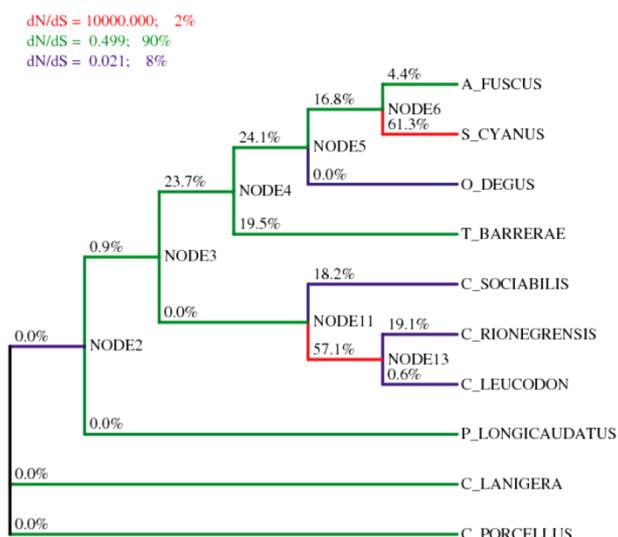


Figura 5. Resultado del test de Selección por el método de GABranch, las ramas en rojo indican linajes con valores altos de dN/dS

PRIME

Se utilizó una vez más un programa de la base de datos de DataMonkey, el PRIME, que se utiliza para la búsqueda de propiedades aminoacídicas (sitio específicas) que están siendo preservadas o modificadas por procesos evolutivo. Sin encontrar sitios en los cuales las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos, hayan cambiado significativamente.

Programa PAML

El estudio de selección por linajes no arrojó resultados positivos. No hubo diferencia significativa entre asignar una única ω a todas las ramas, que el modelo más complejo donde la estimación de este parámetro varió libremente. El análisis por sitios, no mostró resultados significativos usando el test recomendado M8-M8a (Yang 2007). Los resultados más interesantes se ven en los modelos por ramas y sitios. Se probaron aquellas combinaciones de ramas forward (aceleradas) relevantes para el estudio (como subterráneos y no subterráneos) y aquellas de interés en comparación con los resultados anteriores y los test recomendados (Yang 2007). De los modelos ensayados, vale destacar que el modelo al que se le permitió que la rama basal de los octodontidos tuviera valor de ω distinto del conjunto de las demás ramas tuvo diferencias significativas con el modelo nulo ($p < 0.05$). Bajo este modelo, se encontraron dos sitios con una probabilidad posterior alta de estar sujetos a selección según el Bayes Empirical Bayes (BEB) coincidentes con los resultados obtenidos por el MEME (sitios 58 ($p=0.919$) y 72 ($p=0.838$)).

TreeSAAP

Por otra parte se utilizó el programa TreeSAAP, que se utiliza también para estudiar los cambios fisicoquímicos en las proteínas, pero mediante una aproximación diferente a los métodos anteriores. Algunos de los cambios más importantes fueron en las tendencias de las alfa hélices, y en la constante de equilibrio de ionización del COOH (Fig. 6). Este método es de mayor sensibilidad que el PRIME. Los sitios 13, 58 y 72 coinciden en el hecho de estar sujetos a selección con los señalados por MEME y PAML.

Los cambios en las propiedades de los aminoácidos de las ramas que van a las especies *C. porcellus*, *C. lanígera* y *P. longicaudatus*, no fueron tomados en cuenta ya que debido al gran número de diferencias respecto de las demás secuencias (tabla 3), se suscitaban una cantidad grande de cambios en las propiedades las cuales no tendrían porque estar relacionadas con la selección.

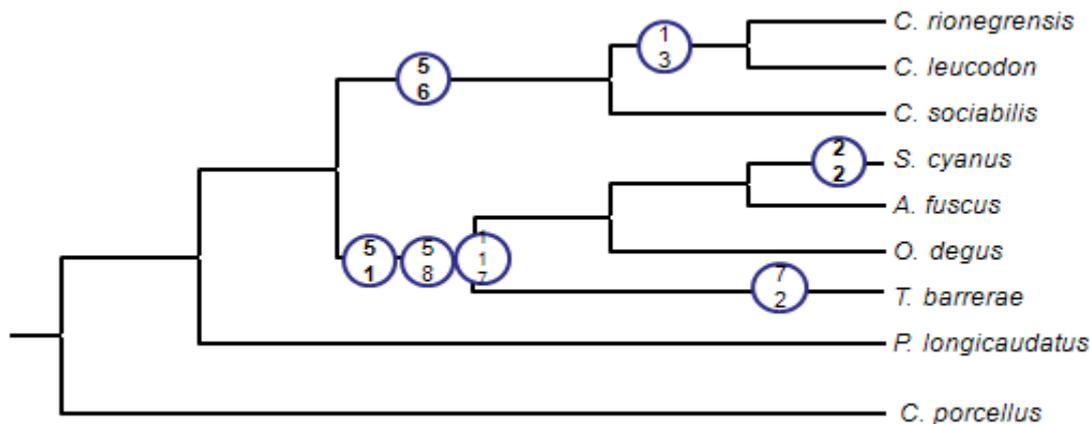


Figura 6. Para las distintas ramas se presenta en un círculo el codón al cual se le ven alteradas sus propiedades fisicoquímicas los resultados se obtuvieron a un P-valor de 0.01,

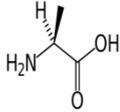
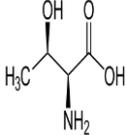
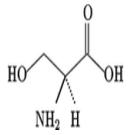
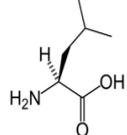
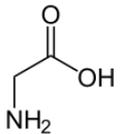
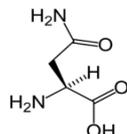
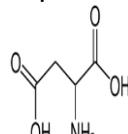
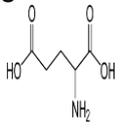
Discusión

Una base de datos de ADN puede ser sometida a tres tipos de test de selección: selección en sitios, selección en ramas y selección en sitios y ramas. En forma general se puede decir que si bien los test que pretendían encontrar selección en sitios y selección en ramas, no la encontraron, los test que pretendían encontrar selección en sitios y ramas simultáneamente, encontraron algunos codones en linajes particulares bajo selección positiva. Los Métodos utilizados para este último tipo de análisis fueron MEME, PAML y TreeSAAP. Hay que tener en cuenta que los tres métodos utilizados tienen sus limitaciones. El PAML y el MEME son muy exigentes determinando señales de selección positiva y posiblemente se pueda estar despreciando algún sitio sometido a selección direccional positiva. Esto es particularmente importante para este gen, ya que debido a la importancia biológica del mismo, está siendo sometido constantemente a una alta presión de selección purificadora y una pérdida en la detección de un sitio bajo selección positiva, podría hacer la diferencia en la respuesta a la pregunta que pretende abordar este trabajo al momento de asignar si determinados cambios aminoacídicos son adaptaciones o no. A diferencia de los dos métodos señalados, el TreeSAAP es un método alternativo que no se basa en estimar dN/dS y es de mayor sensibilidad (Woolley et al. 2003), lo que se verifica en este trabajo ya que a pesar de las restricciones que se consideraron, el análisis resultó con un gran número de sitios identificados bajo selección. La principal crítica que se ha planteado es la tasa de falsos positivos, y para contrarrestar este efecto fue que se seleccionaron únicamente aquellos cambios con un p-valor menor al 0,01. Sin embargo y pese a las diferencias en la forma

de detección de los distintos métodos, los sitios 58 y 72 son reconocidos por los tres métodos de estar bajo selección direccional positiva.

Según los resultados obtenidos por el MEME, los sitios que están sometidos a selección direccional positiva, no son siempre en las ramas que uno esperaba a priori. En la rama basal de los octodóntidos hay evidencia de selección positiva en el sitio 58 donde dos cambios nucleotídicos en dicho codón determinan un reemplazo de alanina (GCC) por serina (AGC), siendo el ancestral un aminoácido hidrofóbico (apolar) y el derivado en dicha rama uno hidrofílico. La estructura de estos aminoácidos se muestra en la tabla 6. No resulta extraño, por lo mencionado anteriormente, que el programa TreeSAAP haya identificado ese mismo reemplazo como responsable de un fuerte cambio en las propiedades fisicoquímicas. El programa PAML también reconoce este resultado dándole mayor robustez al mismo y disminuyendo las probabilidades de que se esté en presencia de un falso positivo. Este sitio es de especial interés ya que es adyacente a un aminoácido de histidina que pareciera estar altamente conservado en las secuencias de alfa globina en varios órdenes de mamíferos según una revisión personal. La posición que ocupa esta histidina en una de las cadenas α de la hemoglobina es presentada en la figura 7. El grupo imidazol que presenta como grupo funcional de dicho aminoácido interactúa con el oxígeno captado por la proteína facilitando la unión reversible del mismo y colabora en la estabilización del enlace Fe-O₂ (Storz y Moriyama 2008). Es decir, un solo cambio aminoacídico podría estar explicando diferencias en las afinidades de las proteínas por el oxígeno, facilitando la carga y descarga de oxígeno de la proteína y podría implicar que los cambios de reemplazo seleccionados, lo sean para la fosorialidad en general y no únicamente para la subterrneidad como se podría especular dado el grupo de especies que involucra este cambio en la filogenia ya que la mayoría de este grupo son fosoriales, y dentro de este se especializa *Spalacopus sp.* en la colonización del nicho subterráneo *in extremis*. Es esperable que los fosoriales también enfrentan períodos de hipoxia en determinadas ocasiones, como en el nido comunitario, por ejemplo. Esta invasión ha ocurrido recientemente, y tiene muy poca divergencia con su pariente más cercano *Aconaemys spp.* La diferenciación puede estar facilitada si ya existiera un contexto favorable.

Tabla 6. Aminoácidos involucrados en los reemplazos aminoacídicos detectados bajo selección por el programa MEME.

Aminoácido	Alanina (A)	Treonina(T)	Serina(S)	Leucina(L)
Estructura Espacial				
Aminoácido	Glicina (G)	Asparagina(N)	Ácido Aspártico(D)	Ácido glutámico(E)
Estructura Espacial				

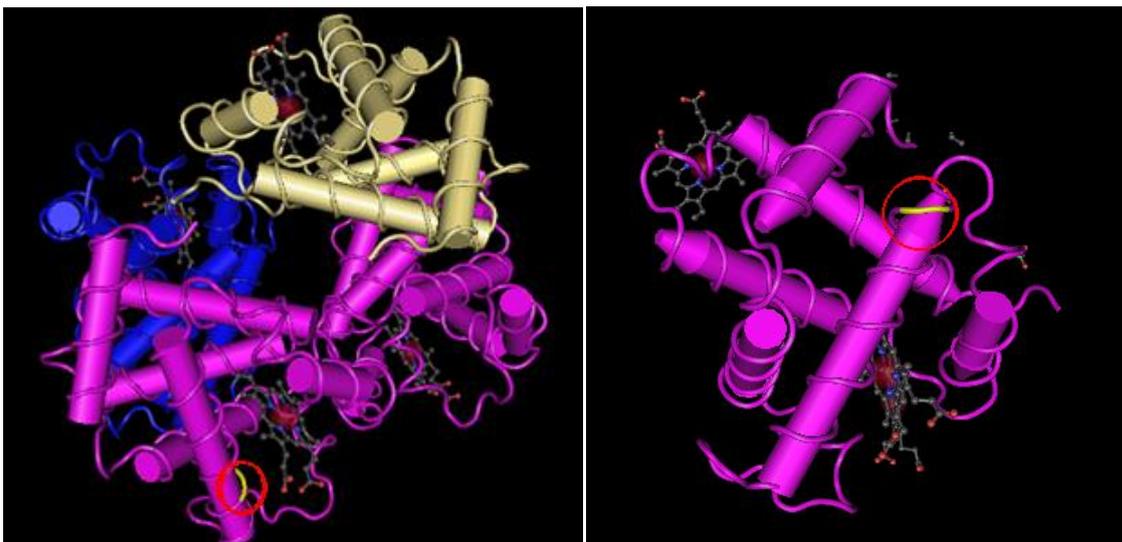


Figura 7. Estructura de la Hemoglobina de *Cavia porcellus*. En rosado se muestra la cadena de alfa globina, en amarillo. Dentro del círculo rojo, se encuentra el residuo de histidina adyacente al sitio 58 (izquierda), y el aminoácido número 72 en el extremo de una hélice alfa (derecha), la estructura 3D de esta proteína se encuentra en el link <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=82919> y se visualizó mediante el programa Cn3D presente en la base de datos de Gen Bank.

El otro sitio que tanto el MEME, el PAML como el TreeSAAP reconocieron bajo selección es el sitio 72, con la particularidad que se registraron cambios no sinónimos en 4 ramas para este codón. En la rama basal de los octodóntidos ocurre un cambio de G a A en la segunda posición del codón lo que resultó en un cambio de glicina a ácido aspártico en algún ancestro común a las cuatro especies. Este cambio podría tener implicancias funcionales para la hemoglobina, ya que un aminoácido no polar fue sustituido, por un aminoácido polar cargado negativamente, produciendo cambios en la carga neta de la proteína y posiblemente, en la estructura terciaria de la misma. Esto también podría estar involucrado en una adaptación a la fosorialidad en general y no tanto a la subterrneidad, como también ocurre en la misma rama en el sitio 58

discutida arriba. Posteriormente en dos de las ramas que divergen dentro del grupo, se acumularon dos cambios aminoacídicos independientes uno del otro. Una molécula de ácido aspártico fue reemplazada por ácido glutámico en la especie *Timpanoctomys barrerae*. En este sitio, el TreeSAAP volvió a encontrar cambios en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos involucrados (Fig. 6). También en la rama que conduce a *S. cyanus* el ácido aspártico es reemplazado por asparagina. Incluso en el mismo sitio ocurre un cambio de Glicina a asparaginina en la rama que conduce a *C. lanigera* de manera independiente del cambio ocurrido en los octodóntidos. Que en un sitio en el cual se encontraba el aminoácido con estructura de menor tamaño, se sustituya por otro de una cadena lateral compuesta por varios átomos de carbono, evidencia lo particular que fue dicho cambio. Un análisis estructural revela que el aminoácido en cuestión se encuentra formando una hélice alfa (Fig. 7), este casualmente es adyacente a un aminoácido de histidina también altamente conservado pero que no forma parte directa en la unión del oxígeno a la proteína (revisión personal de secuencias nucleotídicas en la base de datos de GenBank para varios órdenes de mamíferos).

El hecho de que los octodóntidos muestren dos sitios (58 y 72) bajo selección en su rama basal, sugiere que quizás la adaptación a ambientes con bajo oxígeno comenzó antes de la divergencia del grupo. Dado que todos los miembros de este grupo son al menos de hábitos fosoriales, es posible que adaptaciones en la estructura aminoacídica de la hemoglobina permita la fosorialidad del grupo.

Dentro de una de las ramas internas del género *Ctenomys*, la que divide a *C. rionegrensis* y *C. leucodon* de *C. sociabilis*, se suscita otro cambio aminoacídico en el sitio 13, reconocido por el MEME con un valor marginal. En este caso una treonina es sustituida por una alanina, lo que resulta en un cambio de un aminoácido hidrofílico por otro hidrofóbico. Una vez más, tal cambio fue advertido por el programa TreeSAAP, por el evidente cambio en las propiedades fisicoquímicas que representa. Un cambio seleccionado en esta región del árbol podría interpretarse como una adaptación a la hipoxia del ambiente subterráneo, ya que, como se ha mencionado arriba, estas especies son subterráneas, incluso *C. sociabilis* que presenta el carácter de la forma ancestral, (por lo que no está contemplado en el cambio adaptativo), tiene ciertos comportamientos que hacen de esta interpretación un poco ambigua, por ejemplo deja las bocas de las cuevas abiertas, lo que podría permitir una mayor circulación de los gases oxígeno y dióxido de carbono.

En la rama basal de *Ctenomys* se encuentra presente un cambio aminoacídico en el sitio 112 donde una alanina es reemplazada por una leucina y donde dos cambios nucleotídicos fueron requeridos para determinar dicho cambio. Si bien se trata de un cambio entre dos aminoácidos hidrofóbicos, la leucina es un aminoácido cuyo grupo funcional es más grande y ramificado, pudiendo producir impedimento estérico en la proteína.

Los cambios producidos en los sitios 13 y 112, podrían estar implicados en adaptaciones del género *Ctenomys* a la subterrneidad y contribuye con la evidencia aportada en otros estudios sobre adaptaciones moleculares realizados en citocromo b y otros genes mitocondriales (Da Silva et al. 2009, Tomasco & Lessa 2010, Tomasco et al. 2014).

Evidencia también de selección positiva se encuentra presente en la rama que conduce a *P. longicaudatus* en el sitio 131 para el programa MEME. En este caso también se da una sustitución aminoacídica de una alanina por una serina, y si bien los cambios nucleotídicos no sinónimos necesarios para determinar dicho reemplazo son dos respecto de *C. lanigera* y tres respecto de *C. porcellus*, los codones no son idénticos a los del sitio 58 (Tabla 4). La posible interpretación biológica que pueda traer aparejado tal evento de selección escapa a los objetivos de este trabajo. De todos modos, es interesante aclarar que a pesar de la baja probabilidad del MEME de señalar un falso positivo, este evento es posible y llama la atención que este sitio, no haya sido interpretados por otros métodos como un sitio que se encuentra bajo selección a diferencia de lo ocurrido con los sitios previamente descritos para los cuales los tres métodos coincidían.

Los modelos implementados para detectar selección positiva por linajes no mostraron resultados significativos, ya que el efecto "linaje" se promedia entre todos los sitios del mismo. Lo mismo sucede con los modelos por sitio, donde el efecto "sitio", se promedia para todos los linajes implicados. Esto ocurre en casos en donde la selección episódica, confinada a un breve momento en un sitio en particular, como puede ser el caso de este gen dada la fuerte acción de la selección purificadora en contra de nuevas variantes ya que este gen es de gran importancia funcional, se encuentra sumamente restringido a la hora de acumular mutaciones en su secuencia.

De todos modos, los resultados obtenidos por el GA-Branch reconocen selección en el linaje que conduce a *S. cyanus* y en una rama interna del género *Ctenomys*. Si este resultado se presentara aislado poco sería su valor, pero sumado a la vasta evidencia de selección proporcionada por los otros métodos, no es una utopía pensar que este gen haya sido seleccionado en estos linajes en particular. Incluso se estaría dejando por fuera a una especie de *Ctenomys* (*C. sociabilis*), que en la literatura también la

describe como subterránea, tiene ciertos comportamientos que hacen de esta interpretación un poco ambigua, por ejemplo deja las bocas de las cuevas abiertas, lo que podría permitir una mayor circulación de los gases oxígeno y dióxido de carbono. Realizar estudios que midan la afinidad de la proteína por el oxígeno en las distintas variantes que se presenta en este grupo de especies tan cercano, complementaría los estudios moleculares realizados en este trabajo y respondería algunas interrogantes sobre el papel de algunos de los cambios percibidos. Este estudio debería ser también, complementado con al menos la otra subunidad que constituye a la proteína, la beta-globina.

La evidencia que proporcionan estos análisis sobre los efectos de la selección natural en genes involucrados en el metabolismo del oxígeno, lejos de ser determinantes, abren las puertas a estudios de selección de otras secuencias génicas relevantes. En primer lugar, una secuencia de interés podría ser la subunidad beta de la hemoglobina cuya secuencia nucleotídica podría aclarar y sumar evidencia a la obtenida en la cadena alfa e incluso se podrían establecer si ocurre selección en los sitios de contacto o en los sitios en los cuales la beta globina tienen contacto directo con el oxígeno. En segundo lugar se podría secuenciar el resto de los genes de la familia de las globinas como ser la mioglobina, la citoglobina o la neuroglobina, y someterlos al mismo tipo de análisis que ha sido sometida la alfa globina. Por último y con una visión integradora de las adaptaciones en general al ambiente subterráneo, se podría ahondar en el estudio de otras adaptaciones al sistema respiratorio que permitan a los mamíferos subterráneos vivir y desarrollar todas sus actividades a bajas presiones de oxígeno ambiental.

Bibliografía

Ar, A., R. Arieli and A. Shkolnik.(1977) Blood-gas properties and function in the fossorial mole rat under normal and hypoxic-hypercapnic atmospheric conditions. **Respiratory Physiology** 30:210-218.

Arieli R, Ar A (1979) Ventilation of a fossorial mammal (*Spalax ehrenbergi*) in hypoxic and hypercapnic conditions. **Journal of Applied Physiology** 47:1011–1017

Arieli R, Nevo E (1991) Hypoxic survival differs between two mole rat species (*Spalax ehrenbergi*) of humid and arid habitats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** 100:543–545

Avivi A., Shams I., Joel A., Lache O., Levy A.P. and Nevo E. (2005) Increased blood vessel density provides the mole rat physiological tolerance to its hypoxic subterranean habitat. **FASEB Journal**. 19:1314-1316.

Avivi A, Brodsky L, Nevo E, Band MR (2006) Differential expression profiling of the blind subterranean mole rat *Spalax ehrenbergi* superspecies: bio-prospecting for hypoxia tolerance. **Physiology Genomics** 27:54–64

Begall S, Burda H, Schleich CE. (2007) Subterranean Rodents: news from underground. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**.

Broekman MS, Bennett NC, Jackson CR, Weber RE (2006) Does altitudinal difference modulate the respiratory properties in subterranean rodents (*Cryptomys hottentotusmahali*) blood?. **Physiology Behavior** 88:77-81.

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

Da Silva CC; Tomasco IH, Hoffmann F, Lessa EP (2009) Genes and Ecology: Accelerated Rates of Replacement Substitutions in the Cytochrome b Gene of Subterranean Rodents. **The Open Evolution Journal**, 3:17-31.

Filatov DA (2002) ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. **Molecular Ecology Notes** 2:621-624

Futuyma D.J., (2005) **Evolution**. Segunda edición. Massachusetts Estados Unidos. SINAUER ASSOCIATES, INC.

Hoffmann FG, Opazo JC, Storz JF (2008)a New genes originated via multiple recombinational pathways in the beta-globin gene family of rodents. **Molecular Biology and Evolution** 25:2589- 2600.

Hoffmann FG, Opazo JC, Storz JF (2008)b Rapid rates of lineage-specific gene duplication and deletion in the alpha-globin gene family. **Molecular Biology and Evolution** 25:591-602.

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. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 26:476–489.

Hiebl, I., G. Braunitzer, and D. Schneeganss. (1987) The primary structures of the major and minor hemoglobin-components of adult Andean goose (*Chloephaga melanoptera*, Anatidae): the mutation Leu-Ser in position 55 of the beta-chains. *Z. Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 368:1559-1569.

Kosakovsky Pond, S.L., Frost, S.D.W. (2004) A Genetic Algorithm Approach to Detecting Lineage-Specific Variation in Selection Pressure. *Molecular Biology and Evolution* 22:478-485

Kosakovsky Pond, S.L., Murrell, B., Fourment, M., Frost, S.D.W., Delpont, W., Scheffler, K., (2011) A random effects branch-site model for detecting episodic diversifying selection. *Molecular Biology and Evolution* 28:3033–3043.

Lechner AJ (1977) Metabolic performance during hypoxia in native and acclimated pocket gophers. *Journal of Applied Physiology* 43:965–970

Li, W. (1997). Rates and Patterns of Nucleotide Substitution. En: **Molecular Evolution**. **Sinauer Associates, Inc.** 205-213.

Miller, S.A., Dikes, D.D., Polesky, H.H., (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 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 Genetics* 8, e1002764.

Nei M. (2005) Selectionism and neutralism in molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution* 22(12):2318-2342.

Nevo E (1999) Mosaic Evolution of Subterranean Mammals: Regression, Progression, and Global Convergence. **Oxford University Press, Oxford, Great Britain**. 413

Opazo JC (2005) A molecular timescale for caviomorph rodents (Mammalia, Hystricognathi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:932-937

Piccinini, M., T. Kleinschmidt, K. D. Jurgens, and G. Braunitzer. (1990) Primary structure and oxygen-binding properties of the hemoglobin from guanaco (*Lama guanacoe*, Tylopoda). *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 371:641–648.

Storz JF, Hoffmann FG, Opazo JC, Moriyama H (2008) Adaptive functional divergence among triplicated alpha-globin genes in rodents. **Genetics** 178:1623-1638.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods **Molecular Biology and Evolution**. 28:2731–2739

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 25:4876-4882.

Tomasco IH, Del Río R, Iturriaga R, Bozinovic F (2010) Comparative respiratory strategies of subterranean and fossorial octodontid rodents to cope with hypoxic and hypercapnic atmospheres. **Journal of Comparative Physiology B**, 180:877-884.

Tomasco IH, Lessa EP (2011) The evolution of mitochondrial genomes in subterranean caviomorph rodents: Adaptation against a background of purifying selection. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 61:64-70.

Tomasco, I.H. Lessa, E.P. (2014) Two mitochondrial genes under episodic positive selection in subterranean octodontoid rodents. **Gene**. 534:371–378

Weber RE (2007) High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. **Respiratory Physiology & Neurobiology** 158:132-142.

Wilson E. & Reeder D.M., (2005) **Mammal Species of the World**. Tercera edición. Johns Hopkins University Press.

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.

Yang Z (2007) PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. **Molecular Biology and Evolution** 24:1586-1591.