



Facultad de Ingeniería

Escuela de Ingeniería Civil en Bioinformática

Búsqueda de variaciones en el número de copias y la secuencia de nucleótidos de los canales iónicos presentes en los cetáceos en su transición de vida terrestre a la acuática

Estudiante:

Cristóbal Loyola Uribe

Matrícula:

2016430035

Profesor Informante:

Dra. Janin Riedelsberger

Profesor Tutor:

Dr. Gonzalo Riadi

Co-tutor:

Dr. Juan C. Opazo

Co-tutor:

Dr. Braulio Valdebenito

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

Agradecimientos

Me gustaría comenzar estas palabras agradeciendo a la escuela de ingeniería Civil en Bioinformática perteneciente a la Universidad de Talca por brindarme siempre su apoyo en mi camino durante todos estos años. A todos los funcionarios que siempre se preocuparon para que nosotros estuviéramos en las mejores condiciones para estudiar tranquilos y en un buen ambiente.

Agradecer a todos los profesores de la escuela porque de todos aprendí algo que seguramente me ayudará en mi futuro como profesional de esta hermosa rama de la ciencia.

Dar las gracias infinitas a mi profesor tutor Gonzalo Riadi por permitirme hacer mis prácticas profesionales y tesis bajo su tutela y enseñanzas. Para mí el mejor profesor que he conocido durante mi vida de estudiante y sobre todo en la universidad porque siempre estuvo presente para responder mis dudas y ayudarme en todo lo necesario para hacerme crecer como futuro Bioinformático. Por su disposición cada vez que pudo para responder correos, corregir errores y enseñar en todo lo que estuviera a su alcance incluso con tiempo en su oficina con su clásica pizarra. Por ayudarme a entender mi rol dentro y fuera de un grupo de trabajo, por sus consejos personales y su guía en formar a alguien independiente y que pueda integrarse sin problema a un grupo con el objetivo de crear conocimiento y responder preguntas científicas y principalmente biológicas.

Al profesor Juan Opazo de la Universidad Austral, un excelente profesor que me ha ayudado mucho desde su área, sobre todo enseñándome que los trabajos que realizo se deben ver también desde la profundidad del área biológica a la que apuntan, cosas difíciles de ver para nosotros que estamos desde computadores analizando archivos. Agradecer su disposición para reunirse a cualquier hora y explicarme diferentes términos y técnicas que no conocía tanto en lo biológico y lo evolutivo de las especies. Por su guía y consejos a lo largo de nuestro trabajo y por los nuevos conocimientos que me lleve en cada reunión semanal que seguramente me guiaran en mi trabajo a futuro.

A mi co-tutor profesor Braulio Valdebenito, por darme una mano siempre que necesite guía en problemas computacionales y metodológicos haciendo que aprendiera mientras solucionaba diversos problemas que me impedían continuar con mi trabajo. Por ayudarme a

primeramente razonar y buscar de forma independiente las respuestas a mis preguntas que me hicieron alguien curioso y capaz.

A la profesora Wendy Gonzalez ya que desde su larga experiencia asociada a canales iónicos aportó y me enseñó cosas que no sabía y que me ayudaron a entender estas proteínas que son tan importantes para la vida.

A mi profesora informante que fue la primera persona en la que pensé a la hora de elegir un profesor para que me guiara y corrigiera al preparar mi tesis, porque en sus clases pude darme cuenta de cuanta dedicación pone en enseñar a los alumnos de la escuela y esto lo vi plasmado en cada una de mis correcciones y preguntas planteadas en las presentaciones.

Al profesor Gabriel Nuñez ex director de escuela, por siempre darme una mano con todo lo que necesité ya que me ayudó en momentos difíciles de mi carrera y que me dio siempre el impulso para continuar tanto como profesor como director de carrera.

Fuera de la escuela, a mi familia por ayudarme y guiarme siempre a estudiar y aumentar mis conocimientos para ser alguien culto y poder tener un gran futuro como profesional y persona. Por siempre tener la disposición en cualquier petición que me ayudó en mis estudios y que facilitaron mi carrera y sobre todo por cuidarme y mantener un buen estado de ánimo día a día con cariño.

A mis amigos que hice en la universidad que siempre me han apoyado y ayudado en cualquier momento, buenos y malos, los recuerdos que hicimos me los llevaré siempre donde vaya y las risas y buenos momentos nadie los borrará. Estoy seguro de que luego de terminar nos seguiremos juntando y riendo sobre cualquier cosa para olvidar por momentos nuestros problemas. A los amigos de infancia por siempre ofrecer ayuda, guiarme en decisiones y aportar en mi crecimiento como persona.

Finalmente quiero agradecer a todos los profesores que han participado en toda mi vida de estudios porque de todos aprendí algo que me han llevado a estar donde estoy y ser la persona que soy.

Resumen

Los cetáceos son un infraorden acuático perteneciente a los mamíferos, se calcula que alrededor de 50 millones de años atrás estos evolucionaron desde un animal terrestre. Este ancestro terrestre inmediato comenzó a evolucionar al cambiar sus hábitos ingresando al agua por la necesidad de alimento y para escapar de sus depredadores. Los cambios más notorios son los físicos donde las extremidades traseras disminuyeron a un tamaño prácticamente imperceptible y por ejemplo sus orificios nasales migraron hacia su espalda. La transición de la vida terrestre a la acuática supone diversos cambios necesarios para la supervivencia que son interesantes de estudiar, cambios en rasgos genéticos como la pérdida o la selección positiva de genes, los cambios en la expresión de proteínas, su estructura y funcionamiento son temas que generan interrogantes y con los datos y herramientas actuales es posible analizarlas y responderlas. Al mencionar proteínas hay muchas que son estudiadas con diversas funciones fundamentales, una de las categorías de proteínas más estudiadas a lo largo de los años es la de los canales iónicos. Los canales iónicos permiten el paso de iones a través de la membrana para mantener un equilibrio entre el exterior e interior de la célula, en este caso se estudiarán ya que los cetáceos tuvieron un cambio de hábitat y por lo tanto de las sustancias presentes en el medio circundante como el oxígeno y los iones. Estos canales provocan el potencial de acción que permite al organismo realizar acciones fundamentales como pensar, el latido del corazón y la excitación muscular entre muchas otras. El objetivo de este trabajo es estudiar cómo varió el número de canales presentes en los cetáceos en su transición de la tierra al agua y si la secuencia proteica de los canales iónicos sufrió cambios debido a las adaptaciones a las que debieron someterse estos mamíferos. Esta variación tanto en la secuencia como en el número de copias representaría un cambio en la necesidad de canales iónicos de los cetáceos para mantener la homeostasis en su adaptación a la vida acuática. La metodología utilizada incluye diversas herramientas computacionales con diferentes propósitos. Para la identificación de canales se utiliza Tmhmm2.0 y RPS-BLAST. Para análisis más específicos como la identificación de genes ortólogos se usó OMA y para las variaciones de secuencia y familia de proteínas se usó PAML y CAFÉ respectivamente. Los organismos estudiados son varios cetáceos como la Beluga, el delfín chino de río, la Orca, entre otros.

Índice

1. Introducción	6
1.1. Clasificación de los canales iónicos	8
1.1.1. Clasificación por ion que transporta	8
1.1.1.1. Canales de Potasio	8
1.1.1.2. Canales de Calcio	9
1.1.1.3. Canales de Sodio	9
1.1.1.4. Canales de Cloruro	10
1.1.2. Canales regulados por ligandos	10
1.1.3. Canales Mecanosensibles	10
1.1.4. Canales dependientes de voltaje	11
1.2. Estructura de los canales	12
1.3. Cetáceos	13
1.4. Osmorregulación	14
1.5. Enfoque de la investigación	15
1.5.1. Variaciones en la secuencia de las proteínas (canales iónicos)	16
2. Hipótesis	19
3. Objetivo general	19
4. Objetivos específicos	19
5. Metodología	20
5.1. Definición de los organismos a utilizar como modelo para identificar sus canales iónicos.	21
5.2. Predicción de segmentos transmembrana en secuencias de proteína.	22
5.3. Identificación y selección de los canales iónicos.	23
5.4. identificación de grupos de genes ortólogos y grupos jerárquicos.	25
5.5. Variación en el número de copias de canales iónicos en cetáceos.	26
5.6. Estudio de sustituciones sinónimas y no sinónimas en las especies de interés.	27
6. Resultados.	29
6.1. Resultados TMHMM y RPS-BLAST.	29
6.2. Resultados OMA.	29
6.2. Resultados CAFE.	32
6.3. Resultados PAML.	36
7. Discusión	38
8. Conclusiones	41
9. Referencias.	43

1. Introducción

Todos los organismos existentes están formados por células, estas cumplen diferentes roles que ayudan al cuerpo a mantenerse saludable y funcionando de forma óptima. Las células interactúan con el medio en todo momento y gracias a la homeostasis se logra mantener un equilibrio interno estable independiente a los cambios que se producen en el entorno. El intercambio de sustancias como nutrientes o iones de sodio y potasio que participan en diversos procesos fundamentales como la liberación de neurotransmisores y hormonas, mientras que la excreción ayuda a deshacerse de sustancias tóxicas del metabolismo.

En las células la presencia de membranas aporta un filtro para el paso de sustancias desde el interior de la célula al exterior y viceversa. Como se mencionó anteriormente una de las sustancias más importantes en los procesos realizados al interior de estas son los iones ya que participan en muchos procesos fundamentales generando potenciales de acción. Los potenciales de acción se discutirán más adelante ya que son fundamentales para el organismo en diversas tareas como la contracción muscular y la comunicación entre neuronas. Las proteínas transportadoras como los canales iónicos presentes en la membrana hacen a las células selectivas respecto a las sustancias que pueden atravesar al interior de la célula. Los componentes principales que no permiten el paso de iones al interior de la célula son los fosfolípidos, específicamente su segmento hidrofóbico que no permite la interacción con los iones y por lo tanto que estos puedan avanzar a través de la membrana. Esto deriva en que se requiera un método que facilite y haga posible este paso que es fundamental para llevar a cabo diferentes procesos, esta función de mediador es realizada por los canales iónicos (Jentsch et al., 2004).

Los canales iónicos son proteínas presentes en la membrana que como se menciona anteriormente permiten el paso de diferentes iones, estas son macromoléculas que poseen un poro formado por varias subunidades de proteínas a través del cual pasan los iones de manera pasiva. En estos, lo que determina el movimiento de los iones es el gradiente electroquímico. Este gradiente determina el movimiento de los iones ya que estos se moverán en la dirección en la que se encuentra el mayor gradiente electroquímico. El potencial se divide en la parte eléctrica y química en donde la química hace referencia a la

diferencia en la concentración de solutos a lo largo de la membrana y en la parte eléctrica se refiere a la diferencia en las cargas presentes de la misma forma en la membrana.

Continuando con los canales iónicos, estos son altamente selectivos y filtran las moléculas que pasan por el poro de dos maneras principalmente, por el tamaño del poro y en segundo lugar por lo especificidad que ofrece el segmento transmembrana del poro. El primer filtro asociado al tamaño es importante ya que la longitud del poro determinará el tamaño de iones que lo atravesarán, esto previene que iones muy voluminosos atraviesen la membrana. En cuanto a la especificidad, esto está dado en el interior del poro o segmento transmembrana por motivos de entre 15 a 20 aminoácidos (segmento amarillo de la proteína en la Figura 1) polares e hidrofóbicos altamente conservados (Gaidos et al., 2005), que interaccionan con el ion permitiendo o no su paso a través de la membrana al interior o exterior de la célula (Raghavan et al., 2019).

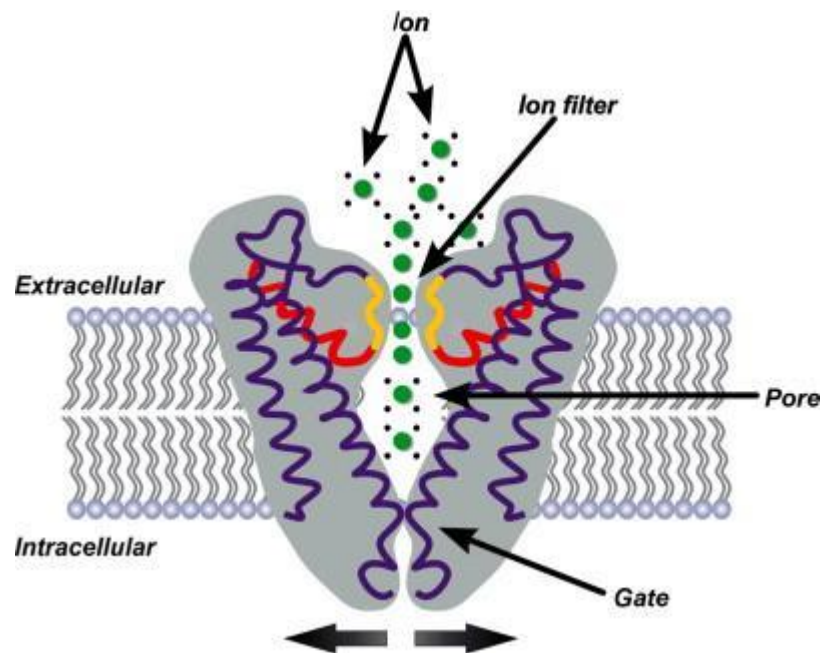


Figura 1: Representación simple de un canal iónico presente en la membrana, donde se puede apreciar la membrana, la compuerta, los iones y los filtros de estos iones (Motivo conservado) en el segmento de color amarillo en la proteína.

1.1. Clasificación de los canales iónicos

1.1.1. Clasificación por ion que transporta

Esta clasificación agrupa a los canales de acuerdo con el ion que es seleccionado para atravesar el poro al interior o exterior de la membrana, los principales tipos de esta clasificación se muestran en la tabla 1, estos son 4 y corresponden a los canales que permiten el paso de potasio, calcio, cloruro y sodio. En esta clasificación se forman grandes familias de proteínas e inclusive se encuentra la superfamilia de canales de potasio que son estudiados en detalle y se conocen muchos de ellos incluso con diferentes estructuras y conformaciones, se hará una breve descripción de estos canales a continuación:

1.1.1.1. Canales de Potasio

Como se menciona anteriormente estos canales forman una superfamilia por su gran número, estos están presentes en todos los reinos de vida y prácticamente en todas las especies, los canales de potasio cumplen diversos roles fundamentales para cada organismo tanto en células excitables como no excitables (Kuang, 2015). Estos canales se clasifican en tres grandes clases de acuerdo con su función y estructura, los canales de potasio voltaje dependientes (Kv), los de rectificación interna (Kir) y finalmente los que están compuestos por dos poros (K2P). Dependiendo de la ubicación de los distintos canales de potasio, estos cumplen diversas funciones, las más importantes son controlar los potenciales en reposo de la membrana, la liberación de neurotransmisores, la integración sináptica y la apoptosis en el caso de los canales del tipo Kv (Norris et al., 2011). En cuanto a los de tipo Kir estos pueden disminuir la frecuencia cardíaca, regular la liberación de hormonas, reabsorción de sal en el riñón distal y la cardio protección durante la isquemia (Yi & Jan, 2002). Finalmente, los canales K2P cumplen roles fundamentales sobre todo en las neuronas en donde regula el potencial de la membrana en reposo y los niveles de excitabilidad celular, otras funciones que se le asocian a estos canales es la de participar en las rutas inmunitarias inflamatorias, además se ha encontrado en la retina de ratones en donde cumple una función reguladora para la ruta de señales que permiten la visión de estos animales (Hughes et al., 2017).

1.1.1.2. Canales de Calcio

Estos canales permiten la entrada del ion calcio al interior de la célula, esto produce una despolarización que es una señal para la activación de funciones asociadas principalmente a la actividad rítmica en donde cumple el rol de marcapasos. Podemos encontrar este tipo de canal en una gran cantidad de células excitables y no excitables. En cuanto a los lugares donde estos canales realizan sus funciones destacan las células del músculo cardiaco, esquelético y liso, células neuronales en neurotransmisores, neuroendocrinas.

Los canales de calcio son importantes en una gran variedad de funciones fisiológicas fundamentales para los organismos como la transmisión de impulsos nerviosos, la contracción muscular y la activación de genes. En consecuencia, a estas importantes tareas que cumple son un objeto interesante de estudio en el área farmacológica ya que son blancos para el desarrollado de una gran cantidad de drogas para tratar diferentes patologías como la hipertensión, tratamiento para diferentes tipos de dolores y la epilepsia (Zamponi et al., 2015), por nombrar algunos.

1.1.1.3. Canales de Sodio

Estos canales al igual que los anteriores permite el flujo de iones a través de la membrana, pero en este caso del sodio, como los otros canales su función principal es iniciar y propagar el potencial de acción en células excitables como las neuronas y los cardiomiocitos. Participan en las señales eléctricas y por eso son blancos de neurotoxinas naturales o sintéticas como los insecticidas (Dong et al., 2014). Los canales de sodio además de estar presentes en las neuronas pueden ser encontrados en músculo esquelético, ganglios, el corazón, entre otros. Al estar presente en el corazón y cumplir el rol de generar y propagar el potencial de acción entre las células es muy estudiado en el área de la medicina en la búsqueda de tratar y/o curar una serie de patologías relacionadas por ejemplo a los ritmos descontrolados con los que funciona el corazón.

1.1.1.4. Canales de Cloruro

Los canales de cloruro permiten el paso de este ion y tiene diversos métodos de apertura, hay una gran cantidad de estos y se agrupan en la categoría llamada CIC en donde los nombres varían de acuerdo con distintos parámetros, algunos ejemplos de estos son CIC-1 presentes en músculo esquelético y CIC Ka que son expresados en el riñón, como el voltaje, el pH y el calcio. Estos participan en procesos fundamentales como la regulación de la excitabilidad de neuronas, músculo cardiaco, liso y esquelético, regulación del volumen celular, ciclo celular y apoptosis, entre otros (*Chloride channels.*, 2009).

Otra forma de clasificación de los canales iónicos se basa en el método de apertura del canal, según esta existen tres métodos por las que los poros se abren permitiendo el paso de iones (Tabla 1), estos se describirán a continuación.

1.1.2. Canales regulados por ligandos

En primer lugar, se tienen los canales regulados por ligandos, estos cambian su conformación permitiendo el paso de iones como consecuencia a la unión de un ligando químico que se une a la estructura proteica, esto aumenta la permeabilidad permitiendo el paso de iones específicos como los de cloruro, potasio y calcio, uno de los ejemplos más comunes de este tipo de canales son los que están presentes en neuronas y que se unen a neurotransmisores. Al realizar esto participan en el control de la transmisión sináptica entre dos neuronas o entre la neurona y el músculo para generar una reacción esperada (Herrington & Arey, 2014).

1.1.3. Canales Mecanosensibles

Los canales mecanosensibles responden al estrés en la membrana, esto quiere decir que estos canales poseen la habilidad de cambiar su conformación como respuesta a la tensión que se aplica sobre la membrana (Haswell et al., 2011), en esta clasificación se encuentran principalmente dos ejemplos, los canales mecanosensitivos de conductancia larga (MscL) y los canales mecanosensitivos de conductancia pequeña (MscS). Estos canales son fundamentales en los organismos superiores ya que convierten estímulos mecánicos en

señales eléctricas que se asocian como base para el tacto, la audición y la propiocepción (Xiao & Xu, 2010).

1.1.4 Canales dependientes de voltaje

Por último, los canales dependientes de voltaje cambian su estructura para permitir el paso de iones en respuesta a cambios de potencial en la membrana, este tipo de canal es el que más está presente en cuanto a cantidad en el corazón. Los canales dependientes de voltaje poseen un sensor de voltaje en su estructura que es un segmento de la proteína de aminoácidos cargados positivamente que se mueven al cambiar el campo eléctrico de la membrana generando su apertura. La principal función de estos canales es la generación de potenciales de acción y su posterior propagación. Estos canales son muy estudiados en la farmacología ya que son las principales proteínas que definen la excitabilidad de las células fundamentales en los organismos, como son las neuronas, los músculos y las células secretoras utilizan estos canales para generar respuestas regeneradoras o potenciales de acción para iniciar procesos importantes como la contracción muscular (Lipscombe & Toro, 2014).

De esta clasificación derivan cuatro tipos de canales de acuerdo con el ion que transportan, los que transportan potasio (Kv), calcio (CaV), sodio (NaV) y cloruro (ClC).

Clasificación por método de apertura	Clasificación por ion que transporta
Canales regulados por voltaje	Canales de sodio
Canales mecanosensibles	Canales de potasio
Canales regulados por ligandos	Canales de cloruro
	Canales de calcio

Tabla 1: Diferentes tipos de clasificación de los canales iónicos, en este caso se evalúan dos parámetros (apertura y el ion que transporta).

1.2 Estructura de los canales

Como se mencionó en la sección anterior, hay una gran cantidad de canales presentes en los organismos, estos forman grandes familias que cumplen diversos roles y comparten conformaciones, los lugares del organismo en los que están presentes y principalmente sus funciones hacen que su estructura y conformación difiera entre familias y subfamilias. Dentro de los canales existen muchas conformaciones posibles, en general estas difieren por el número de poros y por la cantidad y posición de los dominios a lo largo de la membrana. A pesar de la existencia de muchas estructuras, hay factores en común entre algunos de ellos, los canales Kir, Kca, Kv, Cav, TRP, RyR e IP₃R poseen 6 dominios transmembrana. En el caso de estos el poro se encuentra entre los dominios 5 y 6 y presenta un P-loop (Figura 2) que es el segmento de la proteína que actúa como filtro para el ion en particular. Como se menciona anteriormente este filtro se compone de aminoácidos que interactúan con el ion en cuestión permitiendo que el poro se abra o no dependiendo de sus cargas.

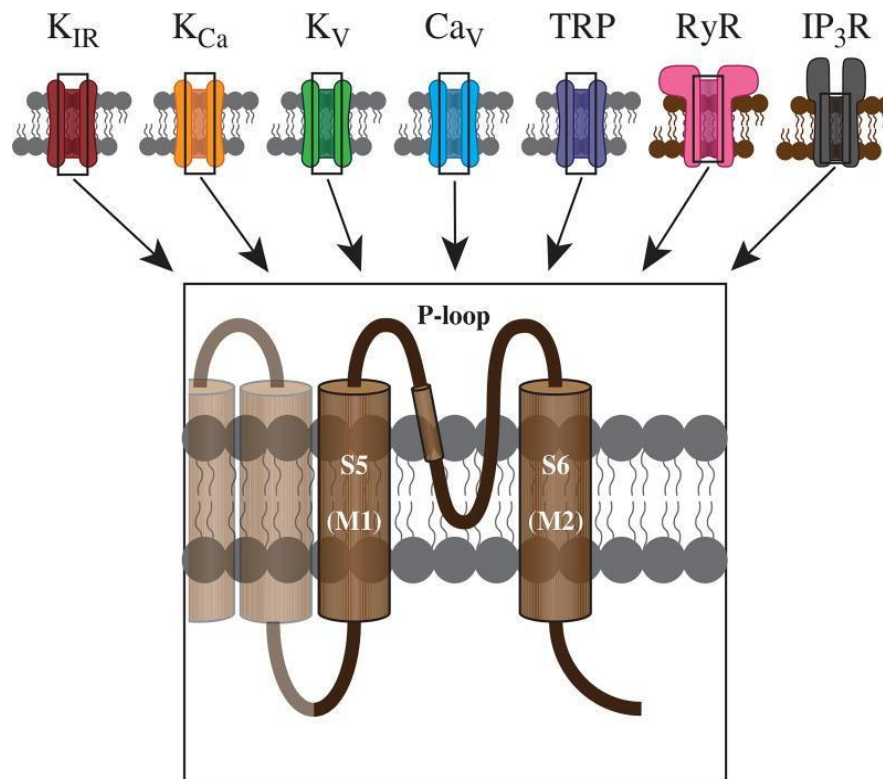


Figura 2: Estructura común de algunas familias de canales, en esta se aprecia el poro presente entre los dominios 5 y 6 y el P-loop que otorga la selectividad por el ion en específico, las familias que presentan esta

estructura se presentan en la parte superior, canales de potasio de rectificación de entrada (Kir), canales de potasio activados por calcio (Kca), canal de potasio dependiente de voltaje (Kv), canal de calcio dependiente de voltaje (Cav), canales receptores de potencial transitorio (TRP), canal receptor de rianodina (RyR), canales receptores de inositol-trifosfato (IP₃R). (Tykocki et al., 2017).

1.3. Cetáceos

Los organismos vivos tienen muchas maneras de clasificación, dentro de estas los mamíferos son una de las más grandes con miles de especies y millones de años de evolución. En general los miembros de esta familia son muy estudiados por la cercanía evolutiva que tienen con el ser humano, esta cercanía permite que animales como los ratones sean utilizados como modelos de estudio en áreas como la medicina debido a su similitud anatómica, fisiológica y genética con humanos (Paton, 2013).

Existe un infraorden dentro de los mamíferos que es muy interesante debido a su historia evolutiva durante los millones de años que han vivido, los cetáceos. Los cetáceos son mamíferos placentarios, lo que quiere decir que las crías son retenidas en el útero específicamente en la placenta en donde reciben alimento mientras se desarrollan, algunos ejemplos de esta subclasificación son las ballenas, los delfines, las orcas, entre otras. Lo que hace a los cetáceos un objeto interesante de estudio es que tuvieron una transformación completa en su forma de vida hace aproximadamente 50 millones de años. La historia de los cetáceos comienza en el momento en que algunos mamíferos evolucionaron de una vida terrestre a una totalmente acuática (Thewissen et al., 2007). El cambio de estilo de vida supone muchas transformaciones a diferentes niveles del organismo necesarios para su sobrevivencia. Estos cambios incluyen diferencias en el tamaño y forma del cuerpo entre las especies, la dentadura, la pérdida de cabello, cambios fisiológicos que permiten su nado en las profundidades, entre otros. Algunos estudios se han realizado en busca de las variaciones genéticas que se produjeron en el cambio de hábitat para ver cuáles genes fueron seleccionados positivamente y si hubo eliminación de otros. Uno de estos estudios identificó la selección positiva de algunos genes en la adaptación de los cetáceos a la vida acuática. Los 4 genes encontrados AQP2, SLC14A2, ACE y AGT están relacionados a la mantención del equilibrio de la sal y el agua en los cetáceos. Esto sugiere que los cetáceos

desarrollaron un mecanismo para la osmorregulación que es una forma de homeostasis respecto a las concentraciones de soluto (por ejemplo la sal) y al agua en el organismo (Xu et al., 2013). Otro ejemplo es el estudio de los genes supresores de cáncer seleccionados positivamente donde se encontró la selección de genes como el CXCR2, ADAMTS8 y ANXA1 que ayudan a los organismos a protegerse contra distintos tipos de cáncer como la leucemia, el cáncer de mama o el cáncer a los pulmones por nombrar algunos (Tejada-Martinez et al., 2021). Además, es interesante la investigación realizada sobre la pérdida de genes asociados a la adaptación en la transición en donde se encontraron que alrededor de 85 genes fueron inactivados desde el ancestro terrestre (Huelsmann et al., 2019). Entre los genes inactivados se encuentran algunos que son beneficiosos para los cetáceos como F12 y KLKB1 que reducen la probabilidad de producir coágulos de sangre o trombos mientras el organismo nada o el gen POLM que se encarga de la reparación del ADN. También se identificaron genes que se pierden debido a la adaptación a la vida acuática como, por ejemplo, el gen SLC6A18 que se asocia a una mayor respuesta de vasoconstricción al bucear y el gen SEC14L3 que está relacionado a la composición del surfactante pulmonar en los organismos.

1.4. Osmorregulación

La osmorregulación, mencionada anteriormente es un mecanismo que intenta mantener un equilibrio entre el agua interna y la concentración de electrolitos como por ejemplo el sodio que se encuentran presentes en el organismo. El agua y los electrolitos se obtienen a través de la dieta de los organismos, la dieta de los mamíferos terrestres es muy diferente a la de los mamíferos marinos (Costa, D. P. 2009). Esto se debe a que los animales invertebrados marinos y peces de los que se alimentan los cetáceos otorgan entre un 70 y 80 por ciento de agua. Como se menciona anteriormente los cetáceos al consumir alimentos obtienen electrolitos que deben ser expulsados del organismo de alguna forma para mantener el equilibrio entre agua y soluto. El mecanismo para expulsar del organismo estos electrolitos es mediante la excreción de la orina y la feca de los cetáceos la cual tiene sales concentradas. Dependiendo de la cantidad de electrolitos consumidos en la alimentación la concentración de la orina y las heces aumentará o disminuirá. El agua de mar está formada

de muchos compuestos entre los que encontramos el cloruro, el sodio y el Potasio. Esta composición hace que, al beber agua, los cetáceos cambien la conformación del soluto del medio exterior que debe ser eliminada por los medios explicados anteriormente. Este cambio de fluidos del medio plantea una pregunta interesante. ¿La necesidad de adaptación debido al nuevo medio y las interacciones con nuevos fluidos con presencia iones como el cloruro, el potasio y el sodio derivaron en el cambio a nivel de secuencia y en el número de copias de los canales iónicos presentes en los cetáceos?, esta interrogante es en la que se basa este trabajo y la metodología empleada para contestarla.

1.5. Enfoque de la investigación

Ya mencionada la importancia de los canales iónicos y sabiendo que estos cumplen funciones fundamentales en todos los organismos vivos, una pregunta interesante para analizar y responder es si en la transición de los cetáceos desde su vida terrestre a la acuática hubo una variación en el número de canales presentes en estos organismos a modo de adaptación a su nuevo hábitat y forma de vida. El cambio extremo que implica cambiar de hábitat hace que sean un modelo interesante de estudio ya que se maximizan las variaciones fisiológicas necesarias para la adaptación al entorno acuático. Uno de los cambios que se produce es el medio al que se expone la membrana ya que los organismos terrestres necesitan incorporar agua a la célula mientras que los seres acuáticos están rodeados de ella por lo que los fluidos presentes en el cuerpo varían (Molnar & Gair, 2015). Además, hay que considerar que la mayoría de los cetáceos como las ballenas o las orcas viven en el mar en donde hay grandes cantidades de sal que también puede ingresar a la célula por la membrana. Estos cambios en los fluidos corporales debido al nuevo hábitat acuático hacen preguntarse si los canales iónicos variaron en su número de copias y la secuencia de sus genes debido a la nueva homeostasis que fue y es necesaria para la adaptación a la vida marina. Un ejemplo de estudios relacionados a los cambios por necesidad adaptativa se han llevado a cabo en archaea que se han adaptado a ambientes extremos en donde la membrana celular cambia su composición química y estructural (Saimi et al., 1999). Es interesante entonces estudiar si estos cambios en la membrana y debido a los nuevos fluidos del medio influyeron en un cambio en el número de canales

iónicos y la secuencia de sus genes. Un punto clave es que este estudio de variabilidad de canales iónicos a través de una transición desde organismos terrestres a acuáticos no se ha realizado lo que abre muchas puertas a la investigación del cambio funcional en la homeostasis y cómo influye esto en los canales iónicos.

Estudiar este cambio en los cetáceos permitió ver que canales fueron seleccionados y cuáles no para su vida acuática, esta selección o exclusión de canales podría derivar en cambios de funcionamiento por ejemplo en la transmisión de señales en las neuronas, contracción muscular, ritmo del corazón, entre muchas otras. También se realiza el análisis de variaciones en las secuencias de nucleótidos o genes asociados a cada canal iónico con el objetivo de estudiar los posibles cambios que sufrieron y cómo influye en el funcionamiento de estos canales en los organismos. Los cambios tanto en el número de copias como en la secuencia supondrán cambios en la homeostasis necesaria para su adaptación al ambiente acuático debido al cambio de sustancias presentes en el nuevo medio.

Los análisis se realizaron con programas bioinformáticos orientados al estudio de la evolución como OMA que estudia la presencia de ortólogos entre los organismos, CAFE para el estudio de cambios en el tamaño de la familia de genes y PAML para el análisis de sustituciones sinónimas y no sinónimas a lo largo de la historia evolutiva de los organismos.

Para llevar a cabo estas tareas se usaron los archivos de proteínas y nucleótidos de cada organismo correspondiente a los canales iónicos y a sus genes correspondientes.

1.5.1 Variaciones en la secuencia de las proteínas (canales iónicos)

Para estudiar las variaciones de secuencia primero hay que entender que es una secuencia. Una secuencia es una sucesión de letras que representan nucleótidos en el caso del ácido nucleico o los aminoácidos en el caso de las proteínas. Esta sucesión se obtiene con técnicas de secuenciación en donde se busca obtener este orden para estudiarlo y dilucidar los genomas de los organismos. En este caso se estudiaron las variaciones en la secuencia nucleotídica compuesta por un alfabeto de cuatro letras (A,T,C y G). Para cumplir este objetivo primero se deben identificar los canales iónicos compartidos por las diferentes

especies a estudiar y obtener sus secuencias. Al obtener las secuencias se deben comparar unas con otras para identificar las variaciones que se pueden haber producido en la transición de los cetáceos desde la tierra al agua.

En este caso específicamente se buscó investigar la presencia de variaciones de un solo nucleótido (SNPs) en la secuencia de los canales, estos SNPs se definen como sustituciones de una base en una secuencia (Johnson, 2009) y generalmente se estudia al hacer comparaciones de genomas completos, estos se producen por mutaciones en alelos específicos a lo largo de los años, dichos cambios pueden tener consecuencias negativas, un ejemplo de esto es su efecto en el proceso de traducción a proteínas en donde inclusive pueden cambiar la secuencia aminoacídica cambiando o eliminando la función de estas. Estas consecuencias en la alteración de la traducción de las proteínas se ha asociado con diversas enfermedades (Ramírez-Bello & Jiménez-Morales, 2017).

El objetivo al estudiar estas variaciones es investigar si los canales sufrieron sustituciones en su secuencia y si esta pudo haber afectado alguna característica del canal como su funcionamiento y/o estructura que es interesante estudiar ya que mostraría un cambio en la homeostasis de los cetáceos y quizás algunas otras características funcionales que podrían ser aplicadas en la creación de fármacos (Mani et al., 2016).

La historia y evolución de los cetáceos ha sido tan larga y variante por la transición que llevaron a cabo y su posterior diversificación y radiación en el mundo acuático que es normal esperar una gran cantidad de polimorfismos en su genoma (Macé & Crouau-Roy, 2008), por la adaptación, las mutaciones que se generan en los organismos por su estilo de vida, etc.

Con el objetivo de realizar este estudio se utilizaron diversos programas donde el primer paso es encontrar las proteínas correspondientes a canales iónicos con herramientas como Tmhmm2.0 para identificar las proteínas que se encuentran en la membrana. Además, se utilizan otros programas como OMA y CAFE orientados a inferir grupos ortólogos entre las especies para identificar la diferencia en el número de copias y si la familia de genes que codifican para canales iónicos creció o disminuyó en el paso de la tierra al agua realizado por los cetáceos.

Para esto fueron necesarios los archivos tanto de proteínas como los de nucleótidos ya que las herramientas TmHmm2.0 y OMA utilizan los archivos de proteínas mientras que CAFE y PAML utilizan el archivo de nucleótidos. Estos archivos de proteínas se obtienen en su última versión desde la base de datos Ensembl (Yates et al., 2020). Los procesos y programas que se utilizaron son explicados más extensamente en la sección de metodología.

2. Hipótesis

La conquista del medio acuático por parte de los cetáceos involucró entre otras cosas un cambio del medio ambiente circundante inmediato lo que provocó ajustes en la maquinaria del control osmótico que se vería reflejado en cambios en la secuencia y número de copias de los canales iónicos.

3. Objetivo general

Estimar el rol de la selección natural en el ancestro de los cetáceos específicamente en la variación del número de copias y cambios de nucleótidos únicos en los genes que codifican para canales iónicos.

4. Objetivos específicos

1. Estimar y comparar el número de canales iónicos en especies actuales de cetáceos y mamíferos terrestres.
2. Estudiar el rol de la selección natural a través de la estimación de sustituciones sinónimas y no sinónimas ocurridas en el ancestro de los cetáceos.
3. Estimar la variación en el número de copias de genes que codifican para canales iónicos en el ancestro de los cetáceos.

5. Metodología

La metodología utilizada se divide en distintos pasos que se resumen en la figura 3, cada uno de estos se explican detalladamente en las siguientes subsecciones. La metodología incluye herramientas bioinformáticas que llevan a cabo tareas con el objetivo de estudiar cómo afectó la transición de la vida terrestre a la acuática en los cetáceos. En específico cómo los canales iónicos cambiaron en su número de copias y las sustituciones que se produjeron en su secuencia de nucleótidos. Programas como TmHmm2.0, OMA, CAFE y PAML se integran con el objetivo de identificar canales, búsqueda de ortólogos, estudiar las variaciones en el número de copia de genes y las tasas de sustituciones. En este trabajo se analizan diversos organismos clasificados como mamíferos placentados. Esto se hace para comparar las tasas evolutivas con las demás especies.

Nuestro muestreo taxonómico incluyó los cetáceos delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), orca (*Orcinus Orca*), beluga (*Delphinapterus leucas*), el delfín chino de río (*Lipotes vexillifer*), el cachalote (*Physeter macrocephalus*), la ballena enana (*Balaenoptera acutorostrata*) y la ballena de Groenlandia (*Balaena mysticetus*), además de otros mamíferos placentados como grupos externos cerdo (*Sus scrofa domesticus*), la vaca (*Bos Taurus*), perro (*Canis lupus familiaris*), caballo (*Equus caballus*), pequeño murciélago café (*Myotis lucifugus*), ratón (*Mus musculus*), humano (*Homo sapiens*) y el elefante africano (*Loxodonta africana*).

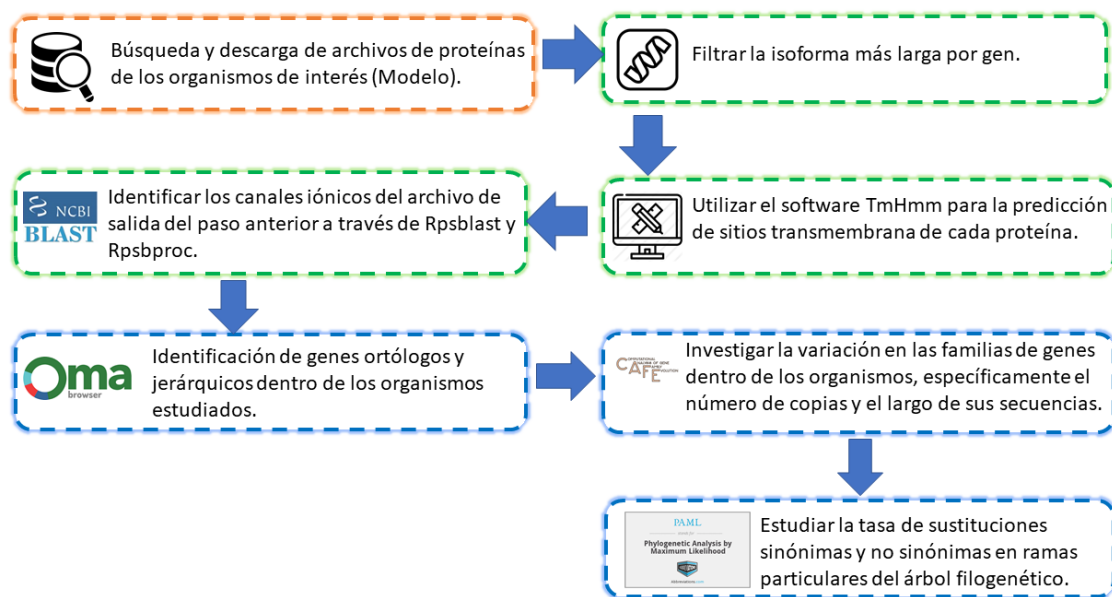


Figura 3: Metodología usada con el objetivo de analizar el efecto que tuvo la transición al medio acuático de los cetáceos en los canales iónicos. Los colores representan su asociación a cada objetivo específico. El color naranja se asocia al objetivo específico 1, el verde al objetivo específico 2 y el azul al objetivo específico 3.

5.1. Definición de los organismos a utilizar como modelo para identificar sus canales iónicos.

Para utilizar las herramientas computacionales que se usan en los siguientes pasos, es esencial tener modelos de organismos que tengan un genoma bien anotado. Esto se debe a que se necesita tener cada proteína bien anotada para diferenciar los canales iónicos dentro del proteoma para su posterior comparación a los organismos de interés. Para este trabajo en particular se escogieron dos organismos principales para usar como modelo debido a que son los más estudiados y por tanto sus genomas son los que más y mejor se han anotado a lo largo de los años.

Para la identificación de los canales iónicos se usaron los archivos de proteínas tanto de humano (*Homo sapiens*) como del ratón (*Mus musculus*). Los proteomas de cada especie se obtuvieron desde la base de datos Ensembl la cual contiene archivos de diversos tipos

asociados al área genómica como anotaciones de proteínas y genes, estructura de genes, elementos reguladores y variantes genéticas. Estos datos son especialmente de organismos vertebrados (Yates et al., 2020).

Los archivos contienen todas las proteínas presentes en los organismos basados en la traducción de los genes. Sin embargo, al hacer el análisis del archivo se encontró que contenía más de una isoforma por gen, lo que es un problema ya que puede aumentar el número resultante con duplicados que afectan el resultado final.

Para solucionar esto, se creó un script en bash incluyendo diversas herramientas usadas para el procesamiento y edición de texto. Programas como grep, sed y el lenguaje de programación awk permitieron seleccionar la isoforma más larga por gen. Con esto se busca eliminar la duplicación de proteínas y dejar una representante por locus. Al obtener este archivo final se debe avanzar hacia el siguiente paso que es identificar y seleccionar las proteínas transmembrana.

5.2. Predicción de segmentos transmembrana en secuencias de proteína.

Como se menciona anteriormente los canales iónicos son proteínas que están presentes en la membrana celular permitiendo el paso de iones del medio hacia el interior de la célula y viceversa. Lo primero que se buscó fue identificar las proteínas que tienen segmentos transmembrana, para esto se usó la herramienta TmHmm2.0 (Sonnhammer & Krogh, 2008).

TmHmm2.0 es un programa que permite hacer una predicción de segmentos transmembrana que recibe como entrada el archivo de proteínas en formato fasta. El software funciona a través de un método basado en las cadenas ocultas de Markov. Este método se divide en submodelos que representan la región citoplasmática y la no citoplasmática en donde se encuentra la proteína. Basado en estos modelos se predicen los segmentos de la proteína que están presentes en la membrana y los que no. El modelo se encarga de predecir alfa hélices que se encuentran en la membrana en las proteínas de interés con la ventaja que puede modelar el largo de estas. Por último, logra la predicción

de los segmentos de la proteína presentes en la membrana gracias a que el algoritmo incorpora la identificación de aminoácidos hidrofóbicos.

El resultado de TmHmm2.0 es un archivo que contiene un resumen por cada proteína con su respectivo identificador que muestra la cantidad de segmentos transmembrana que se encontró para cada una de estas. Teniendo en cuenta que el objetivo es filtrar las proteínas que se encuentran en la membrana y que sean canales iónicos se realizó un filtro con awk que seleccione sólo las proteínas que TmHmm2.0 predijo tienen 2 o más segmentos transmembrana. Por lo tanto, las que están entre 0 y 1 segmentos transmembrana son descartadas ya que no existirían canales iónicos con un único segmento transmembrana. Como se discutió anteriormente los canales están conformados por varios segmentos que a su vez forman las subunidades que componen la estructura general y el poro que permite el transporte de iones.

Luego de obtener el identificador de las proteínas que pasan el filtro antes mencionado se debe obtener la secuencia fasta nuevamente desde el archivo original. Esto se hace con un script escrito en bash que, basado en el identificador, obtenga la secuencia y lo ordene en formato fasta.

5.3. Identificación y selección de los canales iónicos.

Obtenido el archivo con proteínas del paso anterior, lo siguiente es identificar qué proteínas de este son canales iónicos y descartar los que no son. Para esto, se ocupa BLAST (Basic Local Alignment Tool). BLAST es un programa bioinformático encargado tal como su nombre indica, de alinear secuencias localmente (Altschul et al., 1990). Estas secuencias pueden ser tanto de aminoácidos (proteína) como nucleotídica (ADN y ARN). Esta herramienta recibe una secuencia query y la alinea o compara contra una base de datos de secuencias. Luego de realizar el alineamiento se entrega como resultado las secuencias más similares a la secuencia ingresada como query.

La herramienta que se usa en este trabajo está derivada de BLAST y es RPS-BLAST (Reverse Position Specific BLAST). La función que cumple este algoritmo es la de

¹comparar una secuencia query con una base de datos de perfiles que representan dominios conservados (M. Yang et al., 2020). Es por esto que RPS-BLAST también se conoce como CD-search (Conserved Domain search). La base de datos llamada CDD o Conserved Domain Database (Roseto, 2003) integra datos de variadas bases de datos que integran familias de proteínas como Pfam (Base de datos de familias de proteínas). Los datos de CDD para su uso local se obtuvieron desde la página de NCBI que se encarga de almacenar datos biotecnológicos para su descarga y posterior manipulación en donde se descargó la última versión correspondiente a Little Endian.

Los perfiles antes mencionados son alineamientos almacenados hechos previamente en donde se almacenan dominios conservados de familias de proteínas. Lo que se busca entonces al usar este software es identificar cuáles proteínas del archivo obtenido en el paso anterior pertenecen a una familia de proteínas de canales iónicos como por ejemplo la familia de canales iónicos de potasio, sodio, entre otros.

La herramienta RPS-BLAST se utilizó de forma local y por medio de línea de comando. Este fue usado con los parámetros por defecto. Posteriormente, el formato de salida fue cambiado a ASN1. Este formato es una notación abstracta que representa datos que son leídos de igual forma por todas las máquinas independientemente de la máquina en la que estos son producidos. Se ocupa este formato de archivo ya que el programa rpsbproc toma como entrada datos con este formato y no el que normalmente se obtiene por defecto como salida desde RPS-BLAST.

Rpsbproc es un programa que se utiliza de igual manera por línea de comando y tiene como objetivo la tabulación del archivo resultante de RPS-BLAST. El procesamiento que realiza esta herramienta incluye el ordenamiento de los resultados que busca eliminar la redundancia de estos. Además, entrega información adicional a los resultados como los dominios de superfamilias y sitios funcionales. Esto ayuda a la diferenciación de las distintas proteínas que están presentes en el archivo de entrada en RPS-BLAST.

La identificación de los canales iónicos presentes en el resto de los organismos utilizados en el trabajo se hizo con el software OMA que identifica las proteínas ortólogas entre las especies utilizadas. Con este objetivo se definieron el humano y el ratón como especies

¹ ftp.ncbi.nih.gov/pub/mmdb/cdd/little_endian

modelo por lo que cuando una proteína se encuentra en humano y/o ratón y otro organismo se clasifica como un canal iónico. Lo que permite este ejercicio es descartar las proteínas del resto de los organismos que no corresponden a canales iónicos y así identificar estos canales en cada individuo a analizar.

5.4. identificación de grupos de genes ortólogos y grupos jerárquicos.

Como se menciona anteriormente los genes ortólogos son aquellos que se relacionan por eventos de especiación. Estos genes se estudian principalmente para analizar la evolución y como esta influye en el cambio de secuencia y función que cumple el producto de estos genes.

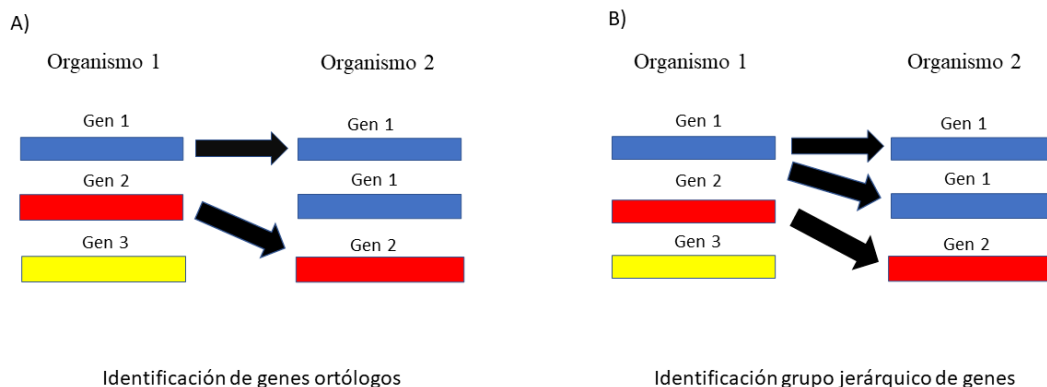


Figura 4: Diferencia entre grupo de genes ortólogos y grupo de genes jerárquicos (A y B respectivamente).

En A se puede observar que en los grupos ortólogos no se toma en cuenta el número de copias o parálogos. Esto quiere decir que, si se encuentra el gen una vez en ambos organismos, el resultado muestra que el gen está en ambos organismos, pero no especifica que en el organismo 2 el Gen 1 se encuentra presente en dos ocasiones. Esto cambia en los grupos jerárquicos ya que como se aprecia en la figura el resultado toma en cuenta que el Gen 1 se encuentra una vez en el organismo 1 y dos veces en el organismo 2.

El software que se usó para identificar tanto los grupos de genes ortólogos como los grupos de genes jerárquicos de las especies estudiadas es OMA (Altenhoff et al., 2018). OMA es un programa que toma como input un archivo de aminoácidos que en este caso es el de

canales obtenidos desde los organismos modelos (Humano y ratón) en el paso anterior y el archivo de proteínas completo de los demás organismos a evaluar (cetáceos, cerdo, perro, caballo, entre otros). Con estos archivos se hace una comparación de todos contra todos en la búsqueda de ortólogos. Esta comparación se basa en el algoritmo de alineamiento local de Smith–Waterman (Smith & Waterman, 1981), que es seguida de una estimación de distancia por máxima verosimilitud para los pares que son significativamente similares.

En este caso el programa se utiliza para realizar dos estudios en las especies de interés, estos son la evaluación del grupo de genes ortólogos y el de genes jerárquicos o llamado también como perfil filogenético que busca patrones de ausencia o presencia de genes entre las especies a estudiar (Figura 4).

Con esto se busca estudiar los canales iónicos que están presentes en las distintas especies incluidas en nuestro estudio. Al encontrar estos canales ortólogos y en base a sus identificadores únicos se deberán descargar sus genes correspondientes para llevar a cabo los análisis que se harán en los siguientes pasos como el análisis de selección positiva, la duplicación dentro de los genomas, el alargamiento de secuencia, etc.

5.5. Variación en el número de copias de canales iónicos en cetáceos.

El siguiente paso del estudio es la evolución en el tamaño de la familia de genes. El software utilizado en este paso es CAFE (Computational Analysis of gene Family Evolution) y se basa en un proceso llamado de nacimiento y muerte para modelar la ganancia o pérdida de genes en un árbol filogenético (Han et al., 2013). El proceso es un modelo de Markov de tiempo continuo. En este modelo solo hay dos posibles estados, como su nombre indica vida y muerte. Como se indica en el proceso se identifican dos estados, ganar o perder genes, en donde ganar un gen significa el aumento en 1 de la variable de estado y la pérdida disminuye de igual manera en 1 a la variable de estado.

Para ejecutar CAFE se necesitan dos archivos, un archivo que contenga el número de copias de las distintas familias de genes para las distintas especies incluidas en nuestro estudio y otro archivo correspondiente a un árbol filogenético en formato Newick escalado al tiempo de divergencia de las especies incluidas. El árbol es realizado en un editor de

texto y visualizado para su corrección en Figtree². El programa entrega datos como el tamaño de la familia de genes en estados ancestrales para cada nodo del árbol, probabilidad del cambio de tamaño de la familia de genes observados (variable que ayuda a diferenciar los resultados azarosos de los estadísticamente significativos), la expansión promedio de cada familia de genes en cada rama del árbol filogenético y finalmente el número de familia de genes con expansiones, contracciones o sin cambio alguno a lo largo del árbol.

Con esto se busca ver si el tamaño de la familia de genes varió en los cetáceos en relación con las especies de mamíferos terrestres. Esto es interesante de investigar a profundidad ya que podría sugerir que el cambio en las características fisicoquímicas del ambiente acuático habría variado la interacción con nuevas sustancias principalmente iones del medio, modificando la homeostasis en estas especies. Debido a los cambios se podría detonar una variación en la cantidad de canales iónicos necesarios para la mantención del equilibrio entre el medio interno y externo de la célula.

5.6. Estudio de sustituciones sinónimas y no sinónimas en las especies de interés.

El último análisis realizado es la estimación de sustituciones sinónimas y no sinónimas en la secuencia de nucleótidos de los genes que codifican los canales iónicos. Las sustituciones son aquellas en las que se produce la modificación de una base en el genoma y estas se producen tanto en intrones como exones. Se llama sustitución sinónima a aquellas donde la modificación de la base no produce un cambio del aminoácido que compone la proteína. Las del tipo no sinónima en cambio sí modifican el aminoácido al que traduce y podrían incluso llegar a cambiar la estructura y en algunos casos la función de la proteína resultante. Investigar estas modificaciones permite ver el cambio evolutivo que tuvieron las secuencias de nucleótidos y si estas influyeron en el producto proteico.

Para este paso se utilizó el programa PAML (Yang, 2007). Este software es un conjunto de programas que tienen como fin llevar a cabo análisis filogenéticos tanto en ADN como en secuencias de proteínas. Los análisis que permite hacer se asocian al estudio del efecto de la evolución en las secuencias mencionadas.

² <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Con PAML se busca calcular el dN y dS donde dN es tasa de sustitución no sinónima y dS corresponde a la tasa de sustitución sinónima y también la máxima verosimilitud. Programas como CODEML se integran en PAML con el objetivo de estimar las tasas de sustitución sinónima y no sinónima en los genes obtenidos en los pasos anteriores. El objetivo de este paso es ver como la evolución asociada a la adaptación de los cetáceos pudo cambiar la secuencia de nucleótidos relacionados a los canales iónicos dejando abierta la interrogante de cómo afectó esta mutación o mutaciones la estructura y función de los canales.

Como se menciona con anterioridad al ejecutar el programa los archivos que son evaluados son las secuencias de los genes de los pasos anteriores, que codifican a canales iónicos. Los parámetros para utilizar son los por defecto. Adicionalmente, el programa recibe un árbol filogenético en formato Newick que se puede modificar para calcular distintas tasas de sustitución en los organismos marcados. Para este trabajo se implementaron tres modelos. En el primer modelo se estima una tasa de sustitución igual para todas las ramas del árbol. En el segundo modelo se estimaron dos tasas, una para los cetáceos y otra para el resto de los mamíferos. El tercer y último modelo estima tres tasas, una para el ancestro de los cetáceos, otra para la diversificación de los cetáceos (grupo corona) y la tercera para los mamíferos no cetáceos.

Al terminar estas tareas se analizan los resultados para investigar las sustituciones que se produjeron en la secuencia de nucleótidos que podrían ser utilizadas para otro estudio experimental en donde se estudien los efectos de las mutaciones sobre la estructura y la función de los canales iónicos en cuestión. También se compararon los omegas de las secuencias estudiadas para ver si los canales iónicos analizados se han sometido a selección como consecuencia de la adaptación al agua.

6. Resultados.

6.1. Resultados TMHMM y RPS-BLAST.

El primer paso realizado como se describe en la metodología fue la predicción de sitios transmembrana desde el archivo completo de proteínas de humano y ratón (organismos modelo). La cantidad de proteínas presentes en el archivo sin modificar en humano y ratón es de 23472 y 22481 respectivamente. Luego de ejecutar TmHmm2.0 y de filtrar su salida con las proteínas que poseen entre 2 y 25 segmentos transmembrana se obtuvieron 3333 en humano y 4155 en ratón.

Estas proteínas obtenidas y filtradas desde TmHmm2.0 fueron evaluadas en RPS-BLAST donde a partir de su presencia en CDD y a su anotación se filtraron los canales iónicos presentes en humano y ratón. En la salida de RPS-BLAST se buscaron las proteínas que tuvieran en su anotación la palabra channel y que correspondiera a un canal iónico. Con esto realizado se encontraron 197 canales iónicos en humano y 185 en ratón.

6.2. Resultados OMA.

Primeramente y como complemento a la búsqueda de canales, OMA se utilizó para obtener el número de canales iónicos de cada organismo. Como se describe en la metodología esto se realizó tomando los canales iónicos presentes en los dos organismos modelo utilizados, humano y ratón. Entonces, se analiza y filtra la salida de OMA y se clasifican como canales todos aquellos grupos de ortólogos en donde están presentes el humano y/o ratón. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. En donde se aprecia una similitud en la cantidad de canales presentes en cada organismo.

Nombre común de especie	Nombre científico	Número de canales iónicos
Ballena de Groenlandia	<i>Balaena mysticetus</i>	131
Ballena minke común	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	184
Cachalote	<i>Physeter macrocephalus</i>	160
Delfín chino de río	<i>Lipotes Vexillifer</i>	176
Beluga	<i>Delphinapterus leucas</i>	167
Orca	<i>Orcinus Orca</i>	179
Delfín nariz de botella	<i>Tursiops truncatus</i>	170
Vaca	<i>Bos taurus</i>	178
Cerdo	<i>Sus scrofa</i>	177
Caballo	<i>Equus caballus</i>	186
Perro	<i>Canis lupus familiaris</i>	177
Murciélago pequeño	<i>Myotis lucifugus</i>	160
Humano	<i>Homo sapiens</i>	197
Ratón	<i>Mus musculus</i>	183
Elefante	<i>Loxodonta africana</i>	159

Tabla 2: Canales iónicos inferidos para las especies incluidas en este estudio.

La ballena de Groenlandia tiene un número menor que las demás especies. Esto se atribuye a que todas las secuencias fueron obtenidas tanto de ENSEMBL y de NCBI menos la de la ballena de Groenlandia que es un proyecto aparte por lo que se esperaba que algunas de sus secuencias difirieran de las obtenidas desde las otras bases de datos.

Continuando con los análisis realizados en base a OMA se infirieron los grupos de ortólogos que están presentes en los 15 organismos estudiados. Estos resultados fueron obtenidos de igual manera desde la salida de OMA en donde se filtraron los OMAGroups en diferentes cantidades de especies. Un OMAGroup es un archivo que representa a una proteína en particular, en el archivo se encuentra esta proteína en formato fasta y su presencia en los distintos organismos estudiados.

En total se encontraron 28415 OMAGroups luego de correr OMA con el set de proteínas descrito como input. Este número incluye diversas combinaciones como, por ejemplo, más de 6000 OMAGroups presentes en 2 organismos. El problema de estas combinaciones encontradas es que las que no están presentes en Humano y ratón no corresponden a canales iónicos.

Para evitar estos OMAGroups en donde los resultados no corresponden a canales iónicos y por lo tanto no son de interés para este trabajo, se creó un comando en bash basado en el lenguaje de programación AWK. Con este comando lo que se hizo fue filtrar los OMAGroups donde estaban los 15 organismos incluyendo al humano y al ratón. Ya que en el set de proteínas se ingresaron solo los canales iónicos filtrados desde el archivo de proteínas completas de humano y ratón se busca filtrar los OMAGroups donde estos estén presentes.

Luego de aplicar este comando sobre el archivo de salida de OMA se obtuvieron 48 OMAGroups donde estaban presentes los 15 organismos analizados. A estos se agregaron 3 OMAGroups agregados con 14 organismos donde se excluyó al elefante africano ya que este fue utilizado para enraizar el árbol y se no altera los próximos análisis. También se buscó una combinación con 14 especies en la que el humano o el ratón estuvieran ausentes ya que podría existir la posibilidad de canales iónicos que están presentes en un organismo, pero en el otro no. A través de este ejercicio 1 OMAGroup fue agregado a la lista por lo que finalmente se encontraron 52 para los siguientes pasos (CAFE y PAML).

6.3. Resultados CAFE.

Como se menciona en la metodología el software CAFE se utilizó con el fin de estudiar la variación en el número de copia de genes de canales iónicos. El output obtenido luego de correr CAFE corresponde a 3 árboles filogenéticos (Figuras 5,6 y 7) que se explicarán a continuación.

El primer árbol busca familias de genes que evolucionaron a una tasa mayor que el resto. Esto se ve en la figura 5. En este caso los números entre paréntesis al lado del nombre del organismo corresponde a la cantidad de familias que evolucionaron a una mayor tasa en ese organismo respecto a los otros. En el caso de los números entre las ramas del árbol, estos detallan las familias que evolucionaron más rápido entre en las especies que se encuentran dentro de esa rama.

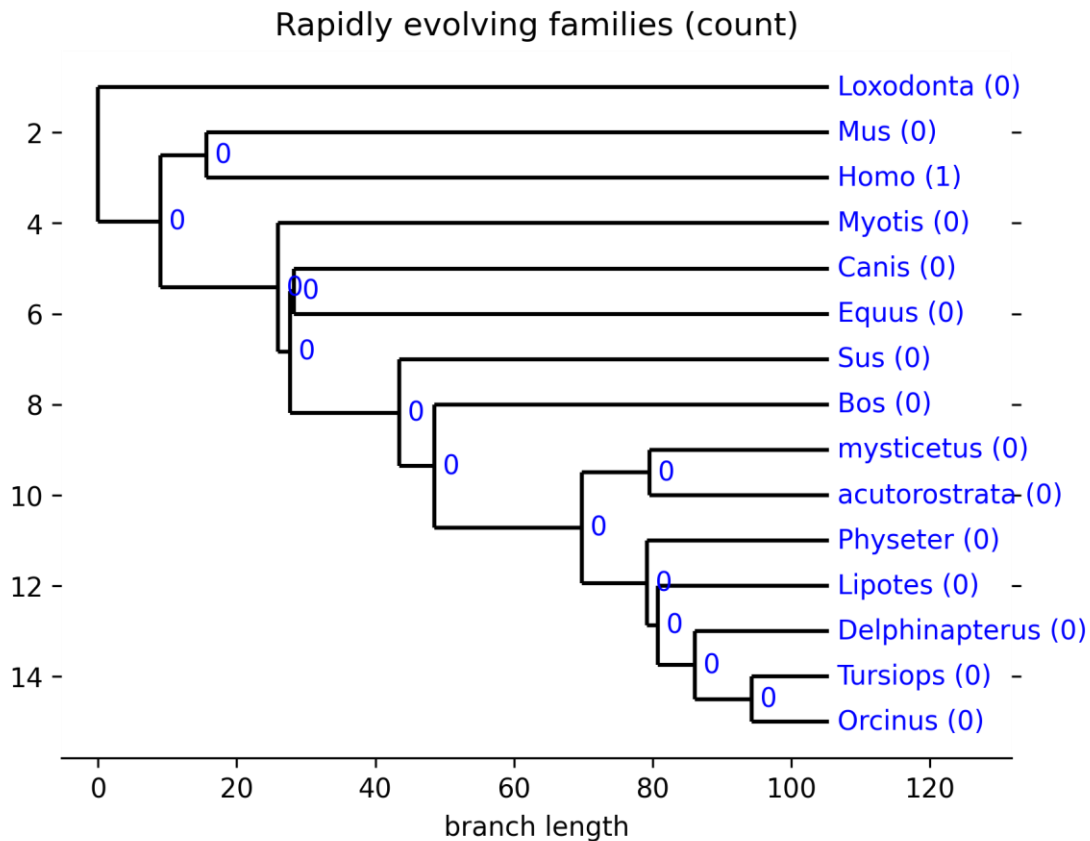


Figura 5: Árbol filogenético con los resultados de CAFE respecto a las familias que evolucionaron a una mayor tasa.

Como se puede ver en la Figura 5 no se encontraron familia de genes que evolucionaron a una mayor tasa que las demás excepto por uno que fue encontrado en humano pero que no es relevante en nuestro trabajo ya que no se trata de un organismo de la familia de los cetáceos.

En el segundo resultado obtenido correspondiente a la Figura 6 se presenta la búsqueda de contracciones en familia de genes. El árbol posee el mismo formato al anterior, donde los números entre ramas corresponden a las familias de genes perdidas entre los organismos presentes entre las dos en los extremos u hojas y los números entre paréntesis y a un lado del nombre de la especie corresponde a las familias de genes perdidas por una especie respecto a la otra.

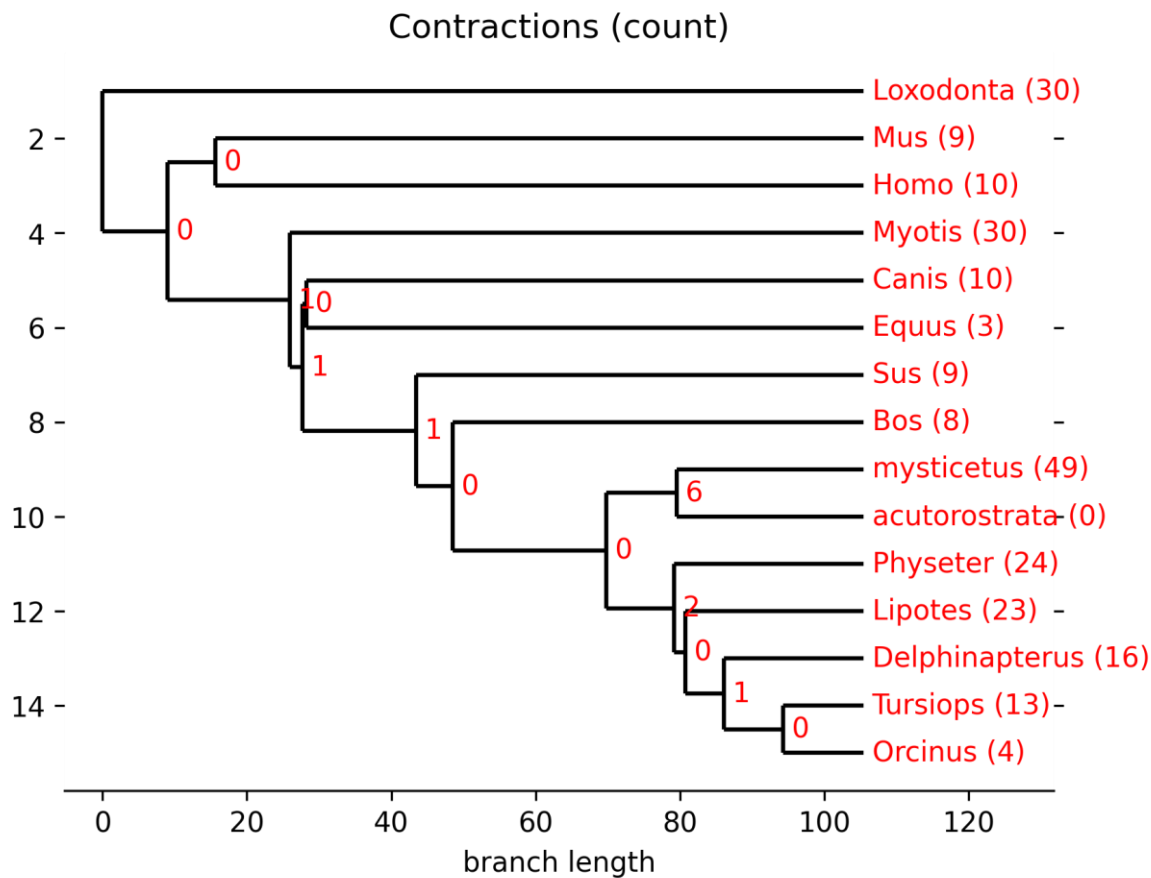


Figura 6: Árbol filogenético con los resultados de CAFE respecto a las familias de genes que se perdieron.

Con respecto a las contracciones ocurridas en las especies estudiadas se puede ver que hay una gran pérdida de familias en la ballena de Groenlandia. Esto era esperable ya que con respecto a las otras especies posee un número de copias de canales iónicos inferior. Respecto a los demás cetáceos también se encontró un número importante de familias perdidas. Adicionalmente, entre la ballena de Groenlandia y la ballena enana se perdieron 6 familias de genes comunes, mientras que entre beluga, el delfín nariz de botella y orca se perdió una familia en común. Finalmente, en cuanto a los cetáceos entre el cachalote, el delfín chino de río, beluga, el delfín chino de río y la orca se perdieron 2 familias de genes de canales iónicos.

En el resto de los mamíferos se aprecia que no hay cambios grandes entre especies, pero se ve que el murciélago pequeño (*Myotis lucifugus*) y el elefante africano (*Loxodonta africana*) tienen 30 familias perdidas. Estas contracciones descritas representan una disminución del número de copias que significaría que estos canales no fueron necesarios para los cetáceos al momento de ingresar al agua.

Por último, en la figura 7 se presentan las familias de genes correspondiente a los canales iónicos que se adicionaron a cada especie. En la figura se puede ver que no hay familia de genes adicionales entre especies. Esto quiere decir que los cetáceos no necesitaron agregar copias de genes que codifiquen a canales iónicos para lograr adaptarse a la vida marina. Además, llama la atención que en el delfín chino de río y la ballena enana hubo una adición de familia de genes con 14 y 3 expansiones respectivamente, esto puede representar la necesidad de optimizar la interacción con iones del medio en ambas especies para mantener la homeostasis.

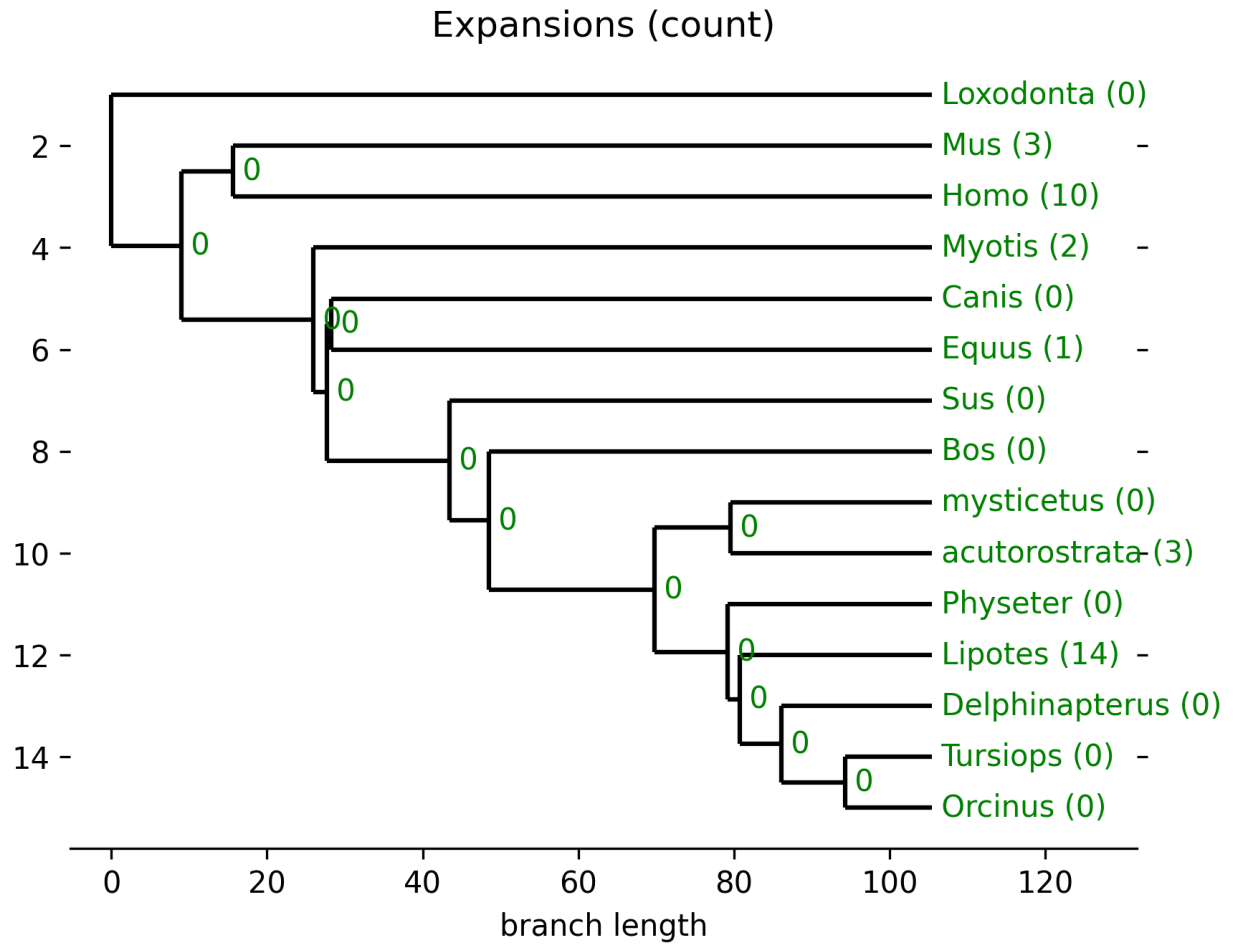


Figura 7: Árbol filogenético con los resultados de CAFE respecto a las familias de genes que se adicionaron.

6.4. Resultados PAML.

Como se menciona en la sección de metodología para ejecutar el software PAML se implementaron tres modelos. En el modelo 1 se estima un valor de omega (ω) para todo el árbol. En el modelo 2 se estiman dos valores de omega, uno para los cetáceos como grupo total y otro para el resto de las ramas. Finalmente, en el tercer modelo se estiman tres valores de omega, uno para los mamíferos no cetáceos, otro para el grupo corona de los cetáceos, correspondiente a los organismos utilizados en este trabajo sin considerar el ancestro en común, finalmente, el tercer omega se estima para el ancestro de los cetáceos. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3. De esta tabla se desprende lo siguiente, se encontraron 15 canales iónicos en donde el modelo que estima un omega para todo el árbol tuvo el mejor ajuste, lo que representaría que en estos 15 canales no fueron necesarios cambios en la secuencia de nucleótidos para la adaptación de los cetáceos, esto se presenta en la tabla incluida en el material complementario. En cuanto al modelo 2 se encontraron 21 canales iónicos, en los cuales el grupo de cetáceos tuvieron una mayor tasa de sustitución que el resto de mamíferos placentados. Esto muestra que en esos canales fue necesario un cambio de secuencia a una tasa de sustitución mayor respecto a los otros organismos analizados representando cambios asociados a la evolución de los cetáceos para mantener la homeostasis en el nuevo ambiente habitado. Finalmente se encontraron 16 genes en donde el tercer modelo tuvo un mejor ajuste.

Estos resultados muestran que más de la mitad de los canales iónicos encontrados y evaluados en los cetáceos fueron sometidos a una mayor cantidad de sustituciones en cuanto a su secuencia nucleotídica debido a la presión que la necesidad de evolución creó sobre estos organismos.

Símbolo del gen de canal iónico	Mejor modelo identificado
KCNJ14	Modelo 2
KCNJ16	Modelo 2
KCNS1	Modelo 2
P2RX1	Modelo 2
KCNJ1	Modelo 2
KCNK7	Modelo 2
KCNH7	Modelo 2
CACNG1	Modelo 2
KCNMB1	Modelo 2
KCNH3	Modelo 2
KCNH4	Modelo 2
TRPC3	Modelo 2
KCNB2	Modelo 2
KCNB1	Modelo 2
CACNA1I	Modelo 2
TRPV3	Modelo 2
TMC8	Modelo 2
CNGA1	Modelo 2
SCNN1G	Modelo 2
KCND1	Modelo 2
SCN7A	Modelo 2
CNGA4	Modelo 3
CLCC1	Modelo 3
KCNK5	Modelo 3
KCNA10	Modelo 3
KCNK4	Modelo 3
KCNJ13	Modelo 3
TRPM8	Modelo 3
KCNQ2	Modelo 3
CLCN4	Modelo 3
SCN2A	Modelo 3
SCN8A	Modelo 3
SCN10A	Modelo 3
CACNA1F	Modelo 3
KCNQ4	Modelo 3
TRPM7	Modelo 3
CNGA3	Modelo 3

Tabla 3: Modelo con mejor ajuste calculado por en PAML, en la tabla se muestra el modelo que tuvo el mejor ajuste por cada gen correspondiente a un canal iónico estudiado.

7. Discusión

Los canales iónicos son altamente estudiados por su implicancia en funciones fundamentales para mantener la vida de los organismos. En el presente trabajo se investigaron los cambios que se produjeron en los canales iónicos de los cetáceos como producto del cambio de un hábitat terrestre a uno acuático. En nuestra identificación de canales nos encontramos con diversas familias de canales que se han identificado y descrito en la búsqueda de targets para drogas con el objetivo de tratar enfermedades. Algunos ejemplos de canales iónicos que identificamos a través del desarrollo de nuestra metodología fueron de canales iónicos dependientes de voltaje como los de potasio, sodio y calcio. Canales P2X, canales de cloruro, canales TRP que transportan cationes, entre otros. Los canales encontrados se han identificado y descrito en humano en distintas investigaciones principalmente con fines médicos (Hutchings et al., 2019).

El número de copias de canales iónicos es un dato que varía dependiendo de la metodología y parámetros empleados en la búsqueda de estos, si se utilizan todas las proteínas encontradas en las bases de datos se tendrán proteínas duplicadas ya que en estos archivos se encuentra más de una proteína por cada gen. Esto aumenta significativamente el número de canales encontrados y en algunos casos incluso se llegan a duplicar los resultados obtenidos. Para evitar esto se ejecutó el filtro de canales por su gen correspondiente y se obtuvieron números en su mayoría en un rango bastante similar (entre 160 y 197 canales iónicos por especie). Este rango es obtenido gracias a la estimación de ortólogos que realiza OMA ya que gracias a este se pueden aumentar los números identificando los canales que en su anotación no son identificados como tal (Gabashvili et al., 2007). Estos resultados como se menciona anteriormente son tomados en base a los canales iónicos identificados a través de nuestra metodología en nuestros organismos modelo, que en este caso son el humano y ratón que poseen 197 y 185 canales respectivamente que es una cantidad cercana al de canales predichos por otras metodologías en donde se encontraron 180 canales aproximadamente (Gao et al., 2020).

En cuanto a los resultados obtenidos al ejecutar el programa CAFE se puede apreciar que no hay familias de genes que evolucionaron más rápido que el resto. Lo que representa que no habrían ocurrido cambios en las familias de genes correspondientes a canales iónicos presentes en los cetáceos. En cuanto a las contracciones se encontraron algunas cosas interesantes entre especies. Estas contracciones sugieren que entre las especies de cetáceos en las que se produjeron estas pérdidas de genes no habrían sido necesarios estos canales para adaptarse y mantener la homeostasis en estos organismos (Ames et al., 2014). Finalmente se analizaron las expansiones en los organismos analizados y se encontró que, en dos especies de cetáceos, específicamente el delfín chino de río y la ballena enana se agregaron 14 y 3 familias de genes respectivamente. Las adiciones de estas familias de canales iónicos sugieren una falta en el número de estas proteínas para interactuar con el nuevo medio ambiente acuático por lo que se estaba generando una necesidad de aumentar la cantidad de canales para responder a la presión que el medio estaba generando en estas especies (Zhong et al., 2021).

Los resultados obtenidos no son numerosos ya que estos no se hicieron en base a todas las proteínas como en otros estudios realizados asociados a expansión y contracción de familias de genes (Wang et al., 2020).

Finalmente, se realizaron los cálculos de PAML en donde como se describe en la metodología se utilizaron tres modelos para estimar su omega correspondiente a sus tasas de sustitución. En los modelos propuestos se encontraron 15 canales iónicos en donde la tasa de sustitución no varió entre el grupo de cetáceos en cuanto al resto de los mamíferos lo que muestra que estos 15 canales mostrados en la tabla presente en el material complementario no necesitaron cambios (evolución neutra) en su secuencia para cumplir su función en el agua (Sikosek & Chan, 2014).

En la evaluación del segundo modelo, 21 canales iónicos fueron identificados, en los cuales todos los omegas correspondientes al grupo de cetáceos presentaban una tasa de sustitución mayor al resto de los cetáceos al compararlos. Esto sugiere que las secuencias de estas proteínas se vieron sometidas a adaptación que en este caso es la selección positiva, donde las mutaciones generadas con el tiempo fueron conservadas para la adaptación de los cetáceos al ambiente acuático (Spielman & Wilke, 2015).

Por último, se realizó el análisis de los canales iónicos en los que el tercer modelo tuvo el mejor ajuste. En este caso se encontraron 16 canales iónicos en los que la tasa de sustitución fue mayor siempre en los cetáceos. Mientras en los cetáceos el valor de omega fue mayor los otros dos grupos se alternaron, en algunos genes los ancestros de los cetáceos tuvieron un omega mayor y en otros canales el resto de los mamíferos tuvieron una tasa de sustitución mayor.

De estos resultados se desprende que 37 canales iónicos de 52 analizados tuvieron una tasa de sustitución mayor en cetáceos respecto a los otros mamíferos. Esto sugiere que 37 canales iónicos de los cetáceos fueron sometidos a selección positiva debido a la adaptación para la vida en el nuevo hábitat, números dentro del rango esperado en este tipo de estudios (Saarman et al., 2017).

8. Conclusiones

En base a la pregunta que se buscó responder y a los resultados obtenidos se pueden concluir varias cosas, la pregunta básicamente corresponde a si existirían cambios en los genes que codifican para canales iónicos en cetáceos como consecuencia del cambio de un estilo de vida terrestre a uno acuático.

Respecto a las conclusiones obtenidas en primer lugar se puede concluir que la necesidad adaptativa no influyó de gran manera en el número de copias de canales iónicos encontrados en cada organismo estudiado. Esto indica que los métodos de intercambio de iones presentes en el agua de mar fueron satisfechos con la orina y los excrementos concentrados que elimina cada organismo luego de su alimentación.

En segundo lugar, se produjo una variación en algunas familias de genes. Como se mencionó en el apartado de resultados no se identificaron familias de genes que evolucionaron rápidamente producto de la necesidad de adaptación. Esto quiere decir que en los cetáceos no hubo variación en el número de copias de canales iónicos. Además, se vio que no hubo adiciones entre especies de cetáceos, lo que confirma la anterior afirmación con una excepción. Las adiciones encontradas en la familia de genes del delfín chino de río (*Lipotes vexillifer*) se interpretan como una necesidad por aumentar el número de copias de canales iónicos al ingresar al nuevo ambiente acuático. Las contracciones encontradas en los organismos se atribuyen en parte a la diferencia en el número de canales iónicos encontrados por cada especie estudiada. Se debe destacar de igual manera las 6 familias encontradas entre la ballena de Groenlandia (*Balaena mysticetus*) y la ballena enana (*Balaenoptera acutorostrata*). Esta pérdida sugeriría que no estos canales no eran necesarios para el desarrollo de la vida en el mar y siendo la homeostasis regulada por otros factores.

Por último, la tasa de sustitución encontrada en la ejecución de PAML muestran que más de la mitad de los canales iónicos analizados tuvieron una evolución acelerada en su secuencia de nucleótidos en cetáceos respecto al resto de mamíferos analizados. Lo que demuestra que se necesitó una adaptación y cambios en la secuencia de los canales iónicos para poder adentrarse y habitar en el agua.

Esto se agrega a los cambios mencionados durante el trabajo en donde se detallan adaptaciones en los riñones de los cetáceos para optimizar la eliminación de iones presentes en el agua de mar como el sodio y el cloruro a través de la orina y excrementos.

Como se puede ver se encontraron indicios de evolución en los canales iónicos pertenecientes a los cetáceos respecto a su número, los ortólogos presentes en los organismos, la pérdida o adición de estos al genoma y su tasa de evolución respecto a los otros organismos analizados. Esto demuestra que además de adaptaciones anatómicas tuvieron que generar cambios a nivel molecular para mantener en orden los fluidos que se encontraban en el nuevo medio. El objetivo de estos cambios por supuesto es el de generar el equilibrio entre estos fluidos presentes en el medio externo como interno de la célula optimizando y/o adaptando la homeostasis al nuevo ambiente.

9. Referencias.

- Altenhoff, A. M., Levy, J., Zarowiecki, M., Tomiczek, B., Vesztröcy, A. W., Dalquen, D. A., Müller, S., Telford, M. J., Glover, N. M., & Dessimoz, C. (2018). OMA standalone: Orthology inference among public and custom genomes and transcriptomes. *BioRxiv*, 1152–1163. <https://doi.org/10.1101/397752>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Ames, R. M., Money, D., & Lovell, S. C. (2014). Inferring gene family histories in yeast identifies lineage specific expansions. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099480>
- Chloride channels. (2009). *British Journal of Pharmacology*, 158(Suppl 1), S130–S134. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00503_6.x
- Costa, D. P. (2009). Osmoregulation. *Encyclopedia of Marine Mammals*, 801–806.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver, K., & Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50(10), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>
- Gabashvili, I. S., Sokolowski, B. H., Morton, C. C., & Giersch, A. B. (2007). Ion channel gene expression in the inner ear. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*, 8(3), 305–328. <https://doi.org/10.1007/s10162-007-0082-y>
- Gaidos, E., Deschenes, B., Dundon, L., Fagan, K., Mcnaughton, C., Menviel, L., Moskovitz, N., & Workman, M. (2005). *ASTROBIOLOGY* Volume 5, Number 2, 2005 © Mary Ann Liebert, Inc. *Astrobiology*, 5(2), 100–126.
- Gao, J., Wei, H., Cano, A., & Kurgan, L. (2020). PSIONplus server for accurate multi-label prediction of ion channels and their types. *Biomolecules*, 10(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/biom10060876>
- Han, M. v., Thomas, G. W. C., Lugo-Martinez, J., & Hahn, M. W. (2013). Estimating gene gain and loss rates in the presence of error in genome assembly and annotation using CAFE 3. *Molecular Biology and Evolution*, 30(8), 1987–1997. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst100>
- Haswell, E. S., Phillips, R., & Rees, D. C. (2011). Mechanosensitive Channels: What Can They Do and How Do They Do It? *Structure*, 19(10), 1356–1369. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.09.005>

- Herrington, J., & Arey, B. J. (2014). Conformational Mechanisms of Signaling Bias of Ion Channels. In *Biased Signaling in Physiology, Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411460-9.00006-9>
- Huelsmann, M., Hecker, N., Springer, M. S., Gatesy, J., Sharma, V., & Hiller, M. (2019). Genes lost during the transition from land to water in cetaceans highlight genomic changes associated with aquatic adaptations. *Science Advances*, 5(9), 1–12. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw6671>
- Hughes, S., Foster, R. G., Pei, S. N., & Hankins, M. W. (2017). Expression and localisation of two-pore domain (K2P) background leak potassium ion channels in the mouse retina. April, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep46085>
- Hutchings, C. J., Colussi, P., & Clark, T. G. (2019). Ion channels as therapeutic antibody targets. In *mAbs* (Vol. 11, Issue 2, pp. 265–296). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1548232>
- Jentsch, T. J., Hübner, C. A., & Fuhrmann, J. C. (2004). Ion channels: Function unravelled by dysfunction. *Nature Cell Biology*, 6(11), 1039–1047. <https://doi.org/10.1038/ncb1104-1039>
- Johnson, A. D. (2009). Single-Nucleotide Polymorphism Bioinformatics. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(5), 530–536. <https://doi.org/10.1161/circgenetics.109.872010>
- Kuang, Q. (2015). Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(19), 3677–3693. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1948-5>
- Lipscombe, D., & Toro, C. P. (2014). Biophysics of Voltage-Gated Ion Channels. In *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397179-1.00013-0>
- Macé, M., & Crouau-Roy, B. (2008). A highly polymorphic insertion in the Y-chromosome amelogenin gene can be used for evolutionary biology, population genetics and sexing in Cetacea and Artiodactyla. *BMC Genetics*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-64>
- Mani, T., Bourguinat, C., Keller, K., Carreton, E., Peregrine, A., & Prichard, R. K. (2016). Polymorphism in ion channel genes of *Dirofilaria immitis*: Relevant knowledge for future anthelmintic drug design. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(3), 343–355. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.06.003>
- Molnar, C., & Gair, J. (2015). *Concepts of Biology-1st Canadian Edition*. *Concepts of Biology-1st Canadian Edition*, 1, 1007. <https://opentextbc.ca/biology/>
- Norris, A. J., Foeger, N. C., & Nerbonne, J. M. (2011). *NIH Public Access*. 486(2), 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.067>. Neuronal

- Paton, A. (2013). *Science of Medicine*. *Bmj*, 3(5672), 706–706.
<https://doi.org/10.1136/bmj.3.5672.706>
- Raghavan, M., Fee, D., & Barkhaus, P. E. (2019). Generation and propagation of the action potential. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 160). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00001-1>
- Ramírez-Bello, J., & Jiménez-Morales, M. (2017). Implicaciones funcionales de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificantes de proteínas y no codificantes en enfermedades multifactoriales. *Gaceta Medica de Mexico*, 153(2), 238–250.
- Roseto, A. (2003). Las membranas celulares. Los canales ionico y nefrología molecular. *Arch. Argent. Pediatr*, 101(4), 320–343.
- Saarman, N. P., Kober, K. M., Simison, W. B., & Pogson, G. H. (2017). Sequence-based analysis of thermal adaptation and protein energy landscapes in an invasive blue mussel (*mytilus galloprovincialis*). *Genome Biology and Evolution*, 9(10), 2739–2751. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx190>
- Saimi, Y., Loukin, S. H., Zhou, X. L., Martinac, B., & Kung, C. (1999). Ion channels in microbes. *Methods in Enzymology*, 294(4), 507–524. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)94030-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)94030-2)
- Sikosek, T., & Chan, H. S. (2014). Biophysics of protein evolution and evolutionary protein biophysics. In *Journal of the Royal Society Interface* (Vol. 11, Issue 100). Royal Society of London. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0419>
- Smith, T. F., & Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*, 147(1), 195–197.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90087-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5)
- Sonnhammer, E. L. L., & Krogh, A. (2008). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequence. *Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 8. papers://4b986d00-906f-493f-a74b-71e29d82b719/Paper/p6291
- Spielman, S. J., & Wilke, C. O. (2015). The relationship between dN/dS and scaled selection coecients Downloaded from (Vol. 12). <http://mbe.oxfordjournals.org/>
- Tejada-Martinez, D., de Magalhães, J. P., & Opazo, J. C. (2021). Positive selection and gene duplications in tumour suppressor genes reveal clues about how cetaceans resist cancer. *Proceedings. Biological Sciences*, 288(1945), 20202592.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2592>
- Thewissen, J. G. M., Cooper, L. N., Clementz, M. T., Bajpai, S., & Tiwari, B. N. (2007). Whales originated from aquatic artiodactyls in the Eocene epoch of India. *Nature*, 450(7173), 1190–1194. <https://doi.org/10.1038/nature06343>

- Tykocki, N. R., Boerman, E. M., & Jackson, W. F. (2017). Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 176, Issue 12, pp. 485–581). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
- Wang, J., Liu, W., Zhu, D., Zhou, X., Hong, P., Zhao, H., Tan, Y., Chen, X., Zong, X., Xu, L., Zhang, L., Wei, H., & Liu, Q. (2020). A de novo assembly of the sweet cherry (*Prunus avium* cv. Tieton) genome using linked-read sequencing technology. *PeerJ*, 2020(6). <https://doi.org/10.7717/peerj.9114>
- Xiao, R., & Xu, X. Z. S. (2010). Mechanosensitive channels: In touch with Piezo. *Current Biology*, 20(21). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.053>
- Xu, S., Yang, Y., Zhou, X., Xu, J., Zhou, K., & Yang, G. (2013). Adaptive evolution of the osmoregulation-related genes in cetaceans during secondary aquatic adaptation. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-189>
- Yang, M., Derbyshire, M. K., Yamashita, R. A., & Marchler-Bauer, A. (2020). NCBI's Conserved Domain Database and Tools for Protein Domain Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 69(1), 139–148. <https://doi.org/10.1002/cpbi.90>
- Yang, Z. (2007). PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1586–1591. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm088>
- Yates, A. D., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Marugán, J. C., Cummins, C., Davidson, C., Dodiya, K., Fatima, R., Gall, A., ... Flicek, P. (2020). Ensembl 2020. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D682–D688. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz966>
- Yi, B. A., & Jan, L. Y. (2002). *Ion Channels*. 2, 599–615.
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacological Reviews*, 67(4), 821–870. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>
- Zhong, Y., Zhang, X., Shi, Q., & Cheng, Z. M. (2021). Adaptive evolution driving the young duplications in six Rosaceae species. *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07422-7>