



**UNIVERSIDAD  
DE LOS ANDES  
VENEZUELA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**CENTRO DE CÁLCULO CIENTÍFICO UNIVERSIDAD DE LOS ANDES (CECALCULA)**

**Trabajo Especial de Grado**

**Evolución molecular convergente de la mioglobina en aves que experimentan condiciones de hipoxia**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Autor: Luis Ángel Niño Barreat**

**Tutor externo: Ascanio Rojas A.**

**Tutor Académico: Guillermo Bianchi**

**Mérida, Julio 2022**

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

*“There is an intrinsic simplicity of nature and the ultimate contribution of science resides in the discovery of unifying and simplifying generalizations, rather than the description of isolated situations -in the visualization of simple, overall patterns rather than in the analysis of patchworks-.”* Salvador Edward Luria, General Virology, 1953.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Resumen

La mioglobina, representa una proteína monomérica que es expresada principalmente en el corazón y los músculos esqueléticos de los vertebrados mandibulados. Ésta regula la tensión local de oxígeno molecular y también actúa como enzima, catalizando la dioxigenación del monóxido de nitrógeno, la oxidación del sulfuro de dihidrógeno, entre otras reacciones. Aunque constituye una proteína altamente conservada, se han observado en múltiples ocasiones grupos que han experimentado presiones selectivas positivas durante eventos de radiación, fijando sustituciones con claras consecuencias funcionales que representan adaptaciones moleculares. Esta adaptación se ha observado en algunos mamíferos alpinos, representando un mecanismo que les permite resistir la hipoxia hipobárica. Después de reconstruir la estructura de la mioglobina en 489 especies de aves y examinar su evolución junto a sus propiedades fisicoquímicas en 224 especies de aves (38/41 Órdenes de aves), evaluando las consecuencias estructurales y funcionales de las sustituciones asociadas a los estilos de vida que experimentan condiciones de hipoxia, se encontró la evolución independiente de una elevada carga neta de esta proteína en cormoranes y cotúas (Phalacrocoracidae y Anhingidae), álcidos (Alcidae), zambullidores (Gaviiformes) y pingüinos (Spheniscidae). Estos últimos resaltan por presentar un elevado número de cisteínas y las cargas más elevadas de todos los amniotas, lo que concuerda con las concentraciones musculares reportadas. Además, se pudo identificar varios paralelismos entre estas aves y mamíferos acuáticos sujetos a unas presiones selectivas positivas y relacionadas a un aumento en la carga, mayor estabilidad, y un incremento del tamaño de los bolsillos internos de esta proteína. De forma similar se encontraron paralelismos que emergieron entre grupos de aves con cargas elevadas, sugiriendo una fuerte restricción en la evolución de esta propiedad. Por otro lado, la hipoxia hipobárica no está asociada a una mayor carga neta positiva en aves migratorias de largas distancias y resisten a ésta por medio de otros mecanismos. E identificamos a la glucosa-6fosfato y el lactato como posible moduladores de la Mb en aves.

**Palabras clave:** mioglobina, convergencia, aves, hipoxia.

# Índice

## Contenido

Abreviaciones	<a href="#">7</a>
Introducción	<a href="#">8</a>
Marco teórico	<a href="#">11</a>
Justificación	<a href="#">16</a>
Hipótesis	<a href="#">16</a>
Objetivos	<a href="#">17</a>
Metodología	<a href="#">17</a>
Resultados	<a href="#">19</a>
Discusión	<a href="#">51</a>
Conclusión	<a href="#">57</a>
Referencias	<a href="#">58</a>
Anexo	<a href="#">63</a>

## Tablas

Tabla 1. Posiciones de los residuos de cisteína en la Mb de aves.	<a href="#">25</a>
Tabla 2. Nombre de las especies evaluadas y ubicación de su mb.	<a href="#">63</a>
Tabla 3. Carga neta a pH 7 y punto isoeléctrico de la Mb, junto a la masa promedio de la diferentes especies evaluadas.	<a href="#">75</a>

## Figuras

Figura 1. Mecanismo de reacción postulado para la oxidación del sulfuro de dihidrógeno por la Fe <sup>III</sup> -Mb.	<a href="#">13</a>
Figura 2. Longitud de la mb.	<a href="#">20</a>
Figura 3. Longitud del primer exón de la mb.	<a href="#">20</a>
Figura 4. Longitud del primer intrón de la mb.	<a href="#">21</a>
Figura 5. Longitud del segundo exón de la mb.	<a href="#">21</a>
Figura 6. Longitud del segundo intrón de la mb.	<a href="#">22</a>
Figura 7. Longitud del tercer exón de la mb.	<a href="#">22</a>
Figura 8. Estructura terciaria consenso de las Mbs.	<a href="#">23</a>
Figura 9. Diferentes vistas y representaciones de la estructura terciaria de la Mb consenso de las aves que presentan cisteína.	<a href="#">24</a>
Figura 10. Topología del mejor árbol filogenético reconstruido en RAxML sin restricciones topológicas.	<a href="#">26</a>
Figura 11. Solapamiento de la estructura terciaria de nuestro modelo Mb Humana <i>H. sapiens</i> con el modelo de referencia de Swiss-Model P02144 y AlphaFold AF-P02144-F1.	<a href="#">27</a>
Figura 12. Cuadro de Ramachandran de la Mb refinada del turaco crestirrojo <i>T. erythrolophus</i> .	<a href="#">28</a>
Figura 13. Carga neta de la Mb a pH 7 en distintos clados de Amniotas.	<a href="#">29</a>
Figura 14. Gráficos diagnósticos del modelo “Carga neta de la Mb ~ Buceo + ln(masa)”.	<a href="#">31</a>
Figura 15. Carga neta de la Mb a pH 7 en aves.	<a href="#">32</a>
Figura 16. Masa en aves.	<a href="#">32</a>
Figura 17. Reconstrucción ancestral de la capacidad de buceo en las aves.	<a href="#">34</a>
Figura 18. Reconstrucción ancestral de la carga neta de la Mb en aves.	<a href="#">35</a>
Figura 19. Fenograma de la carga neta en el transcurso de la evolución de la	

mb.	<a href="#">35</a>
Figura 20.Reconstrucción ancestral de la masa en aves.	<a href="#">36</a>
Figura 21. Fenograma de la masa en el transcurso de la evolución de la mb.	<a href="#">37</a>
Figura 22. Convergencias en la posición 9 de la Mb.	<a href="#">38</a>
Figura 23. Convergencias en la posición 66 de la Mb.	<a href="#">39</a>
Figura 24. Convergencias en la posición 22 de la Mb.	<a href="#">40</a>
Figura 25. Convergencias en la posición 57 de la Mb.	<a href="#">41</a>
Figura 26. Convergencias en la posición 110 de la Mb.	<a href="#">42</a>
Figura 27. Convergencias en la posición 45 de la Mb.	<a href="#">43</a>
Figura 28. Convergencias en la posición 27 de la Mb.	<a href="#">44</a>
Figura 29. Convergencias en la posición 9, 27, 34 y 45 de la Mb.	<a href="#">45</a>
Figura 30.Cavidad del bolsillo del grupo hemo de la Mb consenso en aves.	<a href="#">46</a>
Figura 31. Acoplamiento molecular del grupo hemo con la apoMb.	<a href="#">47</a>
Figura 32. Acoplamiento molecular del oxígeno con la Mb.	<a href="#">47</a>
Figura 33. Acoplamiento molecular de la glucosa-6-fosfato con la Mb.	<a href="#">48</a>
Figura 34. Acoplamiento molecular del lactato con la Mb.	<a href="#">48</a>
Figura 35. Acoplamiento molecular del monóxido de nitrógeno con la Mb.	<a href="#">49</a>
Figura 36. Acoplamiento molecular del sulfuro de dihidrógeno con la Mb.	<a href="#">49</a>
Figura 37. Posición de los sitios de la Mb con episodios de selección positiva elaborado en MEME.	<a href="#">50</a>
Figura 38. Posición de los sitios de la Mb con episodios de selección positiva y negativa con una probabilidad posterior mayor o igual a 0.8, elaborado en FUBAR.	<a href="#">51</a>

## Abreviaciones

aa	Residuos de aminoácidos
Adgb	Androglobina
apoMb	Mioglobina no asociada al grupo hemo
ADL	Límite de Buceo Aeróbico
cADL	Límite de Buceo Aeróbico calculado
deoxyMb	Mioglobina sin oxígeno coordinando al grupo hemo
df	Grados de libertad
ds	Desviación estándar
e	Unidad de carga, $1.602 \times 10^{-19}$ C
FUBAR	A Fast, Unconstrained Bayesian AppRoximation for Inferring Selection (Una rápida aproximación bayesiana no restringida para inferir rastros de selección)
GbE	Globina E
GbY	Globina Y
GbX	Globina X
Hb	Hemoglobina
indels	Inserciones y deleciones
mb	Gen de la mioglobina
Mb	Mioglobina asociada al grupo hemo
Mb-SNO	Nitrosilación de una cisteína de la mioglobina
MEME	Mixed Effects Model of Evolution (Modelo de evolución de efectos mixtos)
m snm	Metros sobre el nivel del mar
Ngb	Neuroglobina
nt	Nucleótidos
oxyMb	Mioglobina con el oxígeno coordinando al grupo hemo
Ph1	Bolsillo fantasma 1
Ph2	Bolsillo fantasma 2
PMGLS	Phylogenetic Mixed Generalized Linear models (Modelos Lineales Generalizados Mixtos Filogenéticos)
P50	Presión parcial de oxígeno en la cual 50% de las Mb están asociadas a esta molécula
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TFN	Tasa de falsos negativos
VIF	Factor de inflación de la varianza
Vmp	Velocidad de vuelo que requiere la mínima potencia
Vmr	Velocidad de vuelo que produce el mayor desplazamiento

## Introducción

La evolución independiente de caracteres o estados de caracteres similares en distintos linajes ha ocurrido múltiples veces en la historia de la vida (Rey et al., 2018), esta convergencia puede ser el resultado de procesos parecidos (i.e. paralelismo) o completamente diferentes. Por lo general, existe una estrecha asociación entre estas homoplasias y ciertas características del ambiente de los organismos que las presentan, que sugieren su potencial valor adaptativo (Futuyma, 2009).

A nivel molecular, la evolución convergente fenotípica permite estudiar la conexión entre los genomas y los fenotipos, reconstruyendo la evolución de genes o genomas en aquellas especies que exhiben un fenotipo convergente junto a especies cercanamente relacionadas que comparten el fenotipo ancestral (Rey et al., 2018).

Así, se pueden identificar las sustituciones de nt o aa que ocurrieron junto al cambio del fenotipo y que podrían estar involucrados en su formación (Rey et al., 2018). Se espera que durante la evolución convergente adaptativa de una enzima, las presiones selectivas involucradas promuevan la acumulación de ciertos aa con determinadas propiedades fisicoquímicas en sitios específicos, sujetos a fuertes limitaciones relacionadas con la actividad y estabilidad de la misma (Studer et al., 2014).

De esta manera, se pudo descubrir la evolución convergente de la lisozima en rumiantes, monos colobinos y el hoacín *Opisthocomus hoazin* (Futuyma, 2009), convergencias moleculares en el metabolismo C4 de poáceas, la resistencia a cardenólidos en 14 especies de insectos, convergencias involucradas en la ecolocalización de murciélagos, cetáceos y la capacidad de buceo en diversos vertebrados (Rey et al., 2018). En esta última resalta la evolución de las globinas, ya que existen casos notables asociados a radiaciones adaptativas donde se han observado presiones selectivas positivas sobre éstas (especialmente en la Mb) que ocasionaron la fijación de diversas sustituciones con claras consecuencias funcionales, que representan adaptaciones moleculares al nuevo nicho (Nery et al., 2013).

Los cetáceos exhiben una elevada concentración de Mb ( $\approx 78$  mg/g de músculo) cerca de 10 veces mayor que la de los mamíferos terrestres ( $\approx 5$  mg/g de músculo); esto permite a la Mb desempeñar la función de reserva de oxígeno durante periodos de hipoxia local en los músculos, almacenando hasta el 50% del oxígeno disponible en el transcurso de una inmersión (Wright & Davis, 2015). Se trata de una adaptación molecular debida al aumento en la carga neta de superficie de la Mb, ya que un incremento en la repulsión electrostática de los monómeros evita que éstos se asocien entre sí e impide una disminución en la afinidad por sus sustratos, además de posibles daños a nivel celular (Mirceta et al., 2013).

De esta manera, se ha estudiado la evolución de la Mb y su relación con la capacidad de buceo en los cetáceos. Así se pudo predecir el tiempo de inmersión en función de la carga neta de superficie de la Mb y la masa del animal (Mirceta et al., 2013); además, se logró identificar un aumento en la estabilidad de la proteína (Holm et al., 2016).

De forma similar, se ha reportado una mayor concentración de Mb en pinnípedos, pero a diferencia de los cetáceos, estos mamíferos también muestran un aumento en la afinidad por el oxígeno molecular con un rango de P50 entre 3.23-3.81 mmHg (menor en función de una mayor capacidad de inmersión) posiblemente relacionado con algunas sustituciones en el bolsillo del grupo hemo (Wright & Davis, 2015).

En especies del orden Eulipotyphla, no sólo es posible discernir entre posibles adaptaciones de especies semiacuáticas y terrestres en función de la carga neta de superficie de la Mb, sino también entre espe-

cies con hábitos subterráneos y especies alpinas (He et al., 2021). Estas convergencias se han observado en monotremas, lo que sugiere hábitos semiacuáticos en el ancestro común del ornitorrinco *Ornithorhynchus anatinus* y los taquiglósidos (Mirceta et al., 2013), al igual que en el género *Castor*, la rata almizclera *Ondatra zibethicus*, los mamíferos hiracoideos y proboscídeos (Mirceta et al., 2013); en este último grupo, destaca la sustitución de la Histidina distal E7 por Glicina, que reduce la tasa de autooxidación de la Mb y aumenta la tasa de dioxigenación del monóxido de nitrógeno (Romero-Herrera et al., 1981; Tejero & Gladwin, 2014).

Las aves acuáticas que experimentan periodos de hipoxia durante sus inmersiones, específicamente especies de los órdenes Anseriformes y Sphenisciformes, presentan una mayor concentración de Mb que las aves terrestres [ $\approx 64$  mg/g de músculo en el pingüino emperador *Aptenodytes forsteri* comparado con  $<1$  mg/g de músculo en Galliformes (Wright & Davis, 2015)] que está correlacionada con la duración de la inmersión, y parece estar asociado a una elevada carga neta de superficie de la proteína (Rizvi et al., 2021). A su vez, estas aves presentan un rango de P50 entre los 2.40-3.36 mmHg, la cual disminuye en función del tiempo potencial de inmersión de la especie (Wright & Davis, 2015).

La mayoría de las aves y mamíferos acuáticos capaces de realizar inmersiones permanecen aeróbicos durante el transcurso de las mismas, ya que sus elevadas reservas de oxígeno les permiten mantener altas tasas metabólicas, incluso durante la activa persecución de sus presas (P. Butler, 2004). Sin embargo, existen especies de pinnípedos (Phocidae) y pingüinos (Sphenisciformes) que desafían las menos conservadas predicciones fisiológicas, y permanecen aeróbicos en buceos “imposibles” (ej. se ha registrado al pingüino emperador *Aptenodytes forsteri* a profundidades de 564 m), explicadas al asumir que presentan hipometabolismo e hipotermia de forma regional en algunas etapas de sus inmersiones, producen ATP de forma anaeróbica, metabolizan el lactato, y realizan hipoperfusión de forma selectiva (P. Butler, 2004; Wright & Davis, 2015).

Por otro lado, recientemente se ha predicho una elevada carga neta de superficie de la Mb en el águila real *Aquila chrysaetos chrysaetos* sugiriendo una alta concentración muscular en esta especie alpina, que podría tener un valor adaptativo en este ambiente de alta montaña, registrada hasta los 3700 m snm (Rizvi et al., 2021). En particular, se espera un mayor requerimiento de energía y oxígeno en el vuelo activo a medida que aumenta la altitud como respuesta a la hipoxia hipobárica; además, el mantenimiento de la temperatura corporal a bajas temperaturas de aire podría representar un relevante costo energético adicional (P. J. Butler, 1991; Pages & Planas, 1982).

Las aves migratorias representan el modelo adecuado para estudiar los diferentes aspectos de la biología del vuelo junto a posibles adaptaciones convergentes asociadas a la altitud o bajas temperaturas. Estos animales exhiben largos movimientos espaciales y temporales predecibles, donde aproximadamente la mayoría de los individuos de una población viajan en la misma dirección y al mismo tiempo (Endler, 1977). Este constituye un comportamiento que ha evolucionado múltiples veces de forma independiente en varios órdenes (Lovette & Fitzpatrick, 2016) que presentan la variabilidad deseada para evaluar explicaciones adaptativas en la evolución de la Mb.

Especialmente aquellas consideradas aves migratorias de largas distancias, representan el extremo de un continuo, donde todos los individuos de una población realizan movimientos intercontinentales desplazándose entre las zonas reproductivas y no reproductivas (Rappole, 2013). Estas especies realizan vuelos activos sobre grandes barreras biogeográficas, como océanos (el Mediterráneo, Golfo de México, el Atlántico y el Pacífico), continentes (migraciones Afro-Asiáticas), desiertos (el Sahara) y altas cordilleras (los Himalayas, los Alpes, los Andes) (Berthold et al., 2003). Estos vuelos pueden tener

duraciones de al menos 50-100 h en condiciones extremas de temperatura, altitud, sin reposo, agua, ni comida (Newton, 2008).

Por ejemplo, en el ganso Indio *Anser indicus* [que cruza los Himalayas en su migración entre los 8-10 Km de altitud y se desplaza hasta 1000 Km en un día (Lovette & Fitzpatrick, 2016)] se ha reportado una elevada concentración de Mb en los músculos pectorales y cardiaco comparado con especies cercanamente relacionadas sedentarias que habitan tierras bajas<sup>18</sup>. Incluso se ha observado a esta especie comportarse normalmente al someterse a una cámara hipobárica simulando condiciones que encontrarían sobre los 12 Km de altitud (Berthold, 1996).

Si la Mb de aves acuáticas y migratorias de largas distancias experimenta presiones selectivas similares, con severas restricciones estructurales, cabe esperar que hayan ocurrido múltiples sustituciones de aa con propiedades fisicoquímicas similares de forma convergente, que resultarían en una alta concentración de esta proteína o una mayor afinidad por los sustratos.

De esta manera, nos planteamos las siguientes interrogantes:

1. ¿Existen sustituciones convergentes de aa en la Mb de aves que experimentan condiciones de hipoxia?
2. ¿Serán similares las adaptaciones moleculares presentes en estas aves a las de los mamíferos acuáticos?
3. ¿De qué forma afectan estas sustituciones a la carga neta de superficie de la proteína?
4. ¿Estas sustituciones aumentarán la afinidad de la Mb por sus sustratos?

## Marco Teórico

### Evolución de la mioglobina

La Mb descende de un antiguo linaje de hemoglobinas bacterianas, la familia F de flavohemoglobinas, incorporada en los genomas de eucariotas por uno o varios eventos de transferencia horizontal de genes que acompañaron la endosimbiosis y formación de la mitocondria y plastidios hace ~1000–650 Ma. Posteriormente, la emergencia de los principales grupos de eucariotas unicelulares y multicelulares fue acompañada por la expansión y diversificación funcional de estos genes (Vinogradov et al., 2011).

En vertebrados, la diversidad actual de la familia de globinas es producto de varios eventos de duplicación del genoma completo y otros múltiples eventos a pequeña escala, seguidos por patrones particulares de retención y pérdida de estos genes (Hoffmann et al., 2012). Diversas evidencias muestran que el ancestro común de los vertebrados poseía al menos 7 genes de globinas, una copia de androglobina (Adgb) y neuroglobina (Ngb) junto a cuatro parálogos de la globina-X (GbX) y una sola copia del gen progenitor de las globinas específicas de este clado. Este último, resultó ser el ancestro común entre las Hbs, Mbs de ciclostomados y las alfa/beta hemoglobinas (Hb), Mb, globina-E (GbE), globina-Y (GbY), citoglobina (Cygb) de los mandibulados (Opazo et al., 2015).

Actualmente, las globinas muestran diferentes patrones de expresión en distintos tejidos y parecen desempeñar funciones específicas vitales en la evolución del metabolismo aeróbico de los vertebrados (Hoffmann et al., 2012). La Ngb representa un gen de una sola copia que codifica una proteína monomérica de función desconocida, expresada en el sistema nervioso central y en algunos tejidos endocrinos de vertebrados óseos. En cambio, la Cygb (de una o más copias) codifica una proteína homodimérica expresada en el fibroblasto y determinadas células del sistema nervioso central/periférico. Por otro lado, la Adgb (de una copia) codifica una proteína quimérica (una globina unida a un dominio Calpain en el extremo N-terminal y con un motivo IQ receptor de calmodulina) que es predominantemente expresado en los testículos. Tanto la Cygb y la Adgb están presentes en todos los vertebrados y sus funciones aún no son comprendidas (Opazo et al., 2015).

Se han reportado una o más copias de GbX que codifican en vertebrados óseos (excepto mamíferos y arcosaurios) una proteína monomérica unida a la membrana plasmática con sitios de acilación en el extremo N-terminal, y que posiblemente desempeña un rol de señalización/protección ante ROS (Opazo et al., 2015). La GbY, (de una copia), ha sido descrita en los genomas del celacanto *Latimeria chalumnae*, el anolis *Anolis carolinensis* y el ornitorrinco *O. anatinus*, presente en múltiples tejidos, pero ausente en ciclostomados, peces teleósteos, aves, marsupiales y mamíferos placentados (Opazo et al., 2015). La enigmática GbE, antiguamente considerada exclusiva de aves, es una proteína monomérica que parecía regular el suministro de oxígeno de las células fotorreceptoras de la retina en estos animales, pero fue recientemente descubierta en el genoma del celacanto *L. chalumnae* (Opazo et al., 2015).

Por otro lado, las Hbs (tal vez el modelo de proteína más ampliamente estudiado) están presentes en todos los vertebrados con mandíbulas, forman una proteína tetramérica expresada principalmente en los eritrocitos que desempeña la función de transporte del oxígeno molecular desde las superficies respira-

torias a la sangre arterial, tejidos respiratorios, y desde allí, transporta el dióxido de carbono por la sangre venosa hasta las superficies respiratorias(Hoffmann et al., 2011).

La Mb, en general producto de un gen de una sola copia, está presente en prácticamente todos los órdenes de vertebrados con mandíbulas a excepción de los anfibios, y ha sido eliminado de forma completa o parcial en especies particulares como la zarigüeya gris de cola corta *Monodelphis domestica*, el pez espinoso *Gasterosteus aculeatus*, el pez mariposa africano *Pantodon buchholzi* y en 6 de las 16 especies de blénidos antárticos; posiblemente su función es compensada por diversos cambios anatómicos y fisiológicos junto a la expresión de Cygb en el tejido muscular estriado(Daanea et al., 2020; Garry et al., 1998; Hoffmann et al., 2011; Opazo et al., 2015).

Representó todo un hito en la historia de la biología la determinación de la estructura terciaria de la Mb del cachalote *Physeter catodon* efectuada por Kendrew y col. entre 1957 y 1959, permitiendo el inicio de la interpretación funcional de su estructura(Kendrew, 1963). Esta proteína monomérica globular de vertebrados es expresada principalmente en el citoplasma de los miocitos del corazón y los músculos esqueléticos, donde regula la tensión de oxígeno molecular (P50 entre 0.5 y 1.3 mmHg, valores de n entre 1 y 1.19 en condiciones estándar) y la disponibilidad del monóxido de nitrógeno(Opazo et al., 2015). Aunque existen múltiples factores que regulan su expresión, la hipoxia local del músculo suele ser el principal estímulo de su síntesis(Wright & Davis, 2015).

Los amniotas exhiben una Mb de ~153 aa con una identidad de secuencia promedio del 60% y un peso molecular de ~18 kDa(Suzukia & Imaib, 1998). Representa una molécula elipsoidal cuyas dimensiones son cercanas a 44x44x25 Å, conformada por 8 hélices que varían en extensión de 7 a 26 aa y constituyen un total de 121 aa (designadas de la A hasta la H, a partir del extremo N-terminal) conectadas por 2 giros de hélices (EF y GH) y 5 bucles de 1 a 8 aa. Éstas son mayormente alfas-hélices, con segmentos distorsionados en los extremos de las hélices A, C, E, y G, que forman hélices  $3_{10}$ (Voet & Voet, 2004).

De esta manera, el clásico pliegue de globinas genera un bolsillo hidrofóbico, entre las hélices E y F junto a contactos con las hélices B, C, G, H, CD, y FG, que permiten al grupo hemo (protoporfirina IX enlazada a un átomo central de hierro) unirse de forma no covalente a la Mb. Éste átomo de hierro suele estar en el estado de oxidación Fe(II), unido covalentemente a los cuatro átomos de nitrógeno del grupo hemo y coordinado por la histidina proximal F8. Cuando se une el oxígeno molecular, el átomo de Fe(II) se desplaza unos 0.22 Å del plano del grupo hemo y es coordinado por la molécula de oxígeno que a su vez es coordinada por la histidina distal E7; en este proceso ocurren ligeros cambios estructurales de la globina, pero las formas oxyMb y deoxyMb son prácticamente solapables(Voet & Voet, 2004).

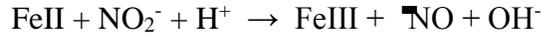
Adicionalmente, la Mb presenta seis bolsillos pequeños, cuatro que pueden asociarse un átomo de Xe (Xe1, Xe2, Xe3, Xe4) y dos bolsillos fantasmas (Ph1, Ph2). A estos espacios vacíos pueden asociarse el oxígeno y el monóxido de carbono, y funcionan como un pasadizo por el que migran desde la superficie de la proteína hasta el bolsillo del grupo hemo(Tomita et al., 2010).

Además del oxígeno molecular la Mb puede asociarse de manera reversible incluso con mayor afinidad a otras moléculas, como el monóxido de carbono, un compuesto altamente tóxico que secuestra el grupo hemo de la Mb, otras globinas y citocromos(Voet & Voet, 2004). La Mb también actúa como enzima, catalizando la dioxigenación del monóxido de nitrógeno, una molécula señalizadora que induce la vaso dilatación de los capilares adyacentes ( $k$  en vertebrados 3-6  $M^{-1}s^{-1}$  en condiciones estándar). Esta reacción depende de la oxidación del átomo de hierro del grupo hemo Fe(II)  $\rightarrow$  Fe(III) +  $e^-$  y la formación de la metMb (incapaz de unirse al oxígeno molecular), que es convertida posteriormente en Mb

por la acción de las enzimas intracelulares metMb reductasas. Así, en condiciones normóxicas se convierte el monóxido de nitrógeno en nitrato:



Pero en condiciones de hipoxia, la Mb produce monóxido de nitrógeno a partir del nitrito:



De forma similar a la reacción anterior, la Mb puede eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS) y participar en otras reacciones de oxidorreducción (Tejero & Gladwin, 2014) como la oxidación del sulfuro de dihidrógeno. Esta misteriosa molécula señalizadora posiblemente funciona como un sensor de oxígeno (Olson et al., 2013), es un subproducto altamente tóxico de las enzimas de la red metabólica del sulfuro derivada de la cisteína y la homocisteína, producido en cantidades considerables sólo bajo condiciones de hipoxia en diversos tejidos. Como muestra la Figura 1, la metMb secuestra esta molécula y la oxida en tiosulfato ( $k$ , en humanos  $1.6 \pm 0.3 \times 10^4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  en condiciones estándar) (Bostelaar et al., 2016).

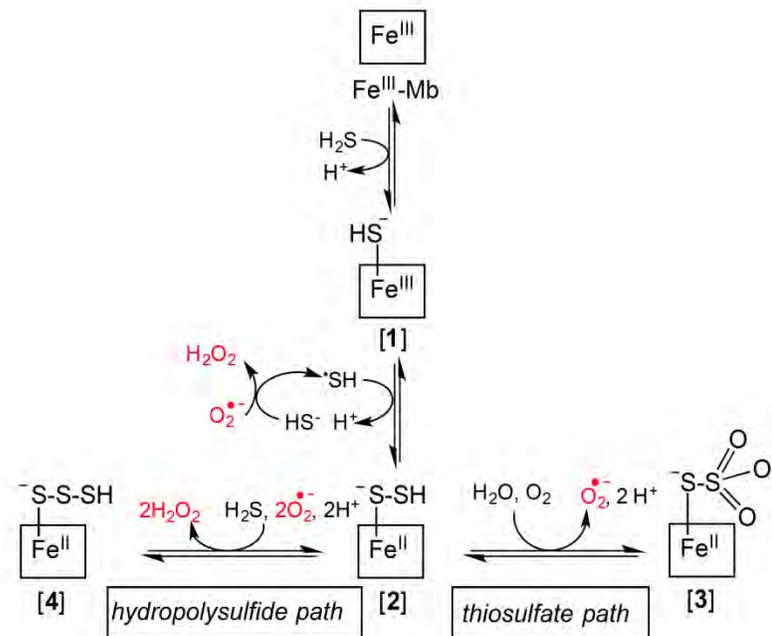


Figura 1. Mecanismo de reacción postulado para la oxidación del sulfuro de dihidrógeno por la Fe<sup>III</sup>-Mb. Se desconoce la estequiometría del oxígeno entre [1], [2], [3], [4] y se omiten estados intermedios por simplicidad (Bostelaar et al., 2016).

Incluso se descubrió que la Mb presenta actividad esterasa, al medir la hidrólisis del P-nitrofenil acetato. Sorprendentemente, ésta se ve aumentada por la glicación de la Mb, la cual incrementa su estabilidad al permitir más zonas de contacto con el agua circundante y parece estar involucrada en las complicaciones fisiopatológicas de las personas con diabetes mellitus (Sen et al., 2007). Por otro lado, se reportó al lactato como un modulador heterotrópico de la Mb del cachalote *P. catodon*, al parecer éste se asocia con más afinidad a la deoxyMb que a la oxyMb, disminuyendo así la afinidad de esta proteína por el oxígeno (Giardina et al., 1996).

En cambio, la modulación de la Mb-SNO en residuos específicos de cisteínas [Cys110 en humanos *Homo sapiens*, Cys107 en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, el salmón del atlántico *Salmo salar* y la Cys10 en el atún de aleta amarilla *Thunnus albacares* (Helbo et al., 2014; Helbo & Fago, 2011; Rayner et al., 2005)] aumenta la afinidad de la Mb por el oxígeno al alterar la estructura terciaria de la misma (Helbo et al., 2014). Las Mb-SNO podrían funcionar como reservorios de monóxido de nitrógeno<sup>31</sup> y estar implicadas en la regulación del estrés oxidativo [ya que estas cisteínas también reaccionan con el peróxido de hidrógeno (Witting et al., 2000)].

También se ha descrito una regulación por parte de la glucosa sobre la actividad catalítica de la Mb; esta interacción estabiliza la asociación de la proteína con el grupo hemo y desestabiliza el resto de la estructura, aumentando su afinidad por el oxígeno y su actividad reductasa de ROS junto al monóxido de nitrógeno (Nasreen et al., 2020). De forma similar, la fructosa y la sacarosa interactúan con la Mb y alteran su actividad (Kundu, et al., 2015). Al mismo tiempo, se han observado interacciones débiles significativas entre esta proteína con la lisozima y la albúmina de suero bovino, pero se desconocen sus efectos sobre la función de la Mb (Kundu, et al., 2015). Y por último, está sujeta a múltiples modificaciones post-transduccionales que también alteran sus propiedades fisicoquímicas (Wang, 2020).

### Buceo en aves y mamíferos

En los músculos esqueléticos de las aves y mamíferos, las fibras oxidativas lentas y las fibras rápidas oxidativas utilizan principalmente las rutas metabólicas aeróbicas de grasas o carbohidratos en la generación de ATP, obteniendo como desecho dióxido de carbono y agua. Durante su reiterada contracción, por debajo de cierta intensidad de ejercicio, no se aprecia un cambio en la composición de los gases ni del pH de la sangre, comparado con el estado de reposo. Pero si se aumenta la intensidad de éste hasta cierto nivel, estas fibras no son capaces de producir ATP a la tasa requerida y las fibras rápidas glicolíticas junto a las fibras rápidas oxidativas, generan ATP de forma anaeróbica a partir de los carbohidratos produciendo lactato (P. Butler, 2004; Wright & Davis, 2015).

El ejercicio anaeróbico no es sostenible y pronto la fatiga inhibe las contracciones de estas fibras. Cuando se experimenta un incremento gradual en la intensidad del ejercicio, el punto en el que aumenta de forma significativa la concentración de lactato en sangre, comparado con el reposo, es conocido como la barrera del lactato. Y en aquellas especies capaces de bucear, se denota al límite de buceo aeróbico (ADL) como el tiempo de inmersión requerido para alcanzar esta barrera, aproximado por el ADL calculado (cADL, reservas de oxígeno divididas por la tasa de consumo del mismo) (P. Butler, 2004; Wright & Davis, 2015).

En el transcurso de una inmersión, sólo está disponible el oxígeno almacenado en el sistema respiratorio, circulatorio y en los músculos esqueléticos. Este varía en función de la especie, con una masa específica de volumen de oxígeno disponible en condiciones estándares en humanos de 20 mL/Kg, 33 mL/Kg en el delfín nariz de botella *Tursiops truncatus*, 97 mL/Kg en los elefantes marinos *Mirounga* spp. y 58 mL/Kg en el pingüino emperador *A. forsteri* (P. Butler, 2004; Wright & Davis, 2015).

Principalmente el oxígeno se almacena en las hemoglobinas y la Mb, donde el sistema circulatorio y locomotor de los mamíferos almacenan entre el 70-95% del oxígeno y en aves, el sistema respiratorio suele almacenar entre el 35-60% del oxígeno, pero en el pingüino emperador *A. forsteri* se estima que el sistema respiratorio, circulatorio y motor, almacenan cerca del 20%, 30% y 50% del oxígeno respectivamente. Además, esta especie presenta las mayores concentraciones de Mb registradas en los músculos pectorales y supracoracoides, con alrededor de 6.4 g de Mb/100 g de músculo; en pingüinos emperador

radores juveniles, el aumento de la masa y la concentración de Mb representan los principales factores que determinan la profundidad y duración del buceo(P. Butler, 2004; Wright & Davis, 2015).

Estos organismos controlan finamente la tasa de consumo de oxígeno durante sus inmersiones, ya sea por medios fisiológicos o de comportamiento. La hipoperfusión hipotermia selectiva de ciertos órganos, la bradicardia de buceo, diversos mecanismos de procesamiento de ROS, la intensidad del nado (especialmente si poseen flotabilidad positiva o negativa), la temperatura del agua, insolación térmica (aire o grasa), presencia de corrientes, procesos digestivos e interacción con otras especies, representan algunos de los factores que regulan la profundidad y duración de una inmersión(P. Butler, 2004; Wright & Davis, 2015).

## Vuelo en aves migratorias de largas distancias

Múltiples factores afectan las capacidades de vuelo de las aves migratorias de altas distancias, e introducen una alta variabilidad en este comportamiento, como el tipo de vuelo, tamaño del ave, forma del ala, potencia del vuelo, reservas energéticas, vientos predominantes, topografía, altitud, entre otros(Newton, 2008). Sin embargo, existen patrones generales que permiten reconocer a especies capaces de realizar vuelos continuos de largas distancias(Berthold et al., 2003).

En el vuelo activo, una actividad costosa que demanda entre 8-30 veces la tasa metabólica basal(P. J. Butler, 1991), la relación entre la velocidad de vuelo y la potencia requerida para sustentarlo presenta una gráfica en forma de U, con una velocidad donde el requerimiento de potencia es mínimo ( $V_{mp}$ )(Newton, 2008). Durante la migración las aves suelen volar entre esta velocidad, la más eficiente energéticamente que otorga mayor tiempo de vuelo y una ligeramente mayor, que permite maximizar la distancia recorrida ( $V_{mr}$ )(Newton, 2008). Esta potencia es provista principalmente por la frecuente contracción de los músculos pectorales, que pueden conformar más del 33% de la masa del ave y están constituidos en su mayoría por fibras oxidativas glicolíticas rápidas altamente vascularizadas, con una alta concentración de mitocondrias de gran tamaño(Berthold, 1996).

Ambas velocidades son proporcionales al cuadrado de la masa del ave ( $V_{mp} \sim Masa^2$  y  $V_{mr} \sim Masa^2$ ). Teóricamente, aves de 10, 20, 100, 1000 y 10000 g presentan promedios de  $V_{mr}$  de 22, 32, 55, 85 y 90 Km/h respectivamente, exhibiendo variaciones debidas a la carga y aspecto del ala junto a diversos elementos de su biología(Newton, 2008). La potencia requerida para volar a  $V_{mr}$  también aumenta en función de la masa del ave:  $P \approx Masa^{1.17}$  (siendo más costosa para aves de gran tamaño debido a su baja tasa metabólica)(Pennycuik, 1989).

Por esta razón, las aves de gran tamaño tienden a volar a una velocidad menor que la  $V_{mr}$  que, junto a su elevada masa restringe la distancia que pueden recorrer durante un vuelo continuo, con registros cercanos a los 1700 Km en cisnes y 3000 Km en gansos(Newton, 2008). Las aves más pequeñas pueden volar a  $V_{mr}$ , pero éstas son tan bajas que restringen la distancia recorrida durante un vuelo continuo, alcanzando máximos entre los 1500-3000 Km(Newton, 2008). Por otro lado, aquellas con tamaños intermedios, capaces de acumular suficientes reservas de grasas, presentan mayores  $V_{mr}$  y realizan desplazamientos máximos continuos entre los 4000 y los 10400 Km(Newton, 2008).

Las aves migratorias de largas distancias mantienen una altitud de vuelo constante (a excepción de la escalada inicial y la precipitación al final del vuelo) que depende de su biología, los vientos predominantes y la topografía(Newton, 2008). Suelen volar de noche, a elevadas altitudes (entre 3-10 Km) ex-

perimentando una reducción en la densidad del aire (alrededor de 10% cada 1000 m de altitud), en la disponibilidad de oxígeno (hipoxia hipobárica), y en la temperatura (7 °C cada 1000 m), junto a un incremento en la V<sub>mr</sub> (5% cada 1000 m) y exposición a vientos favorables de mayor velocidad (Berthold, 1996).

Así, las aves maximizan la velocidad del vuelo al desplazarse a elevadas altitudes, reduciendo el tiempo de vuelo, la interferencia de accidentes topográficos, vientos desfavorables, nubes o lluvia y la exposición a depredadores (Newton, 2008). Se cree que el principal factor que limita esta altitud es la capacidad del ave de extraer el suficiente oxígeno para mantener el vuelo a V<sub>mr</sub>, la cual depende directamente de la Mb, ya que la mayoría del oxígeno consumido es transportado a las mitocondrias de los músculos involucrados en el vuelo, gracias a esta proteína (Berthold, 1996).

## Justificación

Es imperante la necesidad de identificar aquellos factores que influyen la probabilidad de que ocurra un evento de evolución convergente. Saber cómo la historia natural de un organismo junto a diversas presiones selectivas, demográficas y genéticas lo predisponen a evolucionar de cierta forma, permitirá elaborar una teoría evolutiva más general con mayor poder predictivo (Rosenblum et al., 2014). Así se podrá reconstruir la contingente evolución de la vida y comprender por qué en algunas ocasiones ésta se repite.

En particular, investigar la evolución de la mioglobina bajo este enfoque nos plantea varias interrogantes: ¿de qué forma lidia el metabolismo aeróbico de los vertebrados mandibulados con condiciones de hipoxia?, ¿serán similares las estrategias, a pesar de los estilos de vida tan diferentes que presentan estas especies?, ¿cuál es el rol que desempeña la Mb en la fisiología de estos organismos? Estas preguntas pueden empezar a ser resueltas al identificar sustituciones convergentes asociadas a las diversas especies que experimentan condiciones de hipoxia.

En el futuro, es posible que este conocimiento tenga diversas aplicaciones biotecnológicas en nuestra sociedad, relacionadas con avances médicos en el tratamiento de la hipoxia, y varias aplicaciones en la industria. Entre estas últimas, podrían incluirse el mejoramiento de la calidad de la carne comercializada (color, sabor, textura, duración) (Suman & Joseph, 2013), la elaboración de sensores de compuestos (ej. 2,4-diclofenol, sulfuro de dihidrógeno, monóxido nitrógeno, cianuro y asidas) (Sun et al., 2012), la catalización de diversas reacciones, cambiando el átomo de hierro por otros metales de transición (Sreenilayam et al., 2017), la degradación de colorantes industriales (Zhang et al., 2019), entre otras.

## Hipótesis

Dado que la falta de oxígeno representa un considerable estresor en los organismos que dependen significativamente del metabolismo aeróbico, en el transcurso de la evolución de aquellas especies de aves sujetas a una exposición prolongada a condiciones de hipoxia, se han acumulado sustituciones específicas en la mioglobina que modifican su carga neta, su estabilidad o su afinidad por los sustratos.

# Objetivos

## General

Identificar sustituciones convergentes a nivel de aa que provocan variaciones específicas en las propiedades fisicoquímicas en la Mb, en aves que regularmente experimentan hipoxia por migración o buceo.

## Específicos

1. Evaluar la asociación entre la carga neta de la Mb y los estilos de vida de estas aves.
2. Señalar posibles convergencias a nivel de aa en la Mb de aves que experimentan hipoxia junto a sus consecuencias funcionales.
3. Comparar, entre estas aves, la afinidad de su Mb por el grupo hemo, el oxígeno, sulfuro de dihidrógeno, glucosa y lactato.
4. Describir las tasas dN/dS en los distintos codones de la mb.

www.bdigital.ula.ve

## Metodología

### Recolección y análisis de las secuencias de mioglobina

Se recolectaron todas las secuencias disponibles tanto del gen como la estructura primaria de la mioglobina de aves en Uniprot y el NCBI (NCBI Resource Coordinators, 2018; The UniProt Consortium, 2020). Estas últimas fueron alineadas con el algoritmo MAFFT (Kato et al., 2002). Como este alineamiento presentaba un reducido número de aves migratorias de largas distancias y aves buceadoras, se realizó una búsqueda del gen de la mb en aquellas especies cuyo genoma está disponible pero no anotado, efectuando un tblastn contra el genoma del ave, usando como cebo la proteína de la especie más cercanamente relacionada posible (Altschul et al., 1997; NCBI Resource Coordinators, 2018). Se extrajo el segmento del genoma que presentó el *hit* con menor valor E. Posteriormente, con GeneWise, se modeló el locus de la Mb basándose en un modelo oculto de Markov elaborado con el alineamiento múltiple de la proteína y se extrajeron las secuencias codificantes del gen (Birney & Clamp, 2004).

Éstas fueron alineadas por medio del algoritmo de TranslatorX, que utiliza el alineamiento múltiple de la proteína para guiar el alineamiento de las secuencias codificantes (Abascal et al., 2010), que posteriormente fueron implementadas en la reconstrucción del árbol filogenético. En los análisis subsecuentes se seleccionaron las secuencias de especies migratorias de largas distancias [definidas como tal por la base de datos AVONET (Tobias, 2022)] y de las especies más afines a éstas (hasta nivel de familia)

junto a un número igual de especies residentes de tierras bajas tropicales escogidas de forma aleatoria. Además del águila real *A. chrysaetos*, la gallina *Gallus gallus*, y aves buceadoras, se añadieron las secuencias disponibles de mamíferos buceadores, el aligátor del Yangtsé *Alligator sinensis*, tortugas (Testudines), lagartos escamados (Squamata) y el humano *H. sapiens*(NCBI Resource Coordinators, 2018).

Con ModelTest-NG se determinó el modelo de sustitución de nucleótidos adecuado para estas secuencias (Darriba et al., 2020) y los análisis filogenéticos se elaboraron mediante métodos de máxima verosimilitud restringida corridos en RaxML-NG(Kozlov et al., 2019), comparando un árbol elaborado sin restricciones topológicas, un segundo árbol construido con restricciones hasta nivel de órdenes y un tercero hasta nivel de familias. Estos últimos se basaron en el árbol filogenético más reciente reportado para estas especies(Kuhl et al., 2020).

### Modelado de la estructura terciaria de la Mb y su carga neta

Luego se elaboraron modelos basados en homología de la estructura terciaria de las proteínas, haciendo uso del servidor SwissModel(Waterhouse et al., 2018). Éstas fueron refinadas con el servicio Galaxy-Refine2 hasta minimizar la energía Galaxy y maximizar el porcentaje de ángulos dentro de las regiones favorecidas de Ramachandran(Lee et al., 2019).

Con el fin de evaluar la asociación entre la carga neta de la Mb y su asociación con los estilos de vida de estas especies, junto a otras variables ecomorfológicas, las estructuras resultantes fueron utilizadas para predecir su carga neta de superficie usando el algoritmo de Solvatación Adaptativa de Poisson-Boltzman del servidor APBS(Jurrus et al., 2018), y el programa PROPKA(Olsson et al., 2011), para asignar los estados de protonación de los aa a diferentes pH bajo el campo de fuerza PARSE(Jurrus et al., 2018).

Luego se exploró la asociación entre el estado migratorio, la capacidad de buceo, la masa promedio de estas especies, la latitud máxima de su distribución y el índice mano-ala de Friedrich Kipp(Tobias, 2022) con la carga neta de la Mb, a través de la elaboración de Modelos Lineales Generalizados Mixtos Filogenéticos (PMGLS, por sus siglas en inglés) junto a sus respectivas pruebas de hipótesis, llevadas a cabo con el paquete *ape* en R(Orme et al., 2013; Revell, 2012).

Conociendo la carga neta de la Mb junto otras variables ecomorfológicas de las especies evaluadas, se reconstruyeron sus estados ancestrales. Ajustando distintos modelos macroevolutivos a los árboles previamente elaborados, con el paquete *phytools* en R(Revell, 2012).

### Identificación de sustituciones convergentes

Para identificar posibles convergencias a nivel de aa, se implementó el programa PCOC identificando sustituciones convergentes asociadas a las migraciones de largas distancias o la capacidad de buceo. Este programa usó los diferentes árboles filogenéticos y las secuencias de proteínas para ajustar dos modelos de evolución de aa, uno convergente y otro ancestral, reportando cuál modelo de evolución molecular se ajustaba mejor a cada aa(Rey et al., 2018).

### Estimación de la afinidad de la Mb por distintos ligandos

Con el objetivo de comparar las diferentes afinidades por los ligandos de la Mb, la estructura terciaria fue usada para realizar acoplamiento molecular (*docking*) estimando la afinidad de la Mb (energía libre

de la configuración de la interacción, en Kcal/mol) por el grupo hemo, oxígeno, sulfuro de dihidrógeno, monóxido de carbono, la glucosa y la lactosa, en Autodock-Vina(Trott & Olson, 2010). También se elaboraron Modelos PMGLS usando como variables predictivas las características ecomorfológicas de las especies evaluadas y propiedades fisicoquímicas de la Mb(Revell, 2012).

### Pruebas de neutralidad

Por último, se utilizó el alineamiento múltiple de las secuencias codificantes para probar rastros esporádicos de selección positiva y negativa a nivel de sitio, en función de su ajuste a MEME y FUBAR, efectuados en el servidor Datamonkey(Weaver et al., 2018).

## **Resultados**

### Recolección y análisis de las secuencias de mioglobina

Se obtuvo tanto el gen anotado como la proteína de 287 especies de aves, entre Uniprot y el NCBI incluyendo el humano *H. sapiens* y el aligátor del Yangtsé *A. sinensis* (ver anexo). De esta última base de datos, se minaron los genomas ensamblados de otras 202 especies de aves (ver anexo), donde resalta la mb del extinto pequeño moa de arbusto *Anomalopteryx didiformis*. En cada búsqueda del tblastn, el primer hit (ordenados de forma ascendente por el menor valor E) presentaba una cobertura del 100% y un valor E promedio de  $4 \times 10^{-42}$   $sd=0.02$ . La segunda posición el cebo alineaba con la citoglobina presentando una menor cobertura. En las siguientes posiciones, se encontraban otros genes miembros de la familia de las globinas con menor identidad y cobertura.

Después de modelar el locus en GeneWise, usando el alineamiento múltiple de las secuencias de aa, pueden notar en las Figuras 2-7 la estructura de la mb.

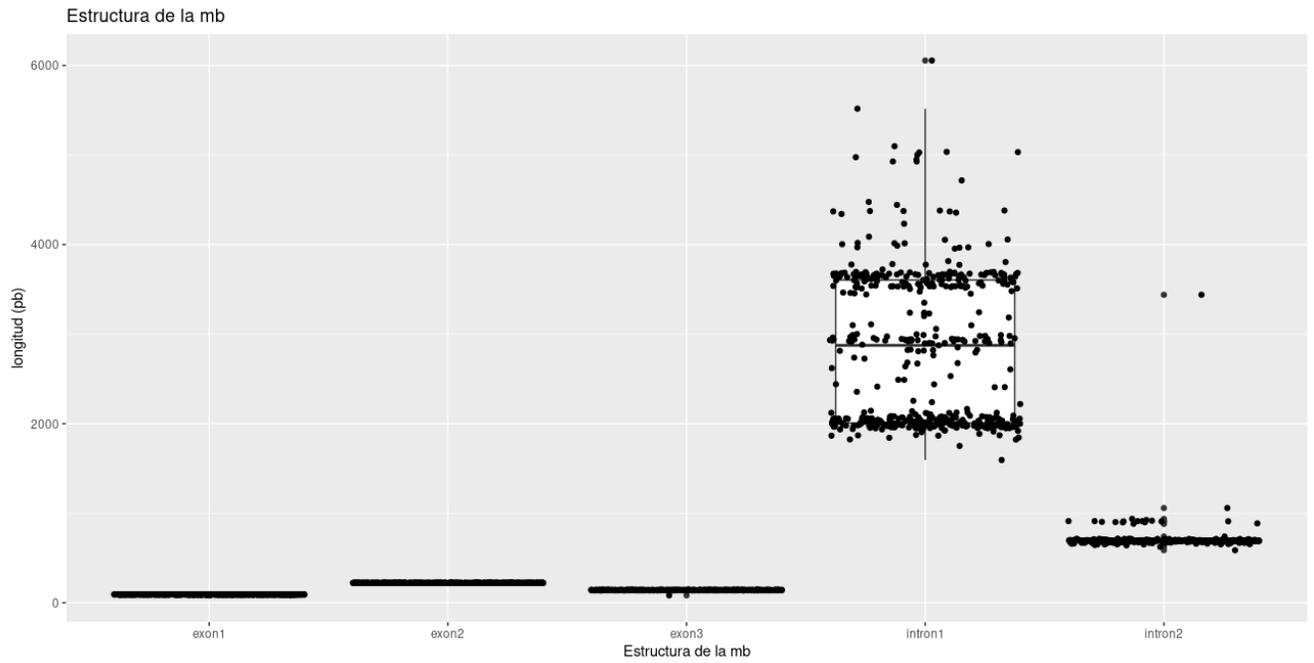


Figura 2. Longitud de la mb de las especies de aves examinadas.

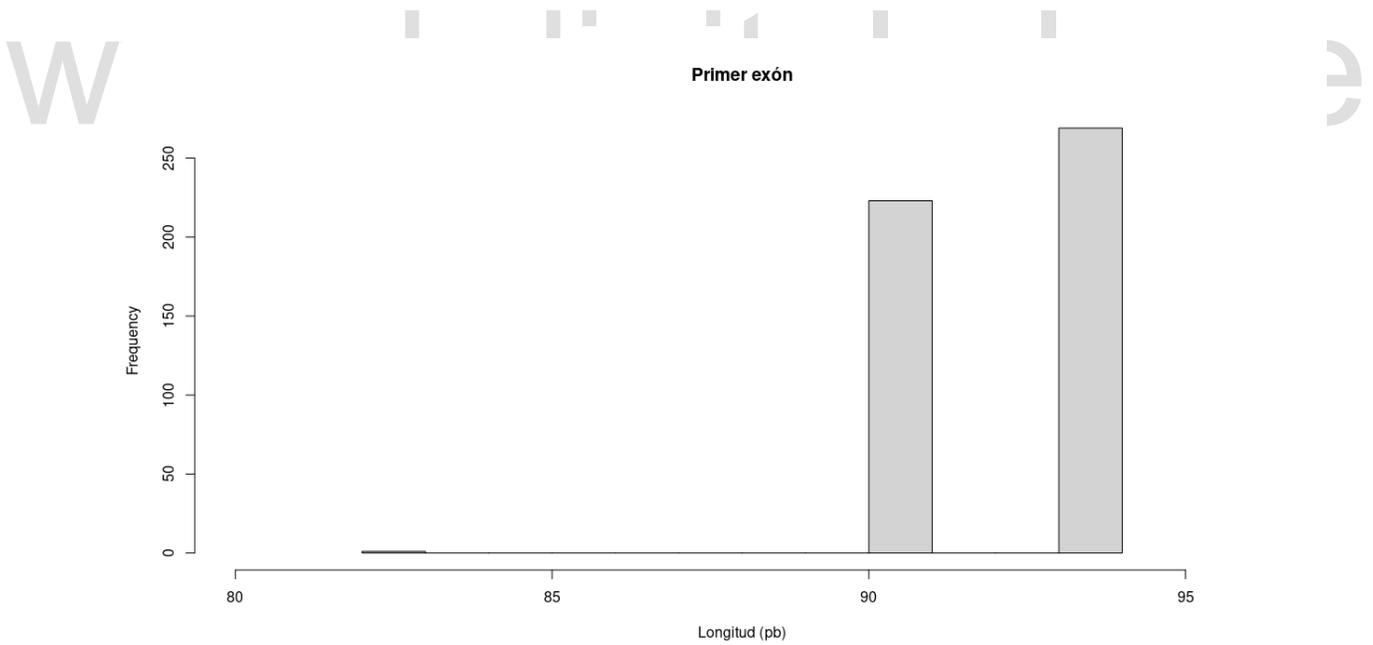


Figura 3. Longitud del primer exón de la mb de las especies de aves evaluadas, entre 82, 91 y 94 pb.

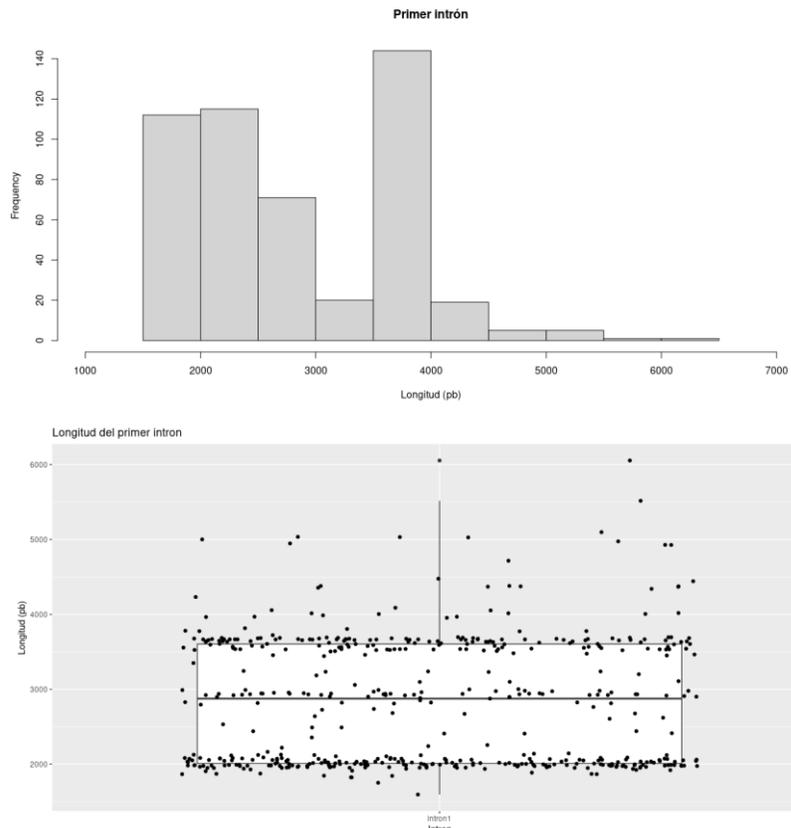


Figura 4. Longitud del primer intrón de la mb de las especies de aves evaluadas.

www.bdigital.ula.ve

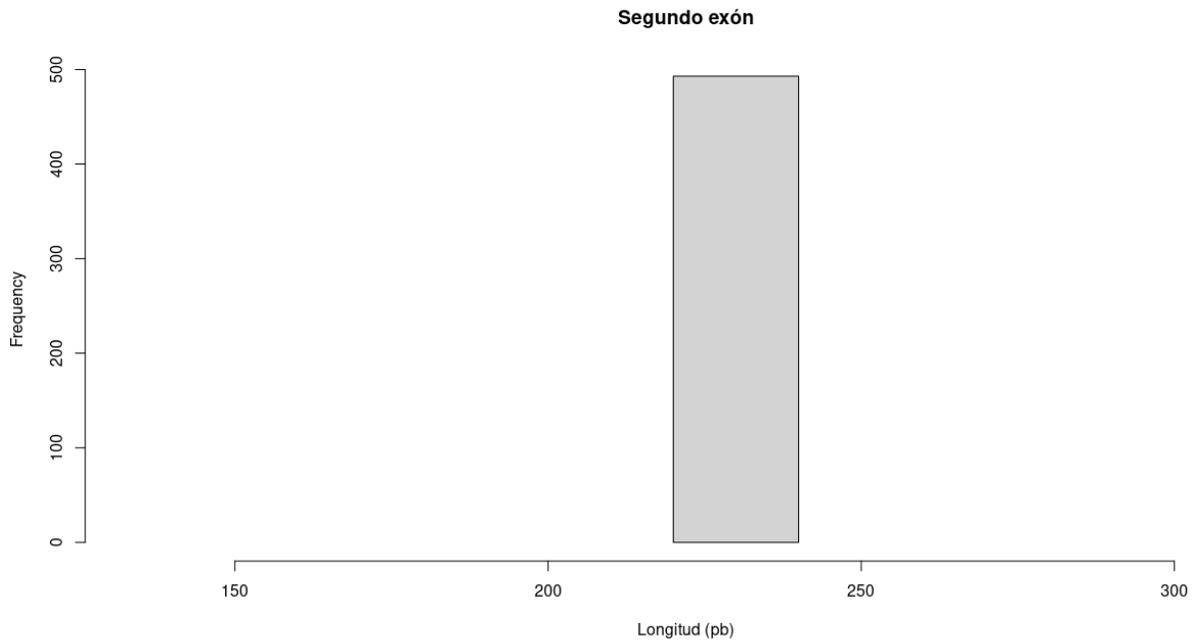


Figura 5. Longitud del segundo exón de la mb, de las especies de aves examinadas, con 222 pb.

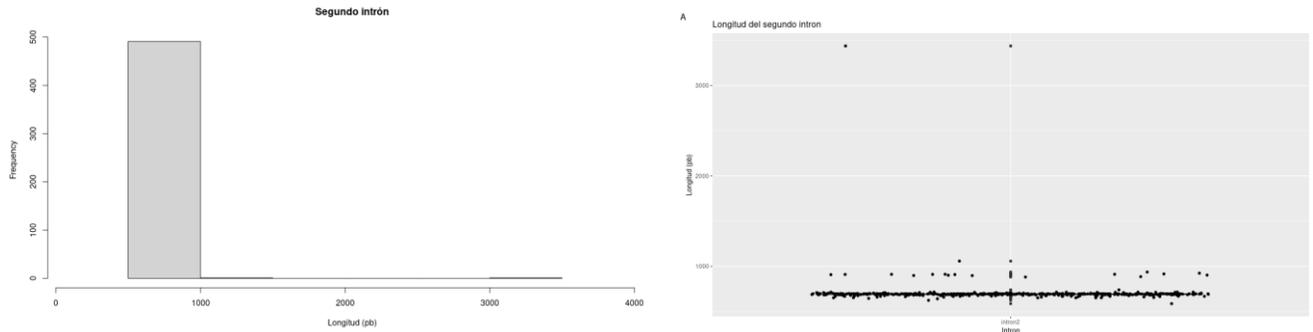


Figura 6. Longitud del segundo intrón de la mb de las especies de aves evaluadas.

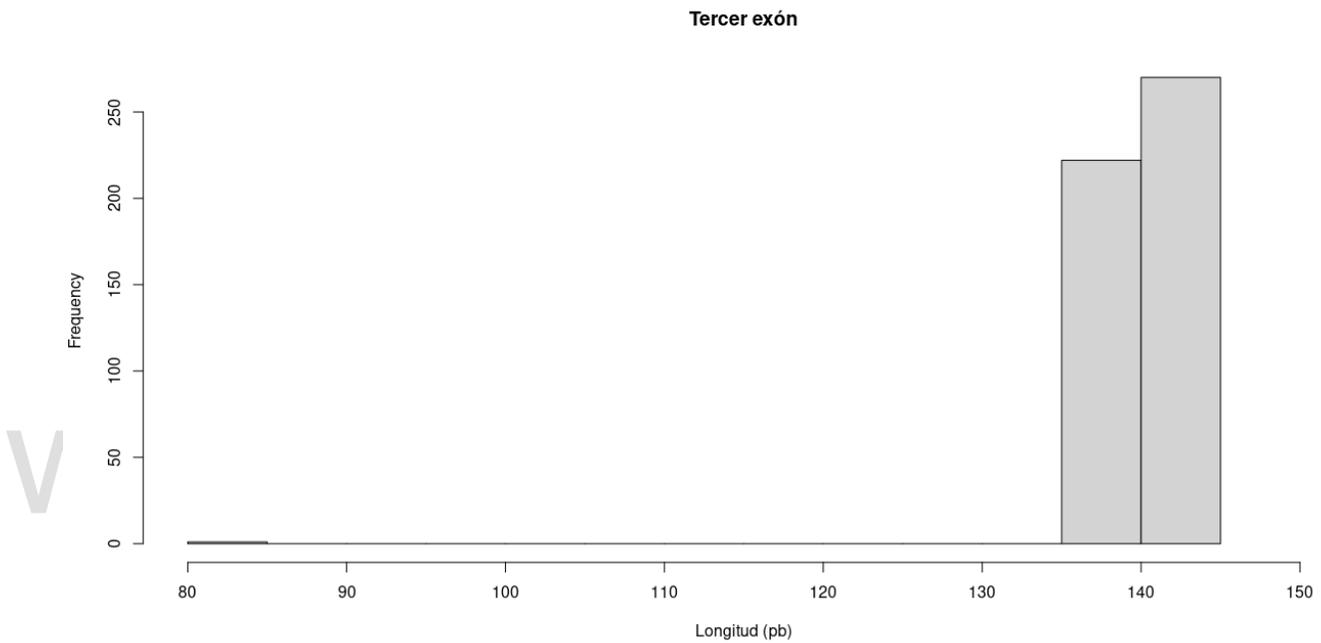


Figura 7. Longitud del tercer exón de la mb de las especies de aves evaluadas, que tiene entre 83, 140 y 143 pb.

La orientación del gen variaba considerablemente incluso entre especies del mismo género, y a nivel cromosómico la mb pudo encontrarse en los pocos genomas de aves ensamblados a este nivel en el cromosoma 1, 3, 4, 5, 15 o 17.

Al ensamblar la secuencia codificante de este gen y hacer el alineamiento con TranslatorX, se observó una secuencia altamente conservada de 462 pb en casi todas las especies (incluyendo el codón de inicio de la metionina y excluyendo el codón stop). Comparado con la secuencia del gallo *G. gallus*, el resto de la mb de las aves presentaba una similitud entre el 88% y el 96%, En cambio, entre el humano *H. sapiens* y el *G. gallus* hay una similitud del 74% y entre el aligátor del Yangtsé *A. sinensis* y el *G. gallus* existe una similitud del 77%.

El kiwi marrón de la isla norte, *Apteryx mantelli*, posee la misma secuencia codificante que el kiwi pardo de Okarito *A. rowi* y el kiwi moteado mayor *A. haastii*. Lo mismo ocurre entre el tinamú ornato *Nothoprocta ornata* y la perdiz chilena *N. perdicaria*, entre el cisne negro de Australia *Cygnus atratus* y el cisne mudo *C. olor*, junto al cisne trompetero *C. cygnus*, entre los pingüinos crestados evaluados *Eudyptes*, a excepción del pingüino crestado de las antípodas *Eudyptes sclateri*, entre el pingüino enano de alas blancas *Eudyptula albosignata* y el pingüino enano de Nueva Zelanda *Eudyptula novaehollandiae*, junto al pingüino de humboldt *Spheniscus humboldti* y el pingüino de magallanes *S. magellanicus*. También se observa la similaridad entre la gaviota tridáctila *Rissa tridactyla* y la gaviota capuchina *Chroicocephalus maculipennis*, entre la lavandera blanca *Motacilla alba* y la lavandera de chukotka *M. tschutschensis*, y finalmente, entre el cormorán neotropical *Phalacrocorax brasilianus* y el cormorán crestado *Phalacrocorax auritus*.

A nivel de proteína, la Mb es aún más conservada, donde varias especies presentan la misma estructura primaria. De igual forma, al compararlas con la Mb del gallo *G. gallus* y el resto de las aves, la secuencia de aa posee una similaridad entre el 84% y el 100%. Los menores valores de similaridad los poseen los pingüinos (Sphenisciformes) y el mayor valor es presentado por el pavo salvaje *Meleagris gallopavo*. La Mb humana *H. sapiens* y del gallo *G. gallus* exhiben una similaridad del 77%, y la Mb del aligátor del Yangtsé *A. sinensis* y el gallo *G. gallus* poseen una similaridad de 71%. Todas estas especies conservan 54 de los 153 aa (Figura 8), excluyendo la metionina iniciadora.

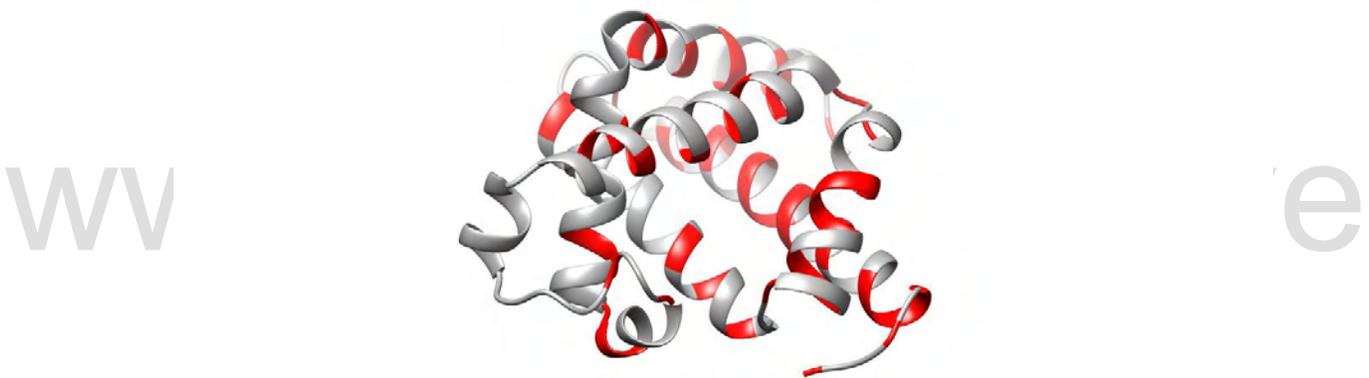


Figura 8. Estructura terciaria consenso de las Mbs. En rojo, los sitios conservados en las Mbs evaluadas. Sitios: L2, E6, W7, V10, L11, W14, K16, E18, G25, R31, L32, H36, P37, E38, F43, F46, K62, H64, G65, V68, L72, G73, L76, K79, G80, H82, K87, P88, L89, A90, H93, A94, H97, K102, E105, I107, K118, F123, G124, Q128, A130, M131, A134, L135, E136, F138, R139, D141, M142, Y146, K147, E148, G150, y G153.

Aquellas especies del género *Falco* (*F. cherrug*, *F. naumanni*, *F. peregrinus*, *F. rusticolus* y *F. tinnunculus*) y el alcatraz enmascarado *Sula dactylatra*, presentan una delección en la posición del aa 121 (GH3).

Por otro lado, las únicas aves cuya Mb tiene cisteína son los pingüinos (Sphenisciformes), los ñandúes *Rhea*, los mosquiteros (Phylloscopidae) y el zambullidor colimbo chico *Gavia stellata* (Figura 9 y Tabla 1).

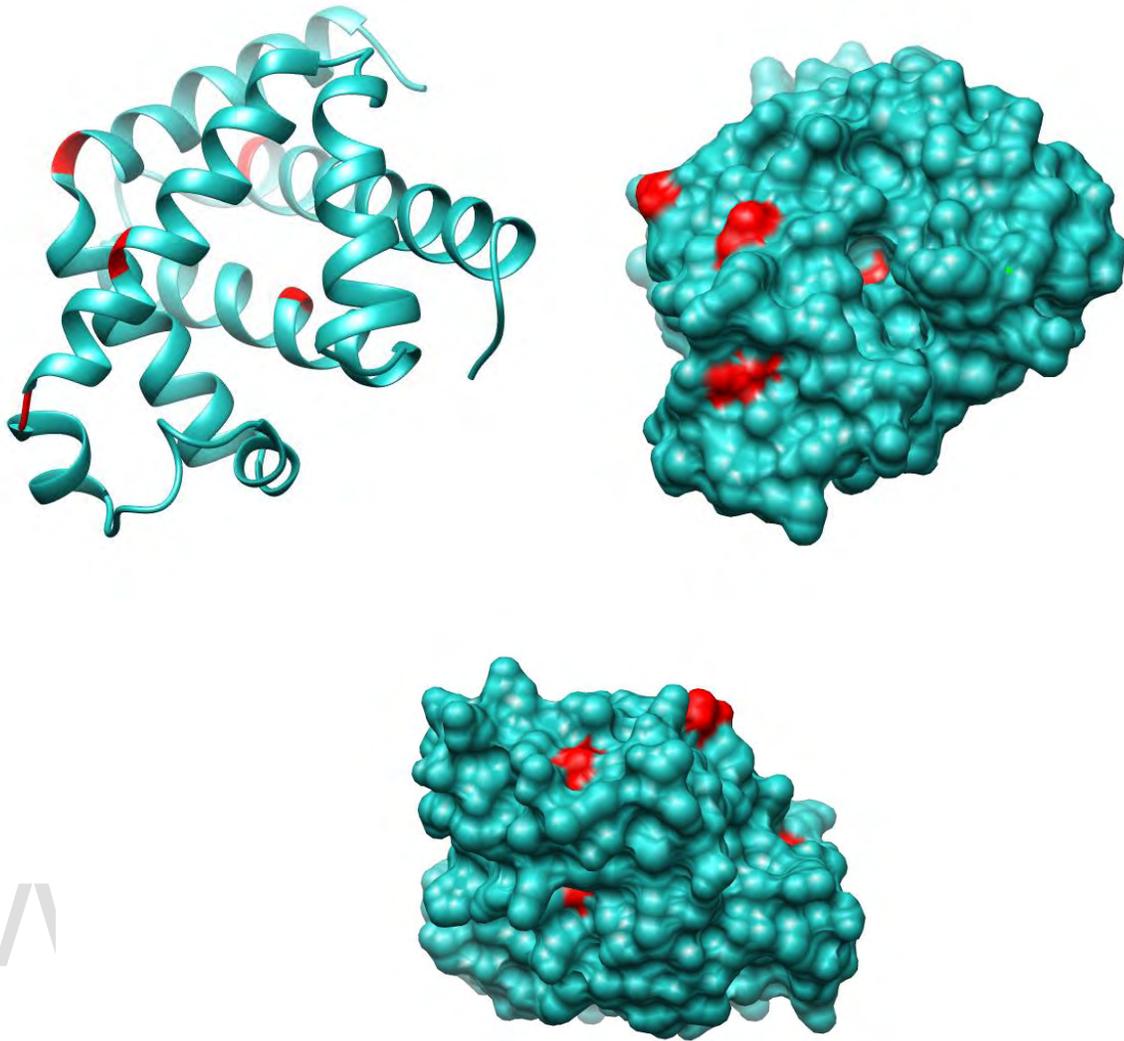


Figura 9. Diferentes vistas y representaciones de la estructura terciaria de la Mb consenso de las aves que presentan residuos de cisteína, señaladas en color rojo.

Tabla 1. Posiciones de los residuos de cisteína en la Mb de aves. El 0 representa la ausencia de dicha cisteína en determinado sitio y el 1 su respectiva presencia.

Taxa	Posición				
	C19	C58	C66	C108	C127
<i>Aptenodytes patagonicus</i>	1	0	0	1	1
<i>Aptenodytes forsteri</i>	0	0	0	1	1
<i>Megadyptes antipodes</i>	0	1	0	1	1
<i>Eudyptes</i> spp.	0	1	0	1	1
<i>Pygoscelis</i> spp.	0	0	0	1	0
<i>Spheniscus</i> spp.	0	1	0	0	1
<i>Eudyptula</i> spp.	0	1	0	0	1
<i>Gavia stellata</i>	0	0	1	0	0
<i>Phylloscopus whistleri</i>	0	1	1	0	0
<i>Phylloscopus</i> spp.	0	0	1	0	0
<i>Rhea</i> spp.	0	0	0	1	0

Del NCBI se añadieron en los siguientes procedimientos las secuencias codificantes y sus respectivas traducciones de la mioglobina de 8 especies de cetáceos, 6 de pinnípedos, 15 de lagartos escamados y 10 de tortugas (ver anexo), donde las secuencias codificantes de la mb de las especies del género *Mirounga* y *Phoca*, resultaron ser idénticos.

De las 489 especies de aves, se seleccionó la mb de 43 especies migratorias de largas distancias (siguiendo la clasificación de AVONET) junto a todas las secuencias disponibles de especies de las familias de éstas, todas las especies capaces de bucear (aquellas que realizan trabajo al sumergir la totalidad de su cuerpo en búsqueda de alimento) y todas los paleognatos disponibles. Después, se añadió la mb de un número igual de especies tropicales de tierras bajas seleccionadas de forma aleatoria (38/41 órdenes actuales, donde 133 especies son aves residentes y 48 especies son aves parcialmente migratorias). En total, se seleccionaron 265 especies si incluimos las tortugas, el aligátor del Yangtsé, los reptiles escamosos y los mamíferos mencionados anteriormente (ver anexo).

El mejor modelo de evolución de estas secuencias fue evaluado con el programa ModelTest-NG, que comparó el ajuste de 88 modelos de evolución de ADN. Según el Criterio de Información de Akaike, el modelo de evolución de Tiempo Reversible Generalizado con sitios constantes y 4 tasas de sustitución estimadas por la aproximación gamma (GTR+I+G4), resultó ser el más adecuado.

Este modelo fue utilizado para reconstruir la filogenia por métodos de máxima verosimilitud restringidos en RaxML-NG, primero sin restricciones topológicas (Figura 10) y luego con restricciones a nivel de Orden y Familia. En cada caso, se seleccionó el mejor árbol (ninguno pertenecía a una terraza filogenética) y sobre éste, se dispuso el soporte en las ramas de los 1000 bootstraps. Es notable que los tres árboles presentan muy pocos cambios, incluso presentan varias ramas cuyas longitudes son cercanas a cero (ej. la mb del Kiwi marrón de la isla norte *A. mantelli* y el kiwi moteado menor *A. oweni* sólo se diferencian por una transición de G→A en la pb 78) y algunas politomías. También, las

ramas más cercanas a las hojas (equivalente a Familias) exhiben un gran soporte con un bootstrap de felsestein mayor a 90, en cambio, las ramas profundas presentan muy poco soporte.

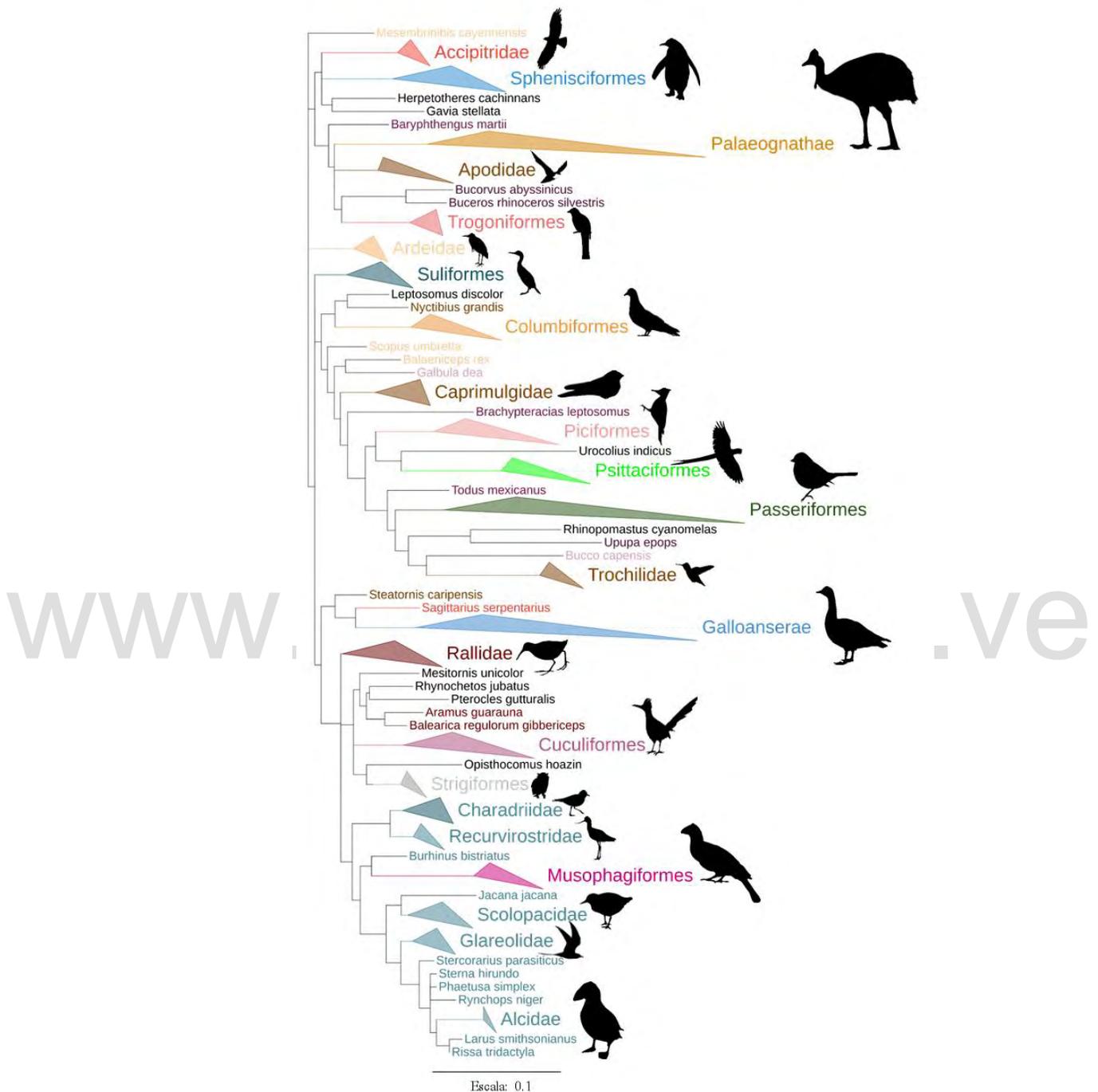


Figura 10. Mejor árbol filogenético reconstruido en RaxML sin restricciones topológicas (mostrando sólo la clase Aves). Se colapsaron aquellos clados que concuerdan con las hipótesis filogenéticas actuales (que exhiben un elevado soporte >0.80) junto a sus siluetas, y no se muestran los bootstraps de los nodos a este nivel entre los clados, debido a su bajo soporte. Color negro: órdenes con sólo una especie evaluada.

## Modelado de la estructura terciaria de la Mb y su carga neta

Se modeló por homología la estructura terciaria de la Mb de las especies presentes en los árboles filogenéticos en el servidor de Swiss-Model con los parámetros estándares (eliminando la metionina iniciadora). Este utilizó como “molde” la difracción de rayos-X de alta resolución (1.75Å) de la Mb del cerdo *Sus scrofa*, asociada al grupo hemo y un ion sulfato, dilucidada por Oldfield et al. en 1992. Presentaba una cobertura del 100% de la estructura primaria y una similaridad promedio con las demás secuencias del 82% ds=4%.

De esta manera, se obtuvieron modelos con un puntaje QMEANDisCo promedio de 0.82 sd=0.01. Esta función (rango [0-1], siendo 1 el óptimo) estima la calidad del modelo a nivel global y por sitio, ya que representa la desviación estándar entre el QMEANDisCo global y la estimación del IDDT (el rango de posiciones que puede adoptar un átomo junto al error del mismo), en cada sitio. Todos los modelos elaborados mostraban la conspicua estructura de la Mb y solo presentaban ligeras distorsiones en los extremos N-terminal y C-terminal junto al giro EF.

Se nota en la Figura 11, que nuestro modelo de la Mb humana es prácticamente solapable con las estructuras de referencia de Swiss-Model y AlphaFold, difiriendo mayormente en el extremo C-terminal. El grupo hemo está exactamente en la misma posición en las tres estructuras terciarias.

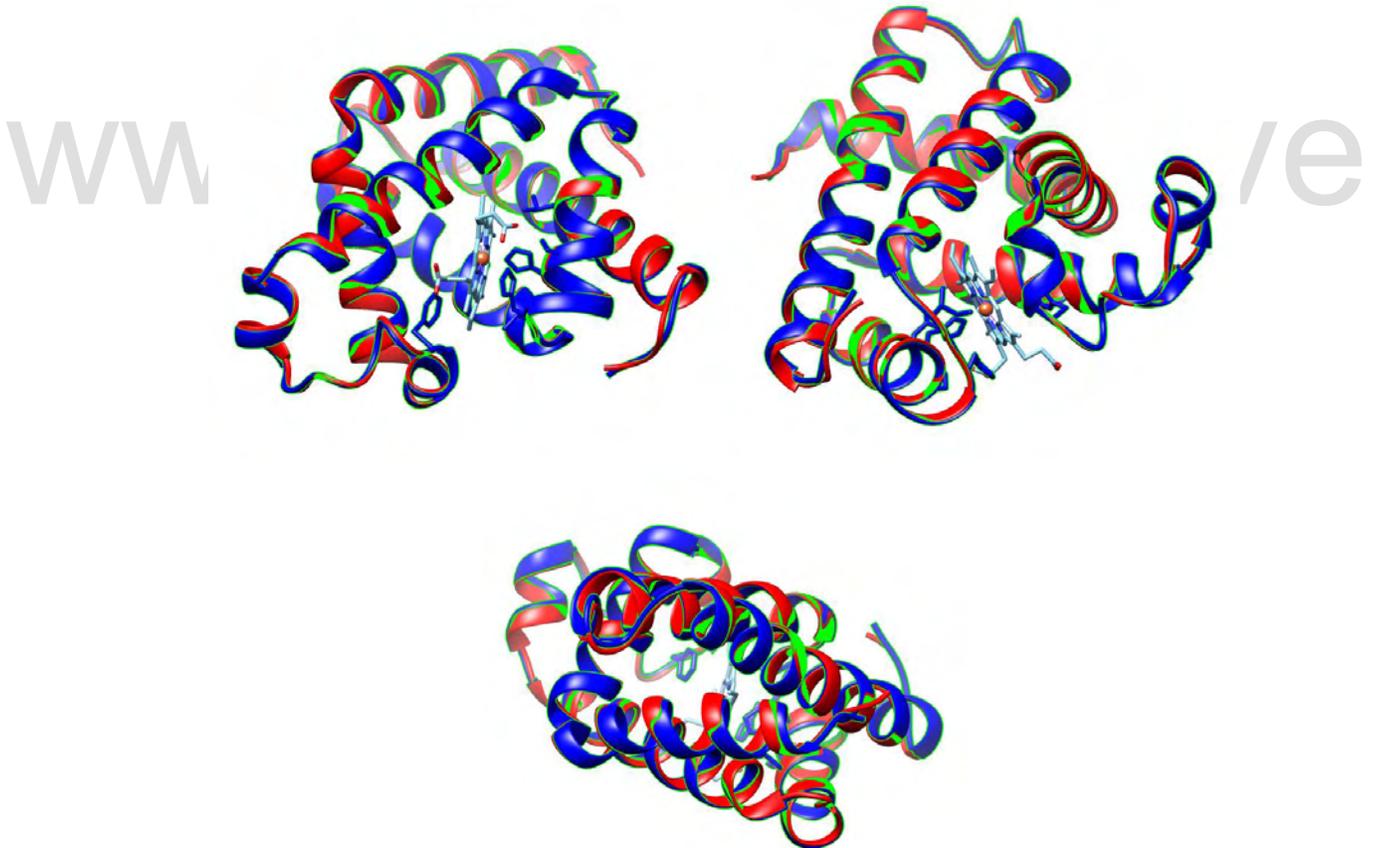


Figura 11. Solapamiento de la estructura terciaria de nuestro modelo Mb Humana *H. sapiens* (Amarillo) con el modelo de referencia de Swiss-Model P02144 (azul) y AlphaFold AF-P02144-F1 (rojo).

En la Mb de aves, el modelo no pudo retener el grupo hemo, ya que los sitios donde éste interactúa directamente, no están conservados con la Mb del cerdo *S. scrofa*.

Luego, se refinaron los modelos de manera reiterada en el servidor GalaxyRefine2 hasta que se estabilizara el número de sitios favorecidos en el cuadro de Ramachandran y se minimizara la energía libre de la función GALAXY (generalmente un modelo fue refinado en tres o cuatro ocasiones). Por ejemplo, después del tercer refinado, la estructura terciaria de la Mb del turaco crestirrojo *Tauraco erythrolophus* presentaba el 98.56% de los sitios favorecidos en el cuadro de Ramachandran, con sólo 13 malos ángulos de 1658, este cuadro exhibe los grados de torsión existentes entre los enlaces del C $\alpha$ -N ( $\phi$ ) y C $\alpha$ -C ( $\psi$ ), mostrando las regiones “normalmente permitidas” que representan conformaciones favorecidas estéricamente por sus distancias de van der Waals. En verde oscuro, los ángulos favorecidos y en verde claro sus límites. Se espera encontrar la mayoría de los ángulos de la estructura terciaria de una proteína (los puntos azules) dentro de las regiones permitidas (Figura 12).

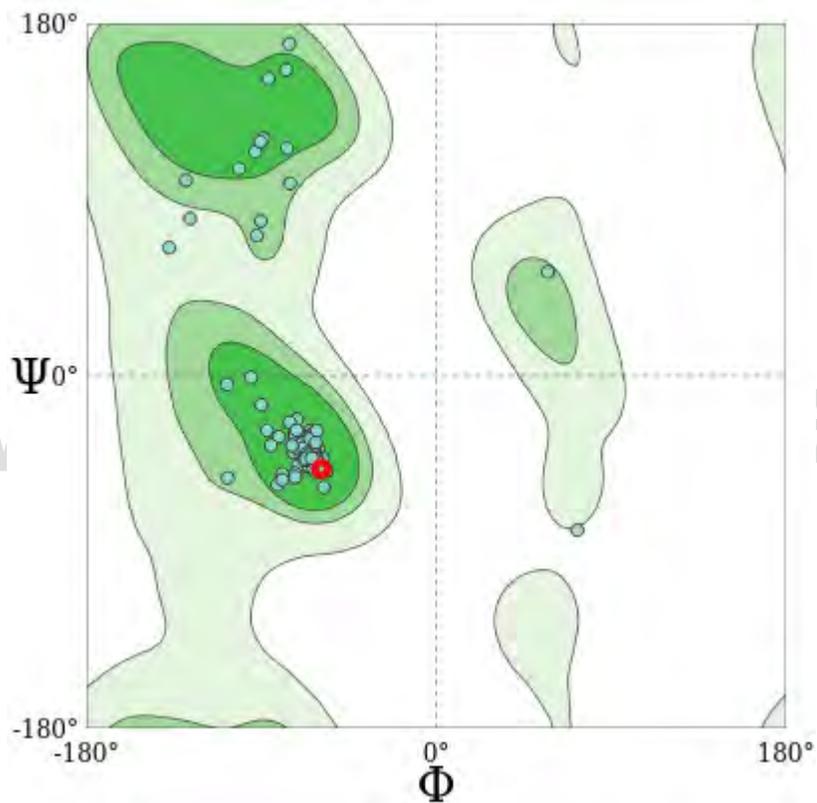


Figura 12. Cuadro de Ramachandran de la Mb refinada del turaco crestirrojo *T. erythrolophus*.

Estos modelos de la apoMb de las 265 especies, fueron utilizados para estimar la carga neta de la proteína plegada, su energía de plegamiento y afinidad por ciertos sustratos en cada especie.

Con el programa PDB2PQR de APBS, usando los parámetros estándares y PROPKA3 para determinar los estados de protonación de los aa bajo el campo de fuerza PARSE, se estimó la carga neta de cada apoMb por medio de la resolución numérica de la ecuación de Poisson-Boltzman que relaciona el potencial eléctrico de la densidad de carga de la molécula con la distribución probabilística de Boltzman al considerar varios microestados en los que pueden configurarse los iones en una solución acuosa; además, se estima la energía de plegamiento y punto isoelectrico de las mismas a pH 4,5,6,7,8

y 9 con fines comparativos. Las apoMbs, presentaron un punto isoelectrico entre 6.33 y 9.71. Por lo tanto, a pH menores de 7, la carga de la mioglobina suele aumentar y a pH superiores a 8, suele disminuir.

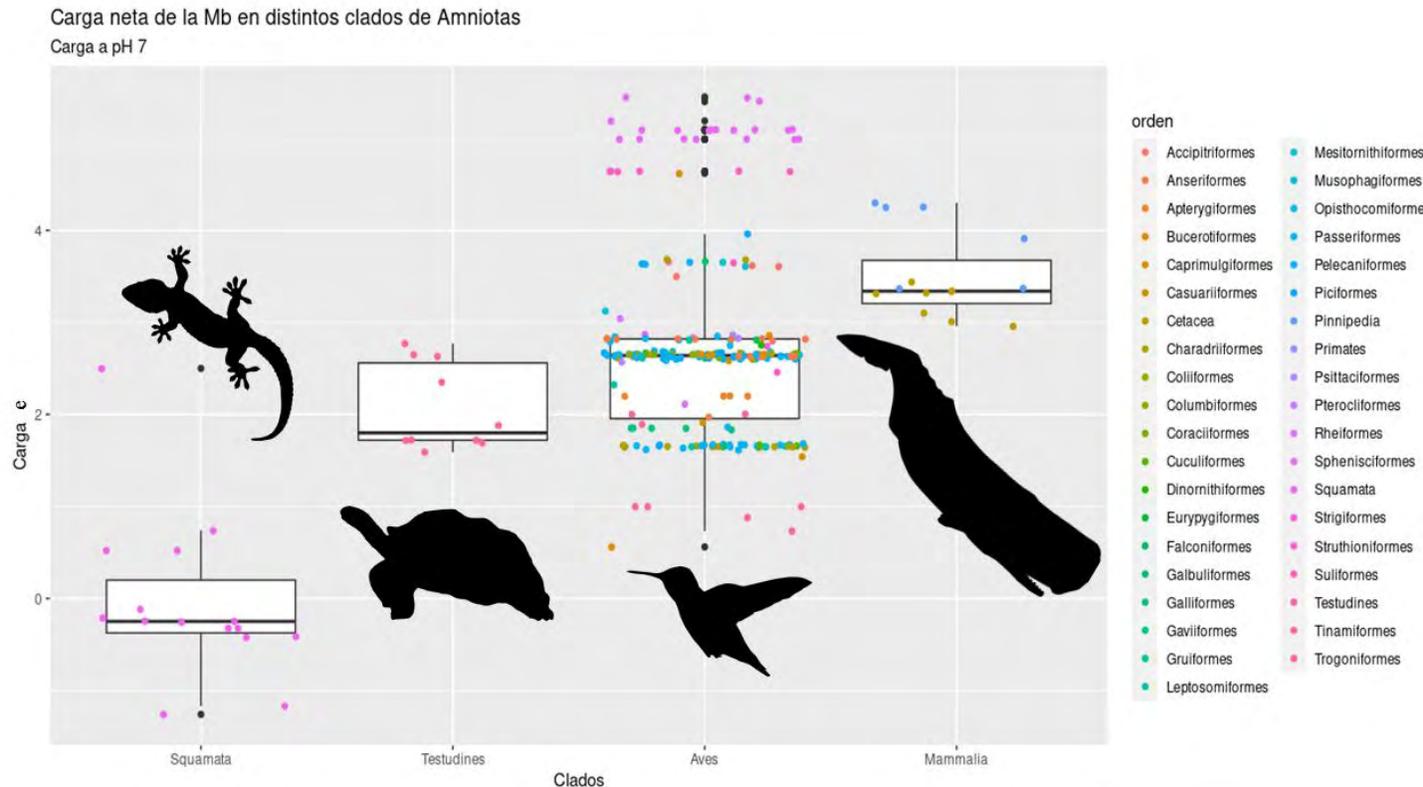


Figura 13. Carga neta de la Mb a pH 7 en distintos clados de Amniotas. Los lagartos escamados exhiben las Mbs de menor carga (hasta negativa), seguidos por las tortugas, las aves (los pingüinos, cotúas y cormoranes presentan los mayores valores de todos los vertebrados), cetáceos y pinnípedos.

Como puede observarse en la Figura 13, de los clados evaluados, el único que presenta especies con Mb cargadas de forma negativa a pH 7, son los reptiles escamados (Squamata), con el mínimo valor exhibido por el crótalo moteado *Protophrops mucrosquamatus*, con una carga de -1.26 e; el máximo valor lo exhibe la Mb del *Gekko japonicus*, con 2.50 e. Sin embargo, la mayoría de especies de este clado presenta valores cercanos a cero.

La Mb de las tortugas (Testudines) presenta una carga mediana menor que las aves y los mamíferos. El menor valor, de 1.59 e, lo muestra la tortuga gigante de pinta *Chelonoidis abingdonii*, una especie extinta que habitaba la isla de la Pinta en el archipiélago de las Galápagos y el último individuo, fue el Solitario George. En cambio, la mayor carga (2.77 e), fue la de la tortuga amarilla de estanque *Mauremys mutica*.

De forma particular, el aligátor del Yangtsé *A. sinensis* presenta una carga de 1.80 e, y el ser humano *H. sapiens* una carga de 0.87 e. Por otro lado, los cetáceos evaluados muestran una carga mediana de 3 e, con valores iguales o muy cercanos a los reportados (Mirceta et al., 2013). Y también encontramos mayores cargas en los pinnípedos, con una mediana de 4.

Las aves presentan una carga mediana de 2.6 e. Sorprendentemente, el mínimo lo exhibe el colibrí de Ana *Calypte anna* con 0.56 e (incluso los Tinamiformes presentan una Mb con una carga más cercana a 1). También llama la atención que el colibrí pechinegro andino *Oreotrochilus melanogaster* que habita entre los 3300 y 4400 m snm, presenta más del doble de la carga del colibrí de Ana (1.54 e).

En el otro extremo, se encuentran los cormoranes (Phalacrocoracidae) y las cotúas (Anhingidae) con una carga mediana de 4.64 e. Pero son los pingüinos (Sphenicidae) los que exhiben las Mbs más cargadas de todas las especies evaluadas, con una mediana de 5.09 e, y es el pingüino barbijo *Pygoscelys antarcticus*, el que tiene la mayor (5.45 e).

Por otro lado, el potó gigante, *Nyctibius grandis*, presenta una Mb con una carga intrigante de 4.62 e. Además, la carga de la Mb del águila real *Aquila chrysaetos*, de 3.50 e, resultó ser menor que la de los demás accipítridos evaluados de tierras bajas (~3.60 e). Y el ganso indio *Anser indicus* presenta una carga de 2.82 e, idéntica ala de los demás miembros evaluados de la Familia Anatidae.

En términos absolutos, las aves migratorias de largas distancias exhiben cargas medianas de 1.81 e a este pH, con valores hasta 4 veces menores que las aves capaces de bucear, por lo tanto, es claro que una elevada carga no convergió entre estos organismos. Pero este hecho no descarta la posibilidad de que, considerando la historia evolutiva, estas especies posean una Mb con mayor carga que sus parientes más cercanos. Por esta razón, se decidió llevar a cabo PMGLS para poner a prueba nuestra hipótesis.

Estos modelos son similares a los Modelos Lineales Generalizados Mixtos, pero incorporan en la matriz de varianza-covarianza del error de los residuos el parámetro de la “señal filogenética” derivada de un árbol filogenético y evalúa cómo la distribución del carácter sobre determinado árbol se ajusta al modelo de evolución (en nuestro caso el modelo de movimiento browniano de Edwards y Cavalli-Sforza de 1964). Así, mejora el ajuste de la regresión junto a su potencia, permitiendo tratar a cada especie como un punto independiente al romper “la correlación evolutiva”.

Se construyeron múltiples modelos “completos” y modelos “nulos” usando la función *ppls()* del paquete *caper* en R, que estima el valor de la lambda de Pagel (la señal filogenética) por métodos de máxima verosimilitud. Luego, con la función *anova()* en R, se llevaron a cabo las correspondientes pruebas de razón de verosimilitud (LTR, por sus siglas en inglés) entre estos modelos, para seleccionar la mejor combinación de variables predictoras para la carga de la Mb a pH 7.

Se evaluó la asociación entre distintas variables y la carga neta de la Mb, sólo en especies de aves (208 especies en total) considerando: la masa (Tobias, 2022) (trasformada en logaritmo neperiano de la masa promedio de la especie), latitud mínima (Tobias, 2022), latitud máxima (Tobias, 2022), el centroide de la latitud y longitud de su distribución (Tobias, 2022), el índice mano-ala de Friedrich Kipp (Tobias, 2022), la energía libre de plegamiento de la Mb a pH 7, si son capaces de bucear (variable categórica binaria “buceo”), si son capaces de volar (variable categórica binaria “vuelo”) y el estado migratorio (Tobias, 2022) (residente, parcialmente migratorio o migratorio de largas distancias).

En el mejor modelo elaborado con la topología sin restricciones, existe una asociación positiva (en la prueba LTR) entre la variable predictora de buceo y la masa con la carga neta de la Mb (PMGLS: lambda=0.966; buceo:  $F = 16.6936$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ; masa:  $F = 7.9018$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ , Figura 14). Al realizar una prueba VIF, no se encontró la existencia de colinearidad entre el logaritmo neperiano de la masa y la variable de buceo. Esta relación se mantiene al utilizar los árboles con las topologías restringidas a nivel de orden y familia (Figura 15 y 16).

Carga neta de la Mb = 0.692 Buceo + 0.077ln(masa)

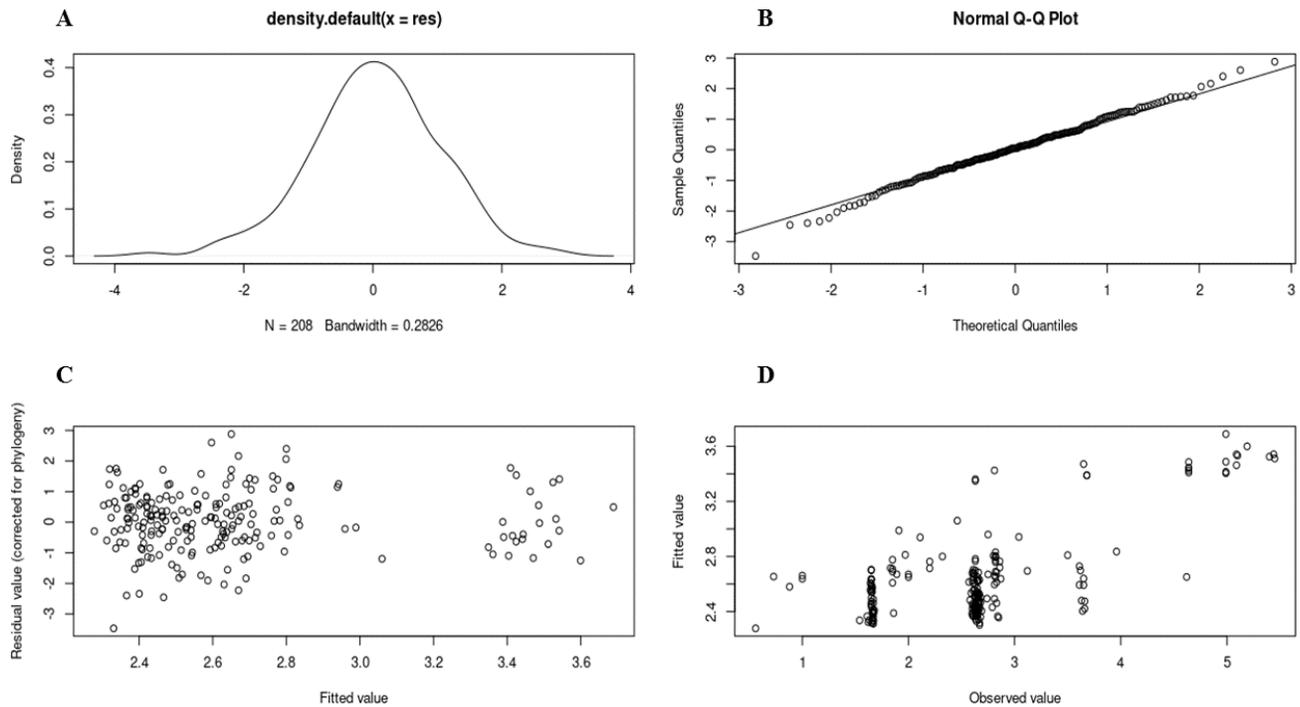


Figura 14. Gráficos diagnósticos del modelo “Carga neta de la Mb ~ Buceo + ln(masa)”. Se espera encontrar en el primer gráfico (A) una distribución cercana a la curva normal, donde no existan múltiples residuos estudentizados mayores a  $\pm 3$ , ya que distorsionan el modelo. El segundo gráfico superior (B), representa una prueba gráfica (un cuadro Q-Q) de la distribución normal de los residuos, donde la mayoría debería proyectarse sobre la línea diagonal del cuadro. En el tercer cuadro (C), se grafican los valores predichos en función de sus residuos, y no debería emerger un patrón sino distribuirse de forma aleatoria en un “cielo estrellado”. Finalmente, en el cuarto gráfico (D), se aprecian los valores observados en función de los valores estimados por el modelo y debe existir una correlación entre ambos.

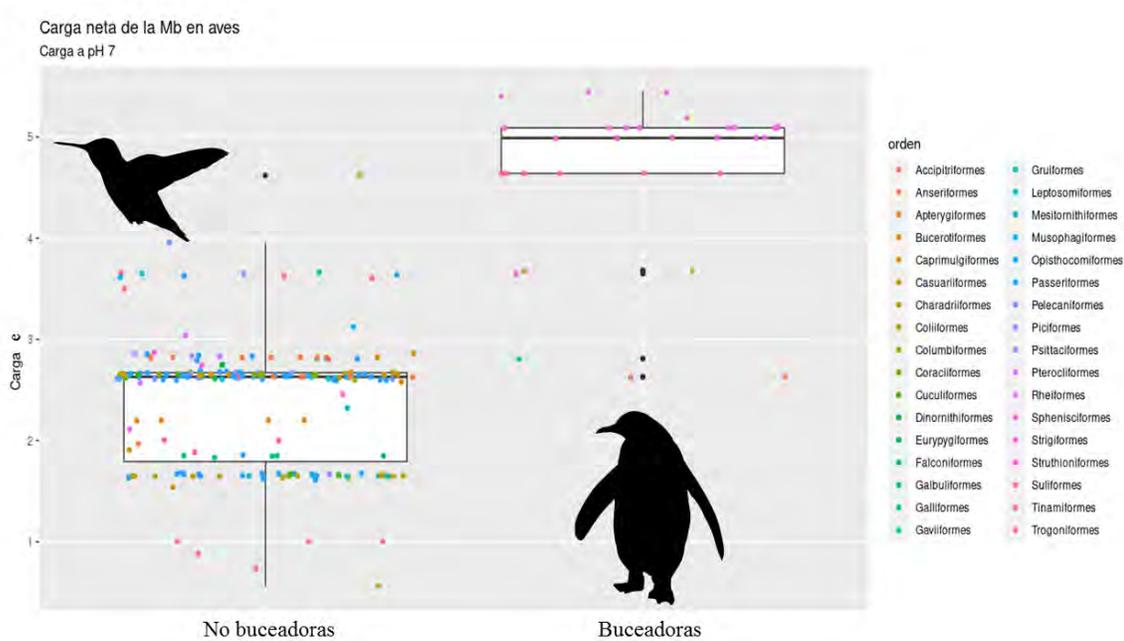


Figura 15. Carga neta de la Mb a pH 7 en las especies de aves evaluadas. Puede notarse una agregación alrededor de tres cargas en las aves no buceadoras (y algunas buceadoras de aguas someras) entre los 2, 2.8 y 3.6 e; en este mismo grupo, los extremos inferiores están conformados por el colibrí de ana *C. anna* y los Tinamiformes, con el mayor valor exhibido por el potó gigante *N. grandis*. En los buceadores, se observan en el extremo superior a los pingüinos Sphenisciformes, junto a los cormoranes Phalacrocoracidae y cotúas Anhingidae.

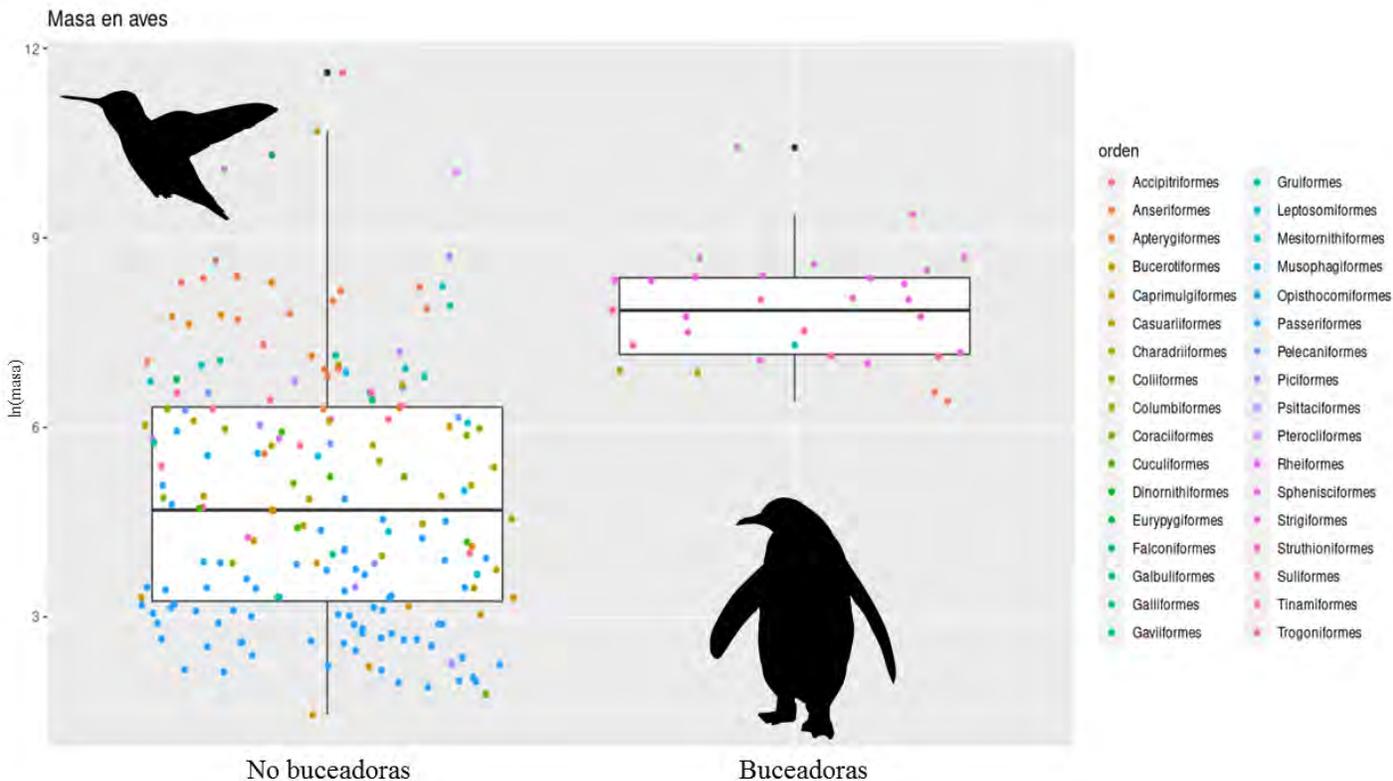


Figura 16. Masa de las diferentes especies de aves evaluadas. Se observa un patrón similar al de la carga de la Mb, ya que esta propiedad suele estar asociada a la capacidad de buceo. En las aves no buceadoras, los menores valores los presentan

los colibríes junto a las aves de percha Passeriformes; los mayores son exhibidos por paleognatos, otras aves que no vuelan y el potó gigante.

En ninguno de los modelos realizados, el estado migratorio estaba asociado de forma significativa con la carga neta de la Mb. Es más, el índice mano-ala de Friedrich Kipp (altamente asociado con las capacidades de vuelo de un ave) tampoco está asociado de forma significativa con la carga neta de la Mb.

En cambio, el estado migratorio junto al “vuelo” y la latitud máxima de la distribución están asociadas de forma positiva (en la prueba LTR), usando la topología sin restricciones, con el índice mano-ala de Friedrich Kipp (PMGLS:  $\lambda=0.957$ ; migratoria:  $F = 47.654$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0.001$ ; vuelo:  $F = 15.371$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ; latitud máxima:  $F = 22.825$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ). Las variables no son colineales (VIF) y la relación se mantiene en las topologías restringidas. Este patrón se ha reportado antes (Berthold et al., 2003; Newton, 2008; Rappole, 2013), con las especies migratorias de largas distancias exhibiendo el índice mano-ala más alto, y el conocido aumento en la proporción de aves migratorias en la avifauna a medida que se acerca a los polos, junto a la distancia que éstas migran (Newton, 2008).

$$\text{Índice mano-ala} = 6.535 \text{ Parcialmente Migratoria} + 7.265 \text{ Migratoria de Largas Distancias} + 6.923 \text{ Voladora} + 0.109 \text{ Latitud Máxima}$$

Al establecer la polaridad de la capacidad de buceo en aves sobre los árboles filogenéticos elaborados, por medio de una reconstrucción ancestral realizada en el paquete phytools en R con la función *rerootingMethod()* a través del método de re-enraizamiento de Yang (1995), se obtuvo la verosimilitud del estado del carácter en cada nodo. Así, se puede afirmar que la capacidad de buceo en estas aves evolucionó de manera convergente en al menos 6 ocasiones (Figura 20): en los pingüinos [Spheniscidae ~ 63 Ma (Jetz et al., 2012)], los cormoranes y cotúas [Phalacrocoracidae y Anhingidae ~ 29 Ma (Jetz et al., 2012)], los araos [Alcidae ~ 45 Ma (Jetz et al., 2012)], el zambullidor colombino *G. stellata* [Gaviformes 65.8 Ma (Jetz et al., 2012)], dos especies de patos buceadores de aguas someras *Aythya fuligula* [~ 1 Ma (Jetz et al., 2012)] y *Oxyura jamaicensis* [~ 3 Ma (Jetz et al., 2012)].

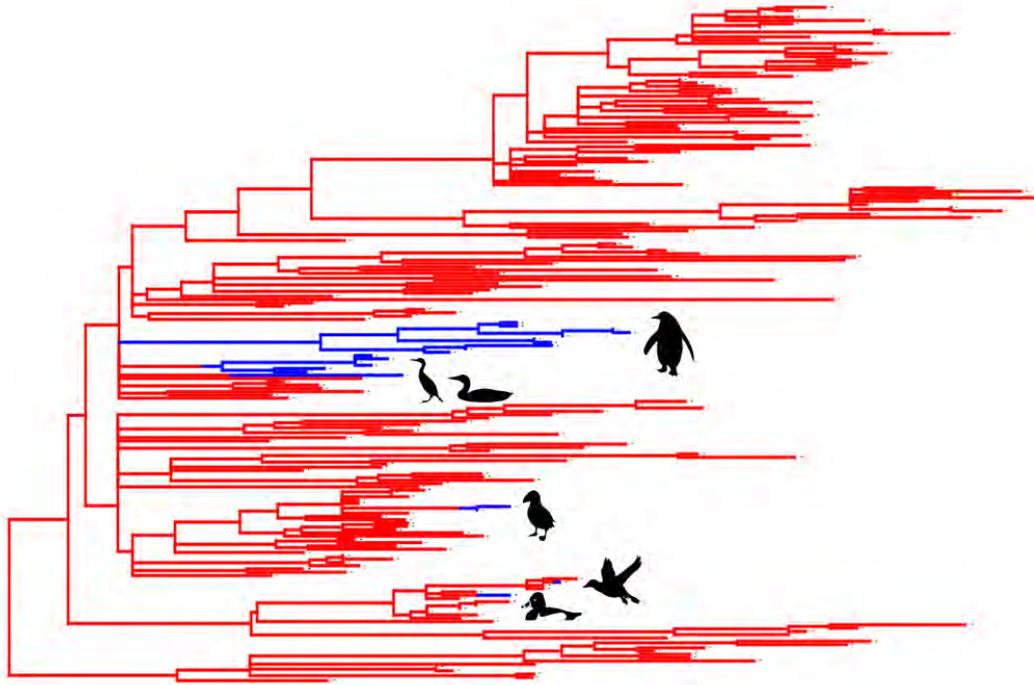


Figura 17. Reconstrucción ancestral de la capacidad de buceo en las aves, usando el mejor árbol filogenético de la mb elaborado en RaxML con restricciones a nivel de familia; en azul, los grupos de aves buceadoras junto a sus siluetas.

Si de forma similar, evaluamos la polaridad de la carga neta de la mioglobina con una reconstrucción ancestral de máxima verosimilitud efectuada con el algoritmo de evolución por contraste de Felsenstein (1985), (un modelo evolutivo razonable ya que se encontró en los PMGLS que este carácter tiene una elevada señal filogenética, cercana a 1) en el paquete phytools de R, usando la función FastAnc() (Figura 21), se rescata un patrón similar a la evolución de la capacidad de buceo. Los pingüinos, los cormoranes y cotúas, los araos y el zambullidor colombino *G. stellata* exhiben una acelerada evolución de la carga neta de sus Mbs, alcanzando los mayores valores en vertebrados. Por otro lado, los colibríes (Trochilidae) y los ténamos (Tinamiformes) experimentaron una disminución significativa en el transcurso de su evolución. En cambio, el resto de las aves se mantuvo alrededor de un valor similar al que presenta la raíz del árbol de  $\sim 2.6$  e, parecido al valor actual de las tortugas acuáticas, típico de un patrón de evolución aleatoria (Figura 22).

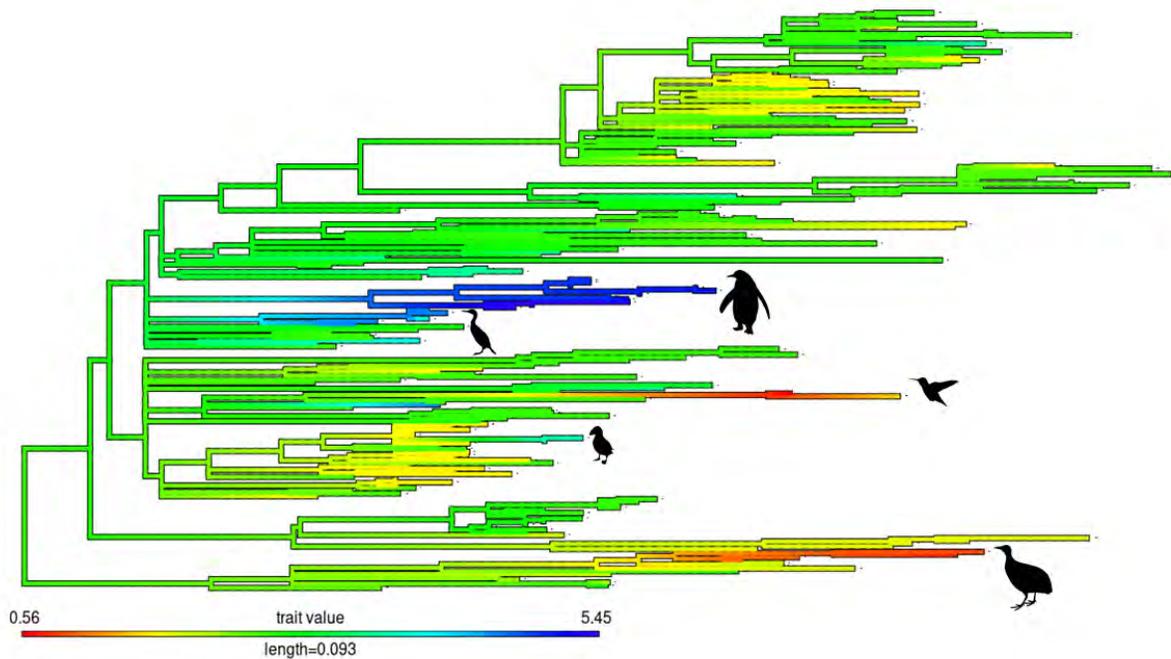


Figura 18. Reconstrucción ancestral de la carga neta de la Mb en aves, usando el mejor árbol filogenético de la mb elaborado en RaxML con restricciones a nivel de familia; en azul, el extremo superior del estado del caracter y en rojo el extremo inferior, junto a sus siluetas.

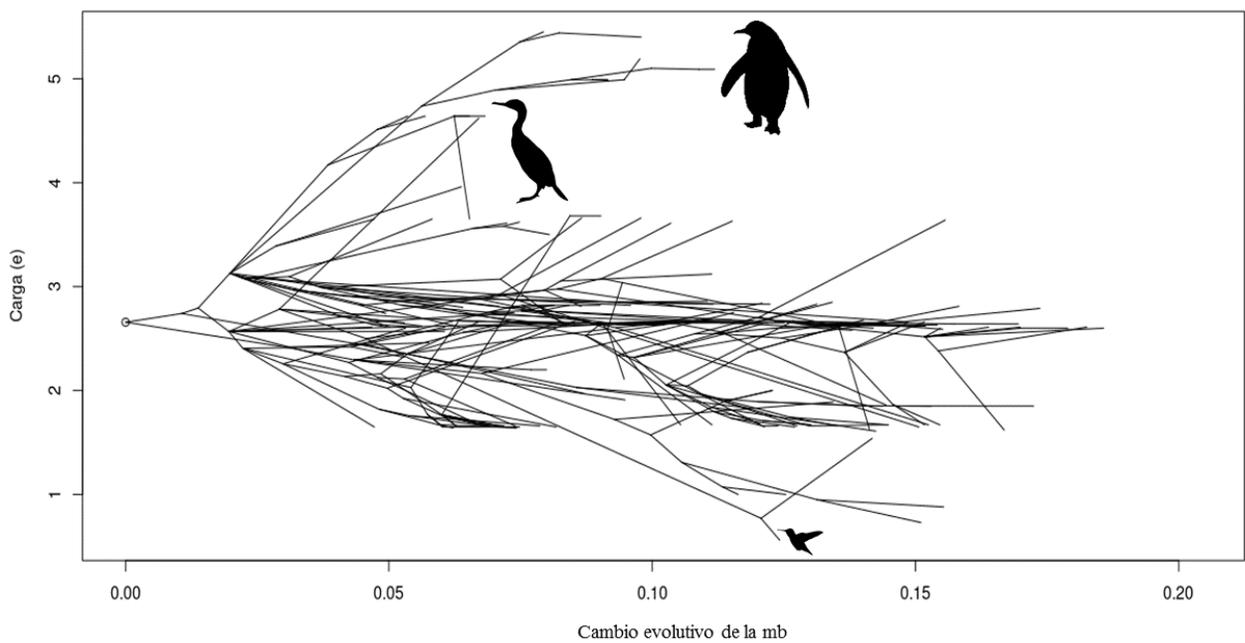


Figura 19. Fenograma de la carga neta en el transcurso de la evolución de la mb, usando el mejor árbol filogenético elaborado en RaxML con restricciones a nivel de familia, con las siluetas de los valores extremos.

También, al efectuar este procedimiento y evaluar la evolución de la masa de estas especies (Figura 23), puede observarse una disminución general de la masa desde la raíz del árbol de ~4 Kg (Figura 24), posiblemente asociada a las capacidades y formas de vuelo, evidente en los colibríes y las aves de percha (Passeriformes), pero con un aumento considerable en los pingüinos, los patos y gansos (Anatidae), y los paleognatos.

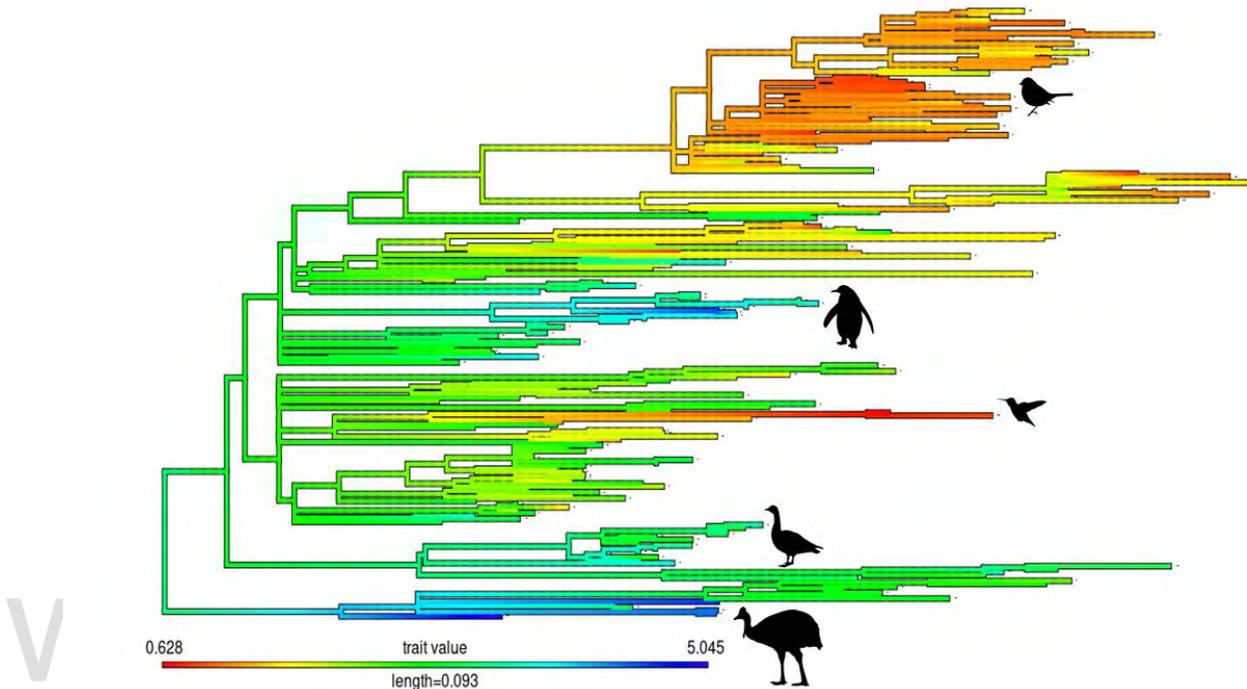


Figura 20. Reconstrucción ancestral de la masa en aves ( $\log_{10}[\text{masa}]$ ), usando el mejor árbol filogenético de la mb elaborado en RaxML con restricciones a nivel de familia; en azul, el extremo superior del estado del carácter y en rojo el extremo inferior, junto a sus siluetas.

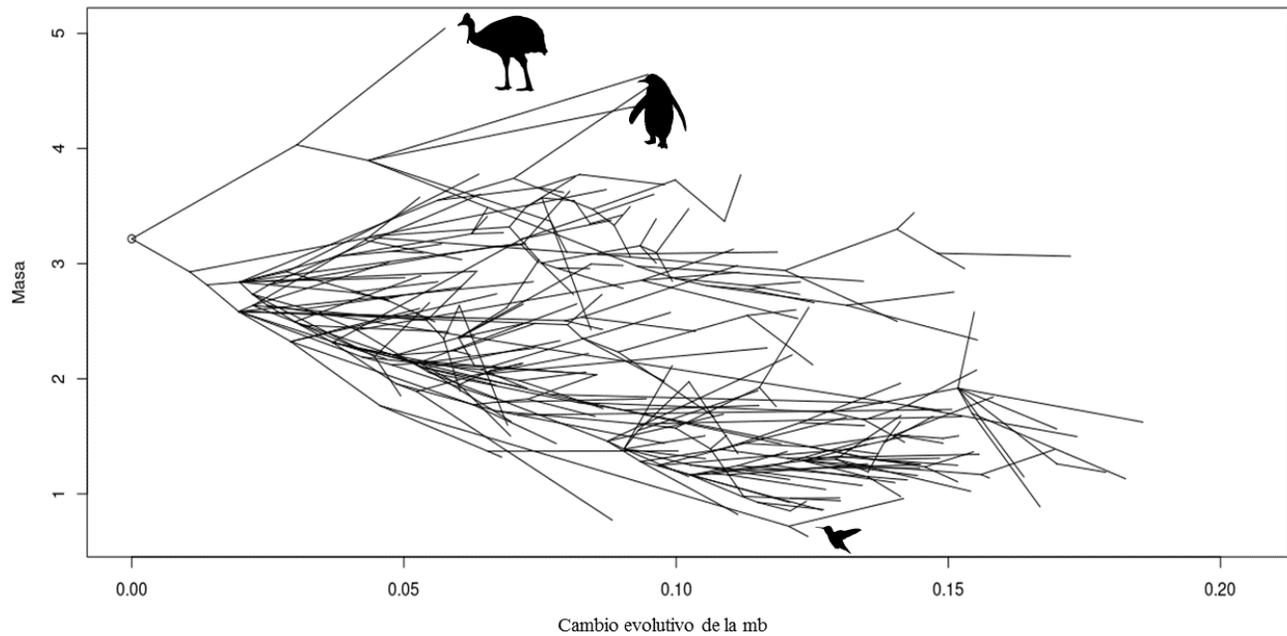
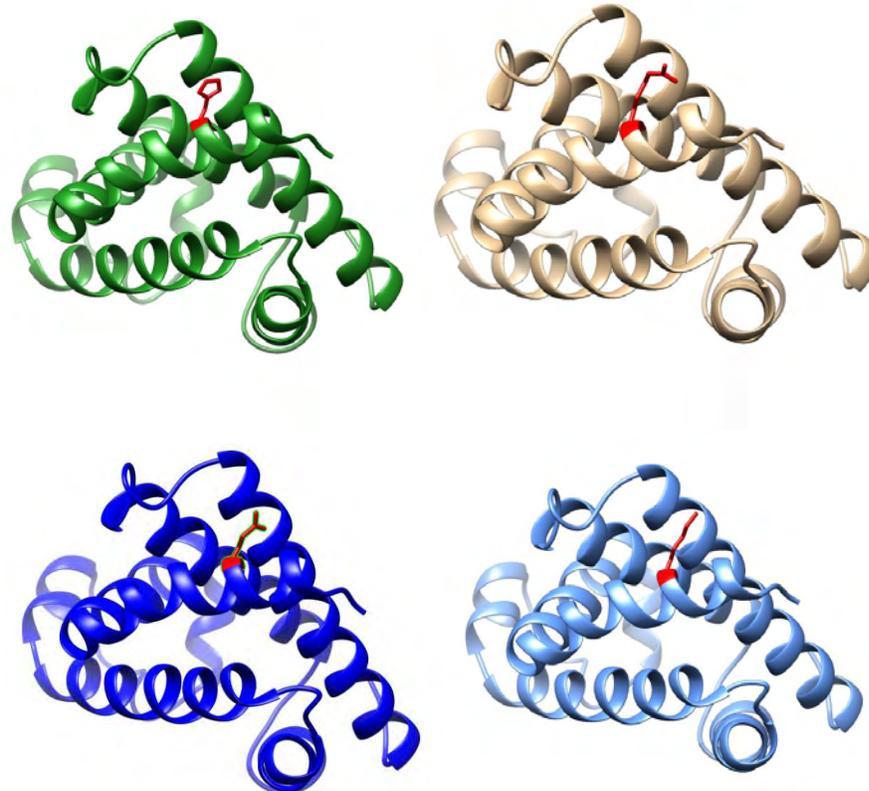


Figura 21. Fenograma de la masa ( $\log_{10}[\text{masa}]$ ) en el transcurso de la evolución de la mb, usando el mejor árbol filogenético elaborado en RaxML con restricciones a nivel de familia, con las siluetas de los valores extremos.

### Identificación de sustituciones convergentes

Usando los tres árboles reconstruidos se procedió a identificar sustituciones convergentes de aminoácidos con una probabilidad  $\geq 0.8$  en aves migratorias de largas distancias, usando el programa PCOC. Tanto el modelo PCOC (combinación del modelo PC y OC), PC (cambio convergente en el perfil de los aa) y OC (un solo cambio convergente de aa) no sugirieron la existencia de dichas convergencias.

En cambio, se encontraron sorprendentes convergencias entre los grupos de aves que presentan una Mb con carga mayor a 3 e ó entre las aves y mamíferos capaces de bucear. Con la topología libre de restricciones, tanto el modelo PCOC como OC sugieren una convergencia en el sitio 9 de la proteína en todas las aves con una Mb altamente cargada (Figura 25), que presentan una histidina, lisina, arginina o glutamina (con una tasa de falsos negativos TFN para este sitio de 0, simulada con nuestros datos).



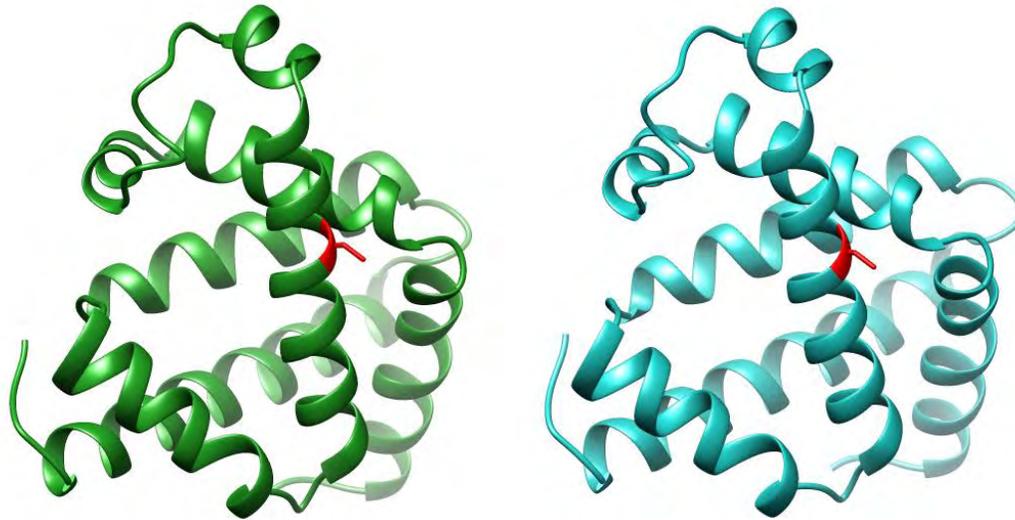
*Aquila\_chrysaetos\_chrysaetos*  
*Uria\_aalge*  
*Anhinga\_anhinga*  
*Balaeniceps\_rex*  
*Calyptomena\_viridis*  
*Chloropsis\_cyanopogon*  
*Leptosomus\_discolor*  
*Corythaeola\_cristata*  
*Nyctibius\_grandis*  
*Phalacrocorax\_brasilianus*  
*Aptenodytes\_forsteri*  
*Pygoscelis\_antarcticus*  
*Apaloderma\_vittatum*

	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	27													
<i>Aquila_chrysaetos_chrysaetos</i>	G	L	S	D	Q	E	W	Q	K	V	L	A	I	W	G	K	V	E	S	D	L	A	G	H	G	H	A
<i>Uria_aalge</i>	G	L	S	D	Q	E	W	Q	H	V	L	T	I	W	G	K	V	E	S	D	L	A	G	H	G	H	Q
<i>Anhinga_anhinga</i>	G	L	S	D	Q	E	W	Q	R	V	L	T	I	W	G	K	V	E	S	D	L	P	G	H	G	H	E
<i>Balaeniceps_rex</i>	G	L	S	D	Q	E	W	Q	K	V	L	T	I	W	G	K	V	E	S	D	L	A	G	H	G	H	E
<i>Calyptomena_viridis</i>	G	L	S	D	Q	E	W	Q	K	V	L	T	V	W	G	K	V	E	S	D	I	A	G	H	G	H	A
<i>Chloropsis_cyanopogon</i>	G	L	S	D	Q	E	W	Q	K	V	L	T	V	W	G	K	V	E	T	D	L	A	G	H	G	H	Q
<i>Leptosomus_discolor</i>	G	L	S	D	Q	E	W	Q	K	V	L	T	V	W	G	K	V	E	A	D	L	P	G	H	G	H	E
<i>Corythaeola_cristata</i>	G	L	S	D	Q	E	W	Q	H	V	L	T	V	W	G	K	V	E	S	D	L	A	G	H	G	H	E
<i>Nyctibius_grandis</i>	G	L	N	D	Q	E	W	Q	K	V	L	T	I	W	G	K	V	E	S	D	L	P	G	H	G	H	A
<i>Phalacrocorax_brasilianus</i>	G	L	S	D	Q	E	W	Q	R	V	L	T	I	W	G	K	V	E	S	D	L	P	G	H	G	H	E
<i>Aptenodytes_forsteri</i>	G	L	N	D	Q	E	W	Q	Q	V	L	T	M	W	G	K	V	E	S	D	L	A	G	H	G	H	A
<i>Pygoscelis_antarcticus</i>	G	L	S	D	Q	E	W	Q	K	V	L	T	I	W	G	K	V	E	S	D	I	P	G	H	G	H	A
<i>Apaloderma_vittatum</i>	G	L	S	D	Q	E	W	Q	R	V	L	T	V	W	G	K	G	E	S	D	L	A	G	H	G	H	A

Figura 22. Estructura terciaria de la Mb del Turaco crestrirrojo *T. erythrolophus* (verde), la cotúa *Anhinga anhinga* (marrón), el pingüino emperador *A. forsteri* (azul) y el carraca curol malgache *L. discolor* (celeste); en rojo, la posición 9. En la parte inferior de la figura se muestra el alineamiento múltiple de la Mb de algunas de las especies evaluadas.

Los modelos PCOC como OC también identificaron una convergencia en el sitio 66 entre el zambullidor colimbo chico *G. stellata* y los mosquiteros (Phylloscopidae) donde ambos exhiben una

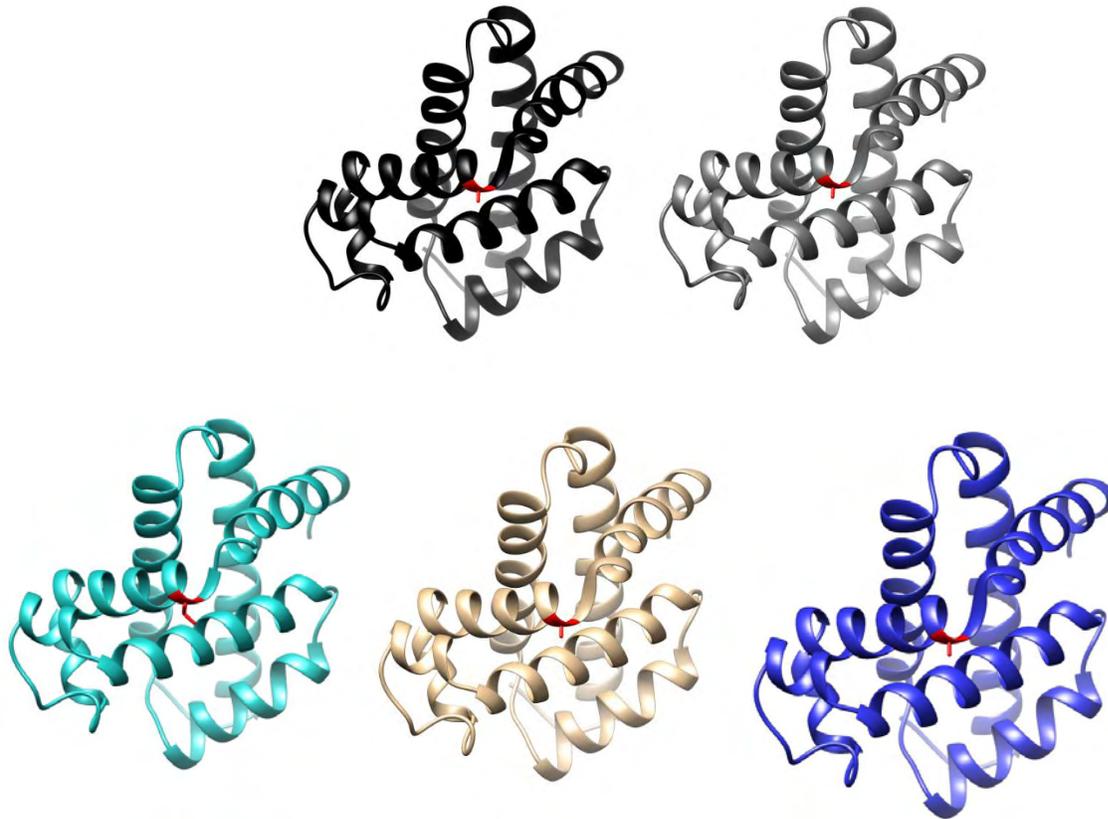
cisteína (TFN en el sitio de 0.2 en PCOC y 0.05 en OC), en la cual acumularon dos transversiones 199 G→ T y 200 T → G en la secuencia codificante (incluyendo la metionina de inicio)(Figura 26).



	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80	82	84	86	88	90																				
<i>Gavia_stellata</i>	K	T	P	D	Q	M	K	G	S	E	D	L	K	K	H	G	C	T	V	L	T	Q	L	G	K	I	L	K	Q	K	G	N	H	E	S	E	L	K	P	L	A
<i>Phylloscopus_trochiloides_viridanus</i>	K	T	P	D	A	M	K	G	S	E	D	L	K	K	H	G	C	T	V	L	T	Q	L	G	K	I	L	K	A	K	G	N	H	E	A	E	L	K	P	L	A
<i>Phylloscopus_whistleri</i>	K	T	P	D	A	M	K	G	C	E	D	L	K	K	H	G	C	T	V	L	T	Q	L	G	K	I	L	K	A	K	G	N	H	E	A	E	L	K	P	L	A
<i>Phylloscopus_trochilus_acredula</i>	K	T	P	D	A	M	K	G	S	E	D	L	K	K	H	G	C	T	V	L	T	Q	L	G	K	I	L	K	A	K	G	N	H	E	A	E	L	K	P	L	A
<i>Phylloscopus_plumbeitarsus</i>	K	T	P	D	A	M	K	G	S	E	D	L	K	K	H	G	C	T	V	L	T	Q	L	G	K	I	L	K	A	K	G	N	H	E	A	E	L	K	P	L	A
<i>Rhadina_sibilatrix</i>	K	T	P	D	A	M	K	G	S	E	D	L	K	K	H	G	C	T	V	L	T	Q	L	G	K	I	L	K	A	K	G	N	H	E	A	E	L	K	P	L	A
<i>Gallus_gallus</i>	K	T	P	D	Q	M	K	G	S	E	D	L	K	K	H	G	A	T	V	L	T	Q	L	G	K	I	L	K	Q	K	G	N	H	E	S	E	L	K	P	L	A

Figura 23. Estructura terciaria de la Mb del Mosquitero *Phylloscopus trochiloides* (verde) y el zambullidor colimbo chico *G. stellata*(celeste); en rojo, la posición 66. En la parte inferior de la figura se muestra el alineamiento múltiple de la Mb de las especies evaluadas.

Con este mismo árbol, el modelo OC encontró una convergencia entre los pingüinos (Sphenicidae), arasos (Alcidae), el zambullidor colimbo chico *G. stellata*, los cetáceos y los pinnípedos en la posición 22 de la proteína, presentando una alanina, treonina o prolina en dicho sitio (TFN de 0.2) (Figura 27).



*Aptenodytes\_forsteri*  
*Megadyptes\_antipodes\_antipodes*  
*Pygoscelis\_adeliae*  
*Pygoscelis\_antarcticus*  
*Eudyptes\_chrysolome*  
*Eudyptes\_sclateri*  
*Eudyptula\_minor*  
*Spheniscus\_demersus*  
*Uria\_aalge*  
*Gavia\_stellata*  
*Physeter\_catodon*  
*Orcinus\_orca*  
*Balaenoptera\_musculus*  
*Odobenus\_rosmarus*  
*Halichoerus\_grypus*  
*Leptonychotes\_weddellii*  
*Mirounga\_leonina*  
*Phoca\_vitulina*

	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40															
<i>Aptenodytes_forsteri</i>	V	L	T	M	W	G	K	V	E	S	D	L	A	G	H	G	H	A	V	L	M	R	L	F	Q	D	H	P	E	T	M
<i>Megadyptes_antipodes_antipodes</i>	V	L	T	M	W	G	K	V	E	S	D	M	A	G	H	G	H	A	V	L	M	R	L	F	Q	D	H	P	E	T	M
<i>Pygoscelis_adeliae</i>	V	L	S	I	W	G	K	V	E	S	D	I	A	G	H	G	H	A	V	L	M	R	L	F	Q	D	H	P	E	T	M
<i>Pygoscelis_antarcticus</i>	V	L	T	I	W	G	K	V	E	S	D	I	A	G	H	G	H	A	V	L	M	R	L	F	Q	D	H	P	E	T	M
<i>Eudyptes_chrysolome</i>	V	L	T	M	W	G	K	V	E	S	D	M	A	G	H	G	H	A	V	L	M	R	L	F	Q	D	H	P	E	T	M
<i>Eudyptes_sclateri</i>	V	L	T	M	W	G	K	V	E	S	D	M	A	G	H	G	H	A	V	L	M	R	L	F	Q	D	H	P	E	T	M
<i>Eudyptula_minor</i>	V	L	T	M	W	G	K	V	E	S	D	L	A	G	H	G	H	A	V	L	M	R	L	F	Q	D	H	P	E	T	M
<i>Spheniscus_demersus</i>	V	L	T	M	W	G	K	V	E	S	D	L	A	G	H	G	H	A	V	L	M	R	L	F	Q	D	H	P	E	T	M
<i>Uria_aalge</i>	V	L	T	I	W	G	K	V	E	S	D	L	A	G	H	G	H	Q	V	L	M	R	L	F	Q	D	H	P	E	T	L
<i>Gavia_stellata</i>	V	L	T	I	W	G	K	V	E	S	D	L	T	G	H	G	H	E	V	L	M	R	L	F	Q	D	H	P	E	T	L
<i>Physeter_catodon</i>	V	L	H	V	W	A	K	V	E	A	D	V	A	G	H	G	Q	D	I	L	I	R	L	F	K	S	H	P	E	T	L
<i>Orcinus_orca</i>	V	L	N	V	W	G	K	V	E	A	D	L	A	G	H	G	Q	D	I	L	I	R	L	F	K	G	H	P	E	T	L
<i>Balaenoptera_musculus</i>	V	L	N	I	W	A	K	V	E	A	D	V	A	G	H	G	Q	D	I	L	I	R	L	F	K	G	H	P	E	T	L
<i>Odobenus_rosmarus</i>	V	L	N	V	W	G	K	V	E	A	D	L	A	G	H	G	Q	E	V	L	I	R	L	F	K	G	H	P	E	T	L
<i>Halichoerus_grypus</i>	V	L	N	V	W	G	K	V	E	T	D	L	A	G	H	G	Q	E	V	L	I	R	L	F	K	S	H	P	E	T	L
<i>Leptonychotes_weddellii</i>	V	L	N	I	W	G	K	V	E	T	D	L	A	G	H	G	Q	E	V	L	I	R	L	F	R	S	H	P	E	T	L
<i>Mirounga_leonina</i>	V	L	N	I	W	G	K	V	E	T	D	L	A	G	H	G	Q	E	V	L	I	R	L	F	R	S	H	P	E	T	L
<i>Phoca_vitulina</i>	V	L	N	V	W	G	K	V	E	T	D	L	A	G	H	G	Q	E	V	L	I	R	L	F	K	S	H	P	E	T	L

Figura 24. Estructura terciaria de la Mb del pingüino emperador *A. forsteri* (negro), el arao común *Uria aalge* (gris), el zambullidor colimbo chico *G. stellata* (celeste), el cachalote *P. catodon* (marrón) y el elefante marino *M. augustirostris* (morado); en rojo, la posición 22. En la parte inferior de la figura se muestra el alineamiento múltiple de la Mb de algunas de las especies evaluadas.

Entre los cormoranes (Phalacrocoracidae), las cotúas (Anhingidae), los cetáceos y los pinnípedos tanto en el modelo PCOC como OC, se encontró una convergencia en el sitio 57 de la Mb. Presentan una alanina o arginina en dicha posición (TFN de 0.11 PCOC y 0.89 OC) (Figura 28).

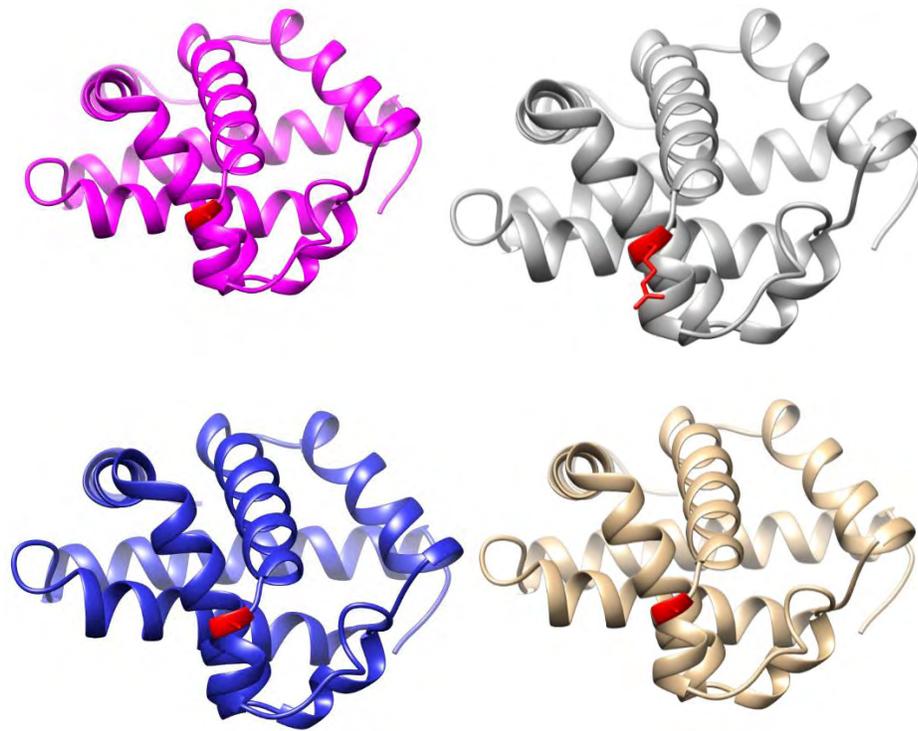
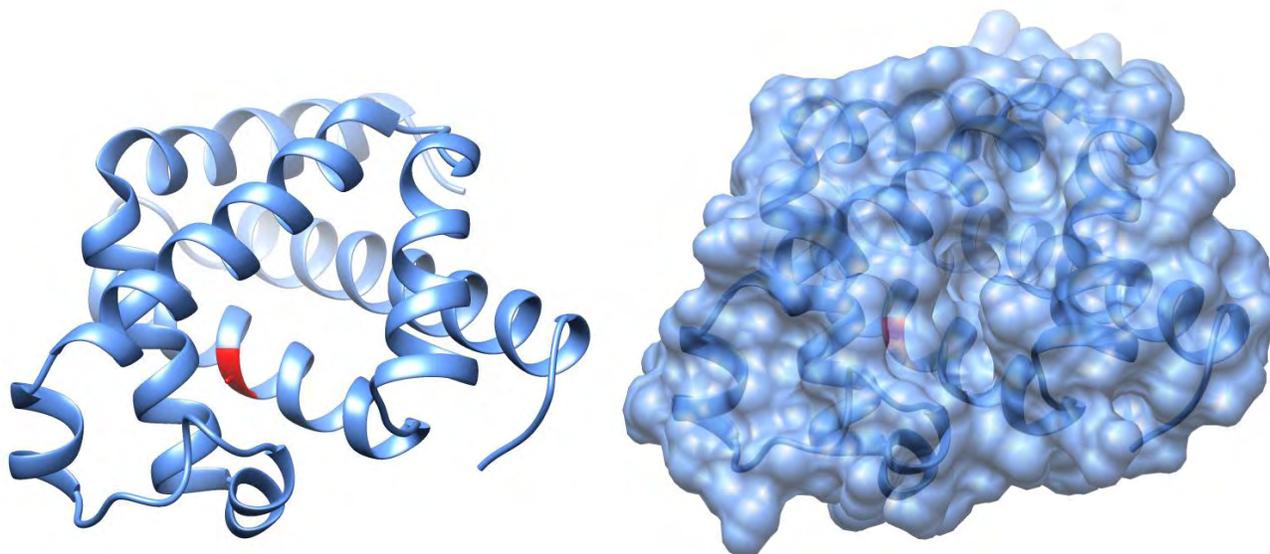


Figura 25. Estructura terciaria de la Mb del cormorán de las galápagos *Phalacrocorax harrisi* (violeta), la cotúa *A. anhinga* (azul), el cachalote *P. catodon* (marrón) y el elefante marino *M. augustirostris* (gris); en rojo, la posición 57. En la parte inferior de la figura se muestra el alineamiento múltiple de la Mb de algunas de las especies evaluadas.

Entre los pingüinos, aros, zambullidor, cetáceos y pinnípedos, ambos modelos identificaron una convergencia en la posición 110 (Figura 29). Presentan una alanina, producto de una transición de la T → C en el puesto 332 de la secuencia codificante (TFN de 0.03 PCOC y 0.2 OC).

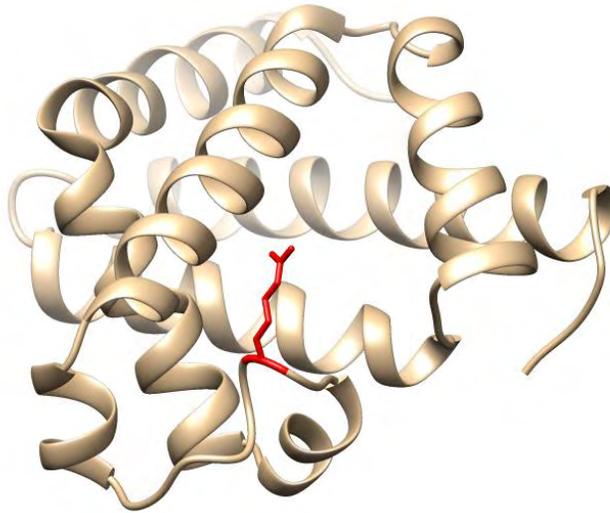


*Aptenodytes\_forsteri*  
*Megadyptes\_antipodes\_antipodes*  
*Pygoscelis\_antarcticus*  
*Eudyptes\_chrysocome*  
*Eudyptes\_sclateri*  
*Eudyptula\_minor*  
*Spheniscus\_demersus*  
*Uria\_aalge*  
*Balaenoptera\_musculus*  
*Orcinus\_orca*  
*Physeter\_catodon*  
*Odobenus\_rosmarus*  
*Halichoerus\_grypus*  
*Mirounga\_angustirostris*  
*Leptonychotes\_weddellii*  
*Mirounga\_leonina*  
*Phoca\_vitulina*

	100	102	104	106	108	110	112	114	116	118	120										
<i>Aptenodytes_forsteri</i>	P	V	K	Y	L	E	F	I	C	E	A	I	M	K	V	I	A	E	K	H	S
<i>Megadyptes_antipodes_antipodes</i>	P	V	K	Y	L	E	F	I	C	E	A	M	M	K	V	M	A	E	K	H	P
<i>Pygoscelis_antarcticus</i>	P	V	K	Y	L	E	F	I	C	E	A	I	M	K	V	I	A	E	K	H	S
<i>Eudyptes_chrysocome</i>	P	V	K	Y	L	E	F	I	C	E	A	M	M	K	V	M	A	E	K	H	P
<i>Eudyptes_sclateri</i>	P	V	K	Y	L	E	F	I	C	E	A	M	M	K	V	M	A	E	K	H	F
<i>Eudyptula_minor</i>	P	V	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	M	K	V	M	A	E	K	H	P
<i>Spheniscus_demersus</i>	P	V	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	M	K	V	M	A	E	K	H	P
<i>Uria_aalge</i>	P	V	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	I	K	V	I	A	E	K	H	A
<i>Balaenoptera_musculus</i>	P	I	K	Y	L	E	F	I	S	D	A	I	I	H	V	L	H	S	R	H	P
<i>Orcinus_orca</i>	P	I	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	I	H	V	L	H	S	R	H	P
<i>Physeter_catodon</i>	P	I	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	I	H	V	L	H	S	R	H	P
<i>Odobenus_rosmarus</i>	P	I	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	I	Q	V	L	Q	S	K	H	P
<i>Halichoerus_grypus</i>	P	I	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	I	H	V	L	H	S	K	H	P
<i>Mirounga_angustirostris</i>	P	I	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	I	Q	V	L	H	N	K	H	P
<i>Leptonychotes_weddellii</i>	P	I	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	I	H	V	L	H	S	K	H	P
<i>Mirounga_leonina</i>	P	I	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	I	Q	V	L	H	N	K	H	P
<i>Phoca_vitulina</i>	P	I	K	Y	L	E	F	I	S	E	A	I	I	H	V	L	H	S	K	H	P

Figura 26. Estructura terciaria de la Mb del pingüino emperador *A. forsteri*; en rojo, la posición 110. En la parte inferior de la figura se muestra el alineamiento múltiple de la Mb de algunas de las especies evaluadas.

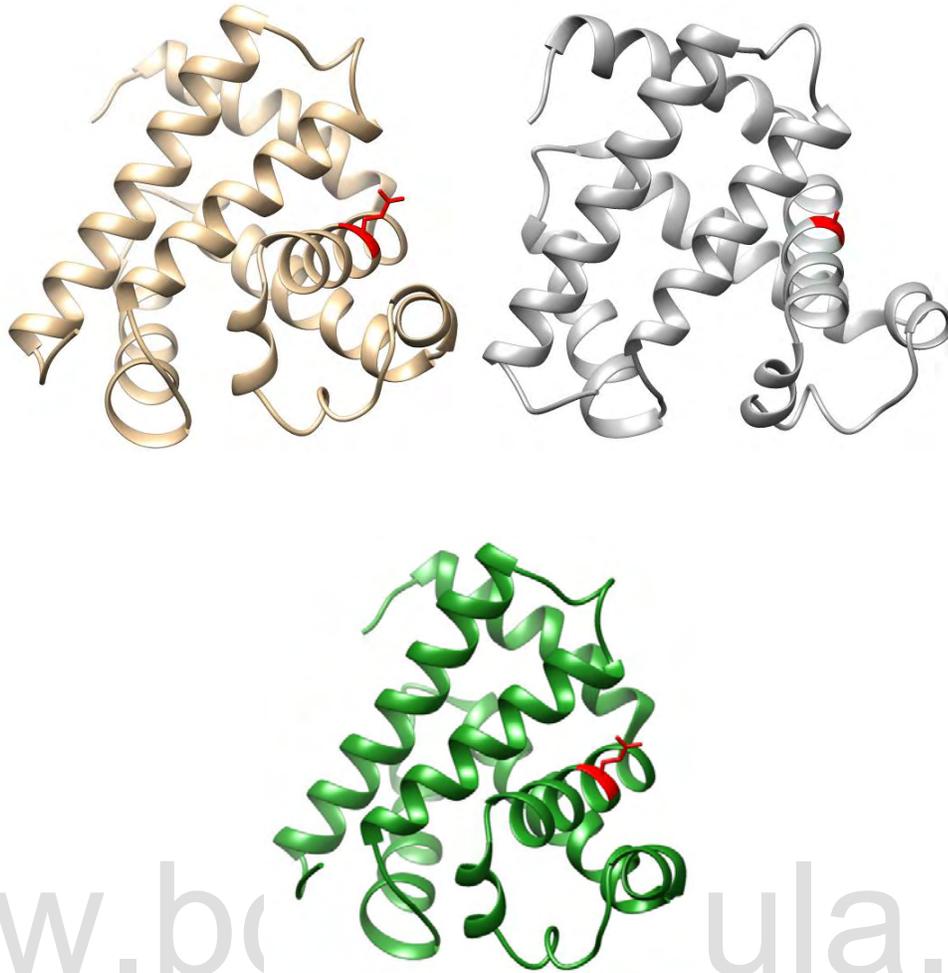
Estas mismas convergencias fueron encontradas con las topologías restringidas, sólo que también rescataron una convergencia entre las aves que poseen una Mb con carga mayor a 4 e en el sitio 45, donde algunas presentan una arginina o una lisina (TFN 0.8 OC)(Figura 30).



	35	38	40	42	44	46	48	50	52	55											
<i>Aptenodytes_forsteri</i>	D	H	P	E	T	M	D	R	F	D	K	F	R	G	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Megadyptes_antipodes_antipodes</i>	D	H	P	E	T	M	D	R	F	E	K	F	K	H	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Pygoscelis_antarcticus</i>	D	H	P	E	T	M	D	R	F	E	K	F	K	N	L	K	T	H	D	Q	M
<i>Eudyptes_chrysocome</i>	D	H	P	E	T	M	D	R	F	E	K	F	K	H	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Eudyptes_sclateri</i>	D	H	P	E	T	M	D	R	F	E	K	F	K	H	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Eudyptula_minor</i>	D	H	P	E	T	M	D	R	F	E	K	F	K	N	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Spheniscus_demersus</i>	D	H	P	E	T	M	D	R	F	E	K	F	K	N	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Phalacrocorax_auritus</i>	D	H	P	E	T	L	D	R	F	E	R	F	K	G	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Phalacrocorax_brasilianus</i>	D	H	P	E	T	L	D	R	F	E	R	F	K	G	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Phalacrocorax_carbo</i>	D	H	P	E	T	L	D	R	F	E	R	F	K	G	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Phalacrocorax_harrisi</i>	D	H	P	E	T	L	D	R	F	E	R	F	K	G	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Phalacrocorax_pelagicus</i>	D	H	P	E	T	L	D	R	F	E	R	F	K	G	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Anhinga_anhinga</i>	D	H	P	E	T	L	D	R	F	E	R	F	K	G	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Anhinga_rufa</i>	D	H	P	E	T	L	D	R	F	E	K	F	K	G	L	K	T	P	D	Q	M
<i>Nyctibius_grandis</i>	D	H	P	E	T	L	D	R	F	E	R	F	K	G	L	K	T	P	D	Q	M

Figura 27. Estructura terciaria de la Mb del potogigante *N. grandis*; en rojo, la posición 45. En la parte inferior de la figura se muestra el alineamiento múltiple de la Mb de algunas de las especies evaluadas.

En el puesto 27, las aves buceadoras mencionadas, los cetáceos y los pinnípedos presentan una alanina, glutamina, ácido glutámico o ácido aspártico (TFN de 0.09 PCOC y 0.45 OC) (Figura 31).



www.bci.ula.ve

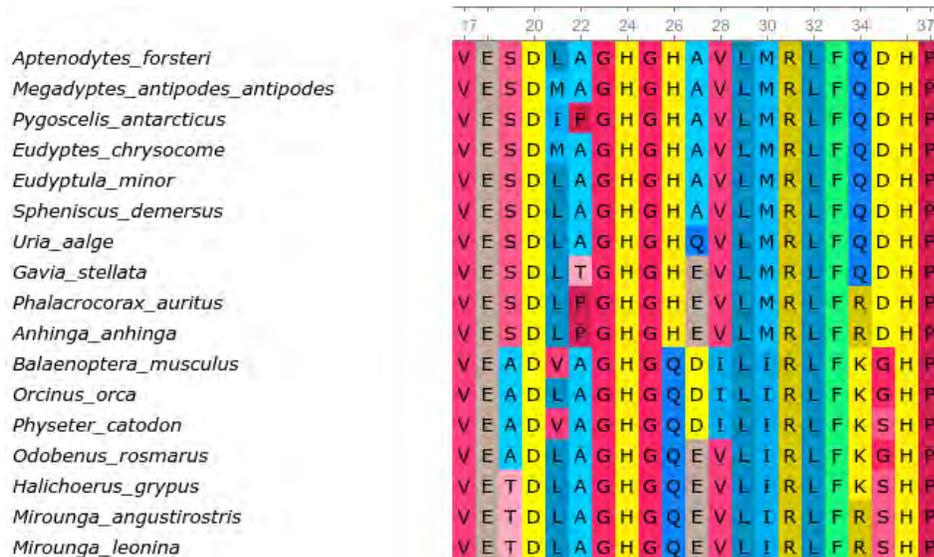


Figura 28. Estructura terciaria de la Mb dela cotúa *A. anhinga* (marrón), pingüino emperador *A. forsteri*(gris) y el elefante marino *M. augustirostris*(verde); en rojo, la posición 27. En la parte inferior de la figura se muestra el alineamiento múltiple de la Mb de algunas de las especies evaluadas.

Por último, se encontraron cuatro posibles convergencias entre el potó gigante *N. grandis*, los cormoranes y las cotúas en los sitios 9, 27, 34 y 45 (TFN en 0.59 PCOC y 0.8 OC)(Figura 32).

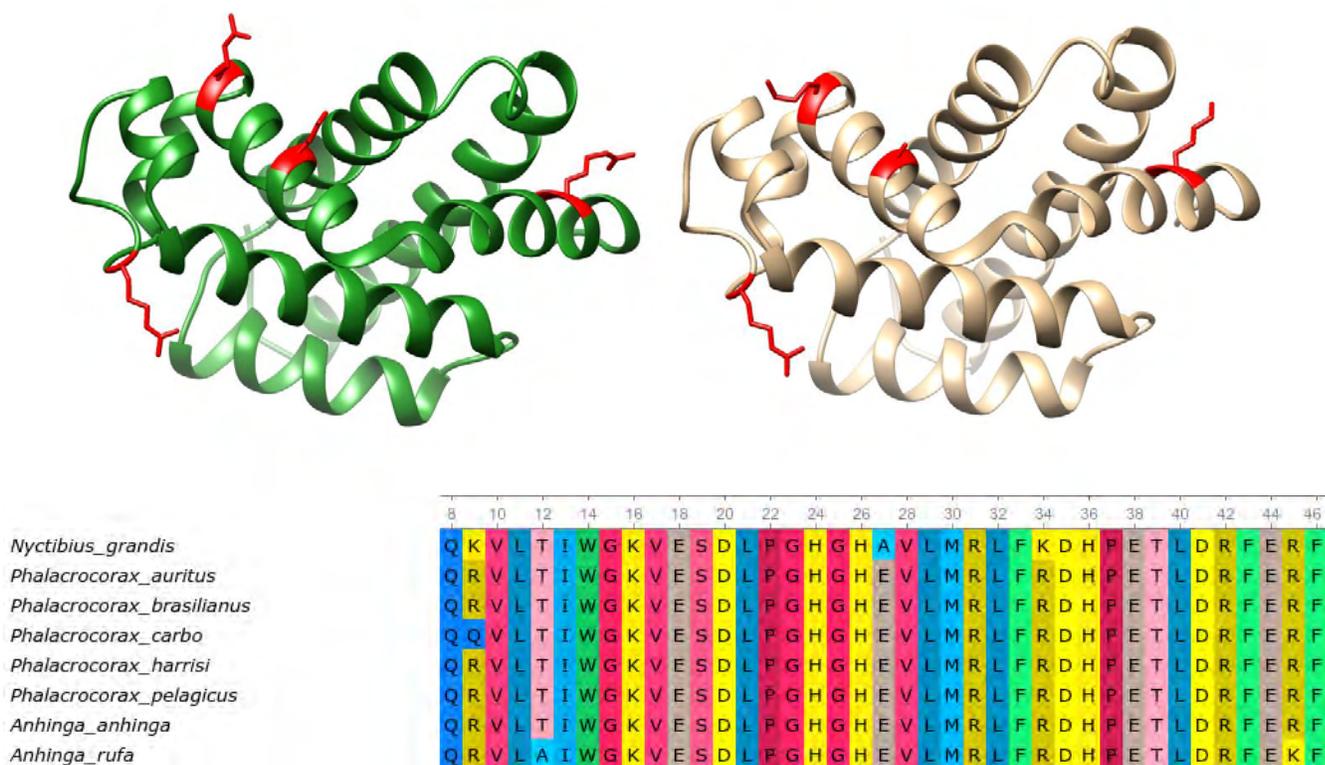


Figura 29. Estructura terciaria de la Mb del cormorán de las galápagos *P. harrisi* (verde) y el poto gigante *N. grandis* (marrón); en rojo, las posiciones 9,27,34 y 45. En la parte inferior de la figura se muestra el alineamiento múltiple de la Mb de las especies evaluadas.

### Estimación de la afinidad de la Mb por distintos ligandos

Para efectuar la comparación de la afinidad de la Mb con sus diferentes ligandos entre las distintas especies de aves evaluadas, se efectuaron de forma reiterada acoplamiento molecular en el programa Autodock-Vina. Éste utiliza los mapas de cuadrícula atómicos del receptor y el ligando (una representación tridimensional de la energía potencial de cada átomo en el sistema), elaborados en AutoGrid, para guiar la función de optimización estocástica de energía global. Así, es posible predecir la configuración espacial estable del complejo de unión receptor-ligando y estimar la afinidad de esta interacción.

De esta manera, usando el programa AutoTools, se designó de forma explícita un espacio de 13800 Å<sup>3</sup> que engloba toda la cavidad del bolsillo del grupo hemo (Figura 33). Esta región se evaluó con el algoritmo de Autodock-Vina y el grupo hemo a través de 64 iteraciones, y luego el mejor complejo resultante fue utilizado para evaluar, de la misma forma, su interacción con el oxígeno, glucosa-6-fosfato, lactato, monóxido de nitrógeno y el sulfuro de dihidrógeno.

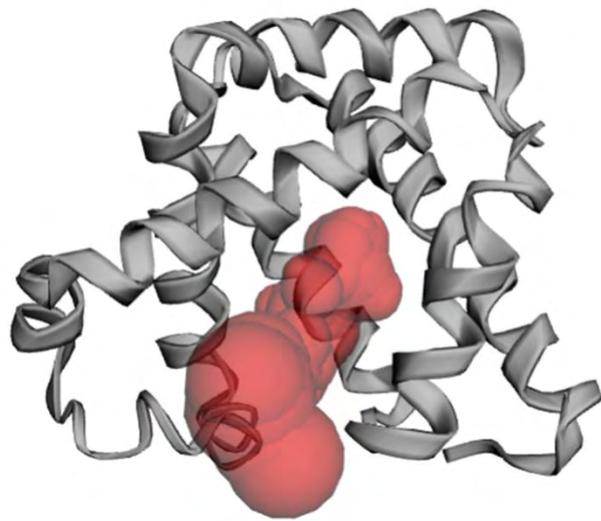
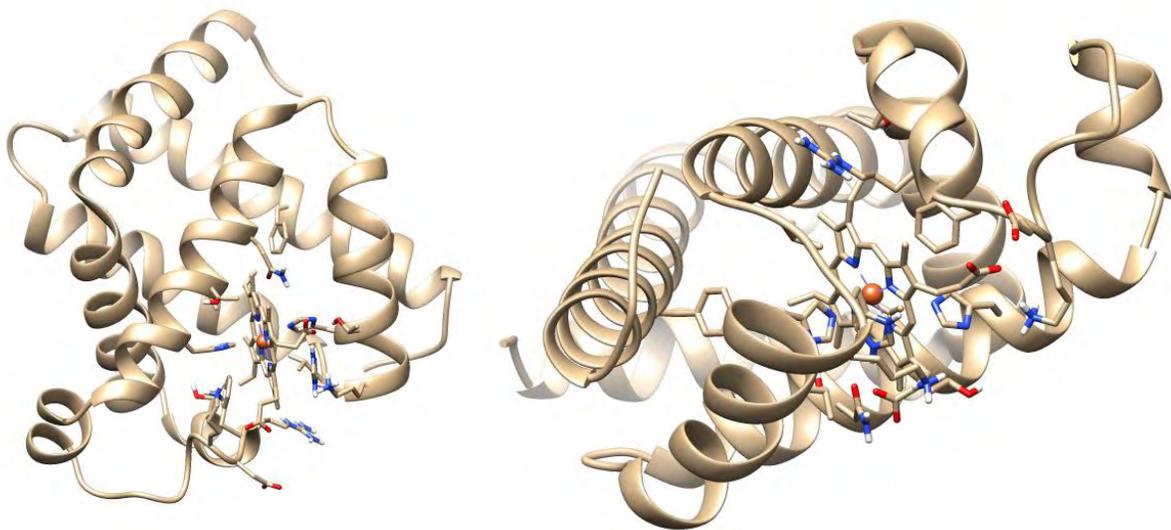


Figura 30. Cavity del bolsillo del grupo hemo de la Mb consenso, con un área accesible de superficie de solvente de 375 Å<sup>2</sup> y un volumen de 237 Å<sup>3</sup> conformado por los residuos n° 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 24, 25, 26, 28, 29, 32, 33, 35, 36, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 49, 55, 56, 58, 62, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 80, 82, 83, 86, 86, 87, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 103, 104, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 119, 122, 127, 131, 132, 134, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 149, 151. Determinado en CASTp<sup>83</sup>.

Esto pudo realizarse con la apoMb de prácticamente todas las especies de aves evaluadas, excepto el pico de zapato *Balaeniceps rex*, la grulla coronada cuelligrís *Balearica regulorum*, el casuario *Casuaris casuaris*, la avestruz *Struthio camellus* y el turaco gigante *Corythaeola cristata*, ya que no fue posible acoplar al grupo hemo. Por otro lado, el acoplamiento molecular del grupo hemo mostró a esta molécula interactuando con el átomo de hierro coordinado por la histidina proximal 93 de la Mb, como se ha reportado previamente para el resto de las especies (Figura 34).



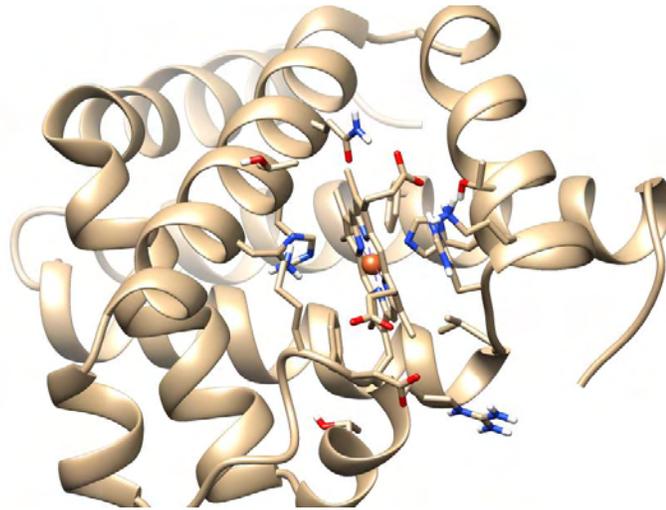


Figura 31. Acoplamiento molecular del grupo hemo con la apoMb del arao común *Uria lomvia*. Se pueden apreciar diferentes vistas de la mejor configuración predicha por Autodock-Vina con una afinidad estimada en -9.0 Kcal/mol.

En la Mb de estas aves, el programa estimó una interacción mediana por el grupo hemo (FeII) de -9.0 Kcal/mol, con un rango entre -8.3 y -9.4 Kcal/mol, representando un complejo altamente estable.

La mejor configuración del oxígeno unido a la Mb de estas especies concuerda con lo esperado (Figura 35), coordinada por la histidina distal 64 y el átomo de hierro del grupo hemo (FeII). Exhibía una afinidad mediana de -1.0 Kcal/mol en un rango entre -0.86 y -1.15 Kcal/mol.

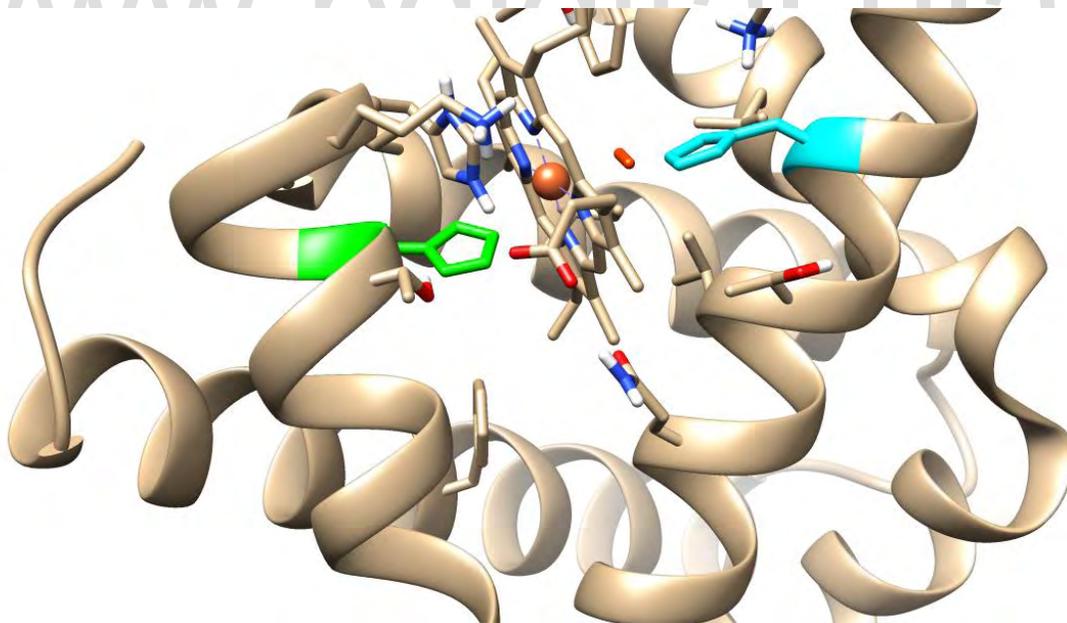


Figura 32. Acoplamiento molecular del oxígeno con la Mb de la paloma *Columba livia*. Se puede observar la molécula de oxígeno (naranja), entre la histidina distal 64 (azul) y el átomo de hierro, coordinado por la histidina proximal 93 (verde).

También se rescató la configuración de la interacción de la glucosa-6-fosfato como fue descrita (Nasreen et al., 2020), justo en la entrada de la cavidad, donde estabiliza al grupo hemo (Figura 36) con una interacción mediana de -4.8 Kcal/mol, en un rango entre los -4.4 y -5.3 Kcal/mol.

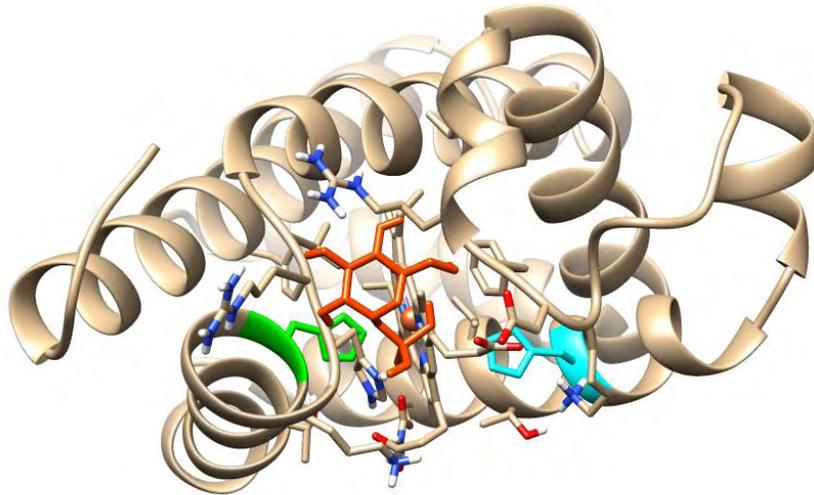


Figura 33. Acoplamiento molecular de la glucosa-6-fosfato, en rojo, con la Mb del ganso indio *Anser indicus*.

En cambio, el lactato parece asociarse fuera del bolsillo del grupo hemo, entre el extremo terminal de la hélice F, el comienzo de la hélice G y el extremo terminal de la hélice H, junto al giro FG (Figura 37). Como esta molécula representa un regulador heterotrópico de la Mb, esta configuración con una energía mediana de -3.8 Kcal/mol y un rango entre los -3.5 y -3.9 Kcal/mol, puede sugerir la inducción de un cambio estructural en esta región asociado a la reducción de la afinidad de la Mb por sus ligandos (Giardina et al., 1996), tal vez relacionado con un desplazamiento de la histidina proximal 93.

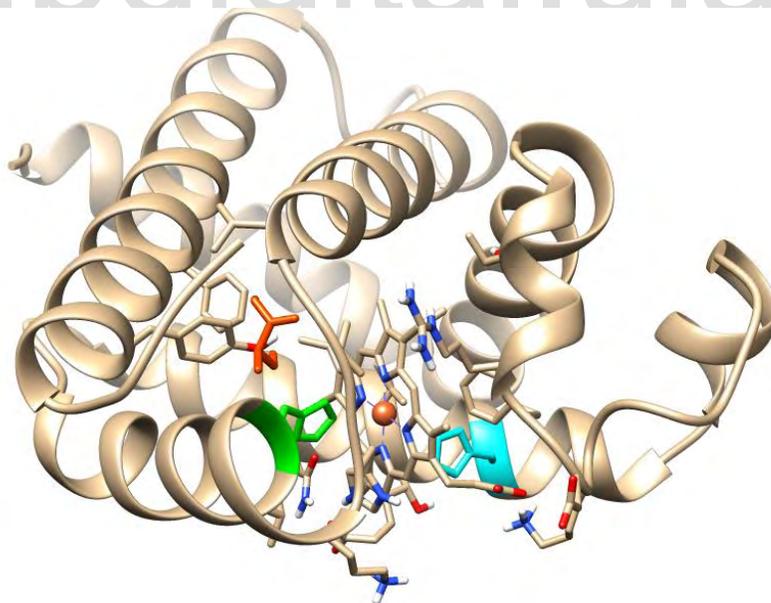


Figura 34. Acoplamiento molecular del lactato (naranja), en rojo, con la Mb del hoacín *Opisthocomus hoazin*.

Como era esperado, el monóxido de nitrógeno presenta su mejor configuración al interactuar con la histidina distal 64 y el átomo de hierro (FeII) (Figura 38) con una energía mediana de -0.8 Kcal/mol, en un rango entre los -0.6 y -1.0 Kcal/mol, similar a la interacción de la Mb con el oxígeno.

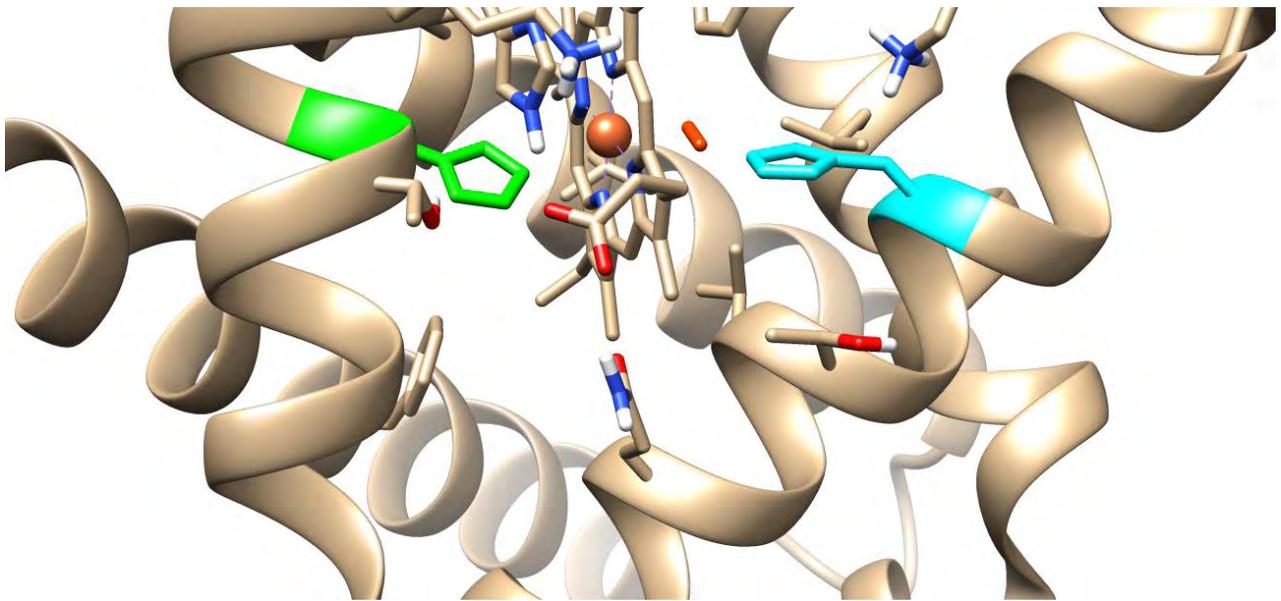


Figura 35. Acoplamiento molecular del monóxido de nitrógeno con la Mb del saltarín cuallidorado *Manacus vitellinus*. Se puede notar al monóxido de nitrógeno (naranja) entre la histidina distal 64 (azul) y el átomo de hierro, coordinado por la histidina proximal 93 (verde).

Finalmente, la configuración del sulfuro de dihidrógeno resultó ser parecida tanto al oxígeno como al monóxido de nitrógeno, con la molécula coordinada por la histidina distal 64 y el átomo de hierro de la metMb (FeIII) (Figura 39), con una energía mediana de -0.1 Kcal/mol, en un rango entre -0.3 y 0 Kcal/mol.

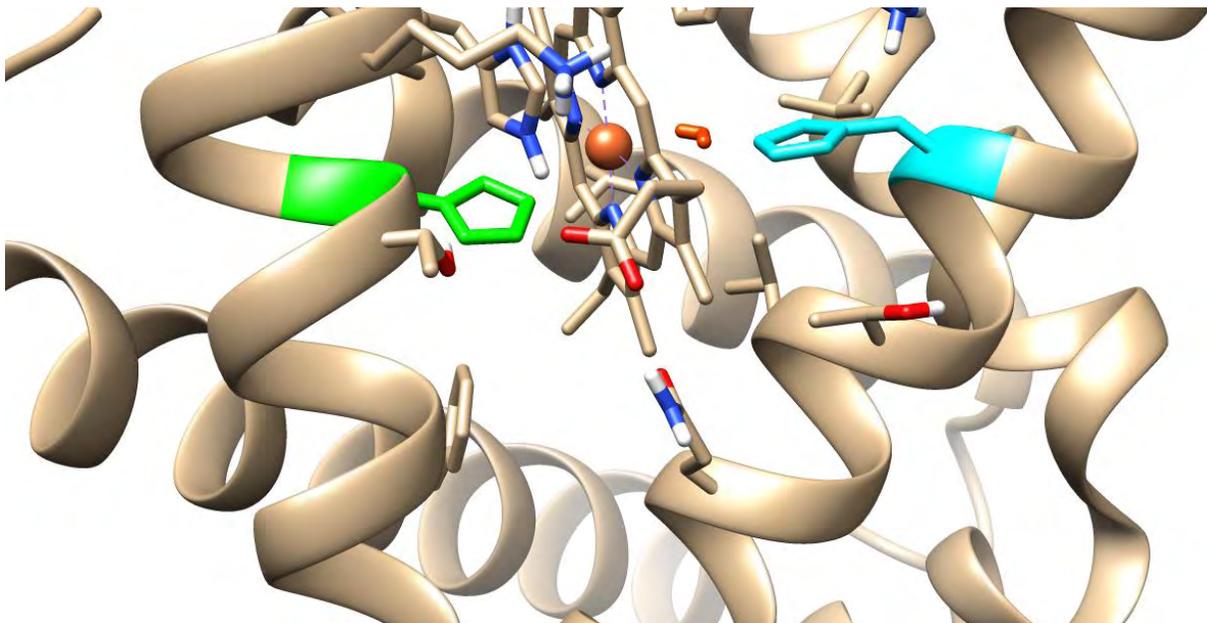


Figura 36. Acoplamiento molecular del sulfuro de dihidrógeno con la metMb del pájaro paraguas *Cephalopterus ornatus*. Se aprecia a esta molécula entre la histidina distal 64 y el átomo de hierro.

Al igual que la carga neta de esta proteína, se elaboraron diversos modelos por medio de regresiones PMGLS, evaluando las mismas variables. No se encontró una asociación entre la afinidad de estos compuestos y las características ecomorfológicas o moleculares evaluadas en estas especies.

### Pruebas de neutralidad

Al someter el alineamiento múltiple de las secuencias codificantes de estas especies a los algoritmos MEME (Efectos de Modelos de Evolución Mixta) y FUBAR (Aproximación Rápida Bayesiana Sin Restricciones) en el servidor de Datamonkey con los parámetros estándares (Weaver et al., 2018), se examinaron rastros de selección positiva y negativa a nivel de sitio en esta proteína.

MEME encontró tasas de sustitución no sinónimas significativamente mayores ( $p < 0.1$ ) a las sinónimas en episodios de selección positiva en los sitios 13, 24, 27, 42, 48, 54, 66, 122, 127, 144 y 153 (Figura 40).

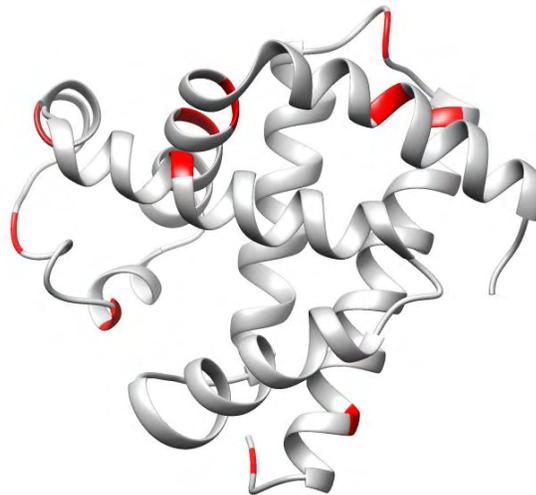


Figura 37. Posición de los sitios de la Mb con episodios de selección positiva señalados en rojo, elaborado en MEME.

FUBAR por su parte, sugiere con una probabilidad posterior de 0.9, la existencia de 113 sitios bajo selección negativa (varios candidatos de convergencias) y 5 sitios con rastros de selección positiva, en las posiciones 13, 27, 66, 127 y 144 (Figura 41). De nuevo, dos fueron encontrados en los análisis de convergencia. Si se reduce la probabilidad posterior a 0.7, los sitios 45, 58 y 110 también exhiben rastros de selección positiva, dos de ellos mencionados anteriormente (C58 en pingüinos y un mosquitero, y la posible convergencia 110).

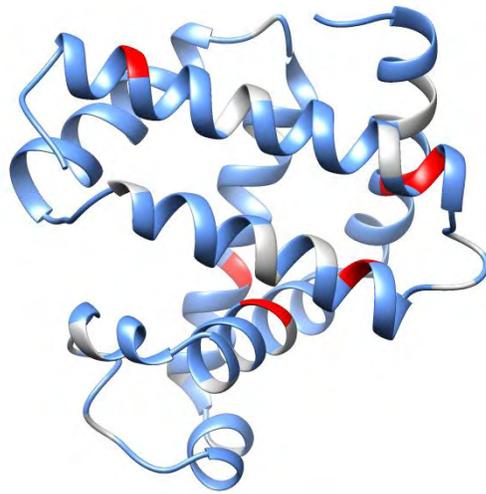


Figura 38. Posición de los sitios de la Mb con episodios de selección positiva señalados en rojo y episodios de selección negativa en azul, con una probabilidad posterior mayor o igual a 0.8, elaborado en FUBAR.

## www.bdigital.ula.ve **Discusión**

### Recolección y análisis de las secuencias de mioglobina

Los resultados del tblastn contra los genomas no anotados de aves concuerdan con el origen y evolución reportado para las globinas específicas de vertebrados mandibulados, ya que los *hits* de menor valor E representan parálogos de la mb, donde la citoglobina resultó presentar la mayor similitud aunque posee cuatro exones, en vez de los tres de la mb, y codifica una proteína de alrededor de 190 aa. Después, los menores valores E los exhibían Hbs, GbE y GbY; seguidos por otras globinas, que conservan el característico pliegue de esta familia de proteínas.

Después de evaluar la estructura del locus modelado en GeneWise, hallamos la mayor variación de longitud en los intrones que parecen estar libres, hasta cierto punto, de la fuerte selección purificadora que probablemente experimentan los exones. Especialmente el segundo exón, que concentra la mayor parte del bolsillo del grupo hemo y éste es altamente conservado incluso en toda la familia de las globinas (Storz et al., 2011). La diversidad estructural de los intrones puede atribuirse a la presencia de números variables de repeticiones en tándem (VNTR) en el primer intrón, como los descritos en la mb de humanos *H. sapiens* (Weller et al., 1984) y el gorrión común *Passer domesticus* (Johansson, et al., 2008). Además, existen diversos eventos pequeños de inserciones y deleciones a lo largo del gen en múltiples especies de aves, donde las del segundo intrón han sido extremadamente valiosas en la reconstrucción de las relaciones filogenéticas de aves lejanamente relacionadas (Alström et al., 2006; Irestedt et al., 2002; Johansson, et al., 2008; Jønsson et al., 2008; Nguembock et al., 2009). Su presencia es consistente con las ligeras diferencias en la longitud del gen entre individuos de la misma especie (diferentes subespecies o poblaciones), como la mb del ánade real *Anas platyrhynchos*

*platyrhynchos* y *Anas platyrhynchos domesticus*, los dos individuos de la golondrina común *Hirundo rustica* y los dos individuos de lavandera blanca *Motacilla alba* evaluados.

El hecho de encontrar a la mb en tan variadas orientaciones y cromosomas, nos indica la presencia de un gran número de reordenamientos cromosómicos de pequeña y gran escala que han ocurrido durante la evolución de las aves. La magnitud de éstas sólo podrá ser dilucidada estudiando la sintenia cromosómica.

La alta similaridad que presentan todas estas especies en la mioglobina tanto a nivel de gen como de proteína es un reflejo directo de la pausada evolución que experimenta, posiblemente causada por una fuerte selección purificadora, tan pausada que se esperan alrededor de 17 mutaciones puntuales/100aa/10<sup>8</sup> años(Storz et al., 2011), los 54 sitios conservados resultan indispensables en la formación del pliegue de globinas y el funcionamiento de la Mb. Esto podría explicar la reiterada emergencia de secuencias codificantes idénticas en diferentes especies y géneros de aves, representando una coalescencia profunda donde los eventos de especiación ocurrieron mucho antes de cualquier cambio en la mb<sup>2</sup>. Sin embargo, este fenómeno puede ser el resultado de múltiples eventos de introgresión, frecuente entre algunos de los grupos evaluados(Lovette & Fitzpatrick, 2016).

Anteriormente se había reportado la delección del aa 121 (GH3) en el género *Falco*(Enoki et al., 2008; Longmire et al., 1988), pero resulta sorprendente encontrar la misma delección el alcatraz enmascarado *Sula dactylatra*. El resto de las aves presenta una alanina o serina en esta posición, la cual se encuentra justo en el centro del giro entre las hélices G-H, y podría estar involucrada en modificaciones post-transduccionales. Por esta razón, junto a los cambios estructurales que conlleva dicha delección, resulta un potencial candidato experimental.

También resalta la ausencia de serina en la posición aa 117 en Archelosauria; en su lugar se observa un ácido glutámico en este sitio, ya que se ha descrito en mamíferos que la Ser 117 está sujeta a cambios post-transduccionales(Stewart et al., 2004) y se conserva en los demás grupos evaluados.

Por otro lado, los residuos de cisteínas presentes en pocas especies de aves podrían aumentar la carga neta de su Mb y desempeñar una importante función reguladora de su actividad enzimática, ya que su nitrosilación aumentaría la afinidad por los sustratos, posiblemente presentando un cambio de comportamiento en función de la concentración del monóxido de nitrógeno, como lo exhibe el ser humano *H. sapiens*, la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* y el salmón del atlántico *Salmo salar*(Helbo et al., 2014; Helbo & Fago, 2011; Rayner et al., 2005). Éstos se encuentran principalmente en la superficie externa de la Mb, accesible a posibles modificaciones, y la Cys 108 se ubica en el centro del bolsillo del grupo hemo, tan solo una posición por encima de la cisteína regulatoria 107 en humanos *H. sapiens* y la trucha arcoíris *O. mykiss*. Además, estas cisteínas podrían actuar como una reserva de monóxido de nitrógeno y reaccionar con otros ROS(Rayner et al., 2005; Witting et al., 2000).

Del mejor árbol filogenético libre de restricciones topológicas, pueden rescatarse varias observaciones. En primer lugar, exhibe al aligátor del Yangtsé como la especie más cercanamente relacionada con las tortugas (Testudines) que al interpretarlo bajo la hipótesis Archelosauria, sugiere que estos grupos conservaron una mioglobina más similar al ancestro común y que la mioglobina de las aves divergió considerablemente. De igual forma, el ser humano aparece como grupo hermano de los cetáceos, en vez de los pinnípedos.

También rescata al pequeño moa de arbusto *A. didiformis* como el pariente más cercano de los t́namos (Tinamiformes), acorde con las ́ltimas hip3tesis filogen3ticas.

El hecho de que 3ste 3rbol filogen3tico no pudo reconstruir la topoloǵa de trabajo actual de los 3rdenes de aves, s3lo refleja la conservada evoluci3n de la secuencia codificante de la mb y la acelerada diversificaci3n de estos grupos, un fen3meno com3n en la filogen3mica de aves (Lovette & Fitzpatrick, 2016).

Por otro lado, sobresale la distribuci3n de las especies del Orden Caprimulgiformes, donde el grupo hermano del gu3charo *Steatornis caripensis* corresponde a los [Pangalloansarae + *Sagittarius serpentatus*], y el pot3 gigante, es la especie hermana del carraca curol malgache *Leptosomus discolor*. Los colibŕes son el grupo hermano del buco misi3 *Bucco capensis* y los apodidos est3n en una politoḿa junto a los [trogoniformes+Bucerornithiformes] y los paleognatos.

Esta asociaci3n [Pangalloansarae + *Sagittarius serpentatus*] evita que se rescate a los Accipitriformes, donde la familia Accipitridae presenta como grupo hermano las especies [*Gavia stellata* + *Herpetotheres cachinnans*]. De igual forma, los Pelecaniformes quedan dispersos en distintas partes del 3rbol.

La existencia de varios de estos grupos claramente polifil3ticos, pone en evidencia la presencia de m3ltiples homoplasias que podŕan estar relacionas con eventos de convergencia.

### Modelado de la estructura terciaria de la Mb y su carga neta

El elevado grado de conservaci3n de la Mb facilit3 el modelado de su estructura terciaria por m3todos de homoloǵa y la estimaci3n de sus diferentes propiedades fisicoquímicas. Al comparar nuestro modelo de la estructura terciaria de la Mb humana *H. sapiens* con los modelos de referencia de Swiss-Model y Alphafold, se puede apreciar pr3cticamente una sola estructura con el grupo hemo y los aa que interactúan con 3ste en la misma configuraci3n; s3lo se distinguen los tres modelos en una corta secci3n de los extremos N-terminal y C-terminal debido a la presencia de varias glicinas y prolinas en estas secciones.

Comparar la carga neta de la Mb en un rango de pH tan amplio nos permiti3 reconocer un patr3n que se mantiene tanto en condiciones fisiol3gicas como fuera de 3stas, donde las especies capaces de bucear exhiben los valores m3s elevados. En el caso de los reptiles escamados, la mayoŕa presentaba cargas cercanas a cero o negativas posiblemente asociado a su reducida demanda metab3lica y reducido tamaño. A3n se desconoce el efecto que tiene sobre la fisioloǵa del m3sculo una Mb con carga negativa, pero es sabido que la carga positiva permite el contacto f́sico de esta proténa con la membrana plasm3tica y la membrana externa de la mitocondria, posiblemente facilitando a3n m3s la difusi3n del oxígeno (Postnikova et al., 2009) especialmente si existe una elevada concentraci3n de Mb en el m3sculo (correlacionada con una elevada carga de la misma), 3sta puede incrementar el flujo de oxígeno de la sangre hasta las mitocondrias del m3sculo (Tomita et al., 2010).

En este grupo la salamangua asi3tica *Gekko japonicus*, con 2.50 e, queda como un punto extremo con una carga m3s parecida al resto de los amniotas. Esto puede indicar un sesgo en la muestra seleccionada de lagartos escamados, que no refleja la diversidad de carga de la Mb en el grupo o puede estar asociada al particular modo de locomoci3n de este grupo. Por otro lado, parece que las especies

acuáticas de tortugas presentan una Mb con mayor carga, pero este patrón sólo podrá ser confirmado después de evaluar un mayor número de especies.

Resulta alentador la concordancia entre nuestros valores de carga estimados *in silico* para cetáceos y pinnípedos y los reportados para estos grupos (Mirceta et al., 2013), diferenciándose tan sólo en centésimas. Valores obtenidos por dos métodos muy diferentes que pueden indicar una elevada exactitud en ambas estimaciones.

En aves es notable la congregación de múltiples especies en determinadas cargas, tal vez evidencia de fuertes restricciones estructurales en la evolución de esta proteína. Y la reducida carga del colibrí de ana *C. anna*, una especie parcialmente migratoria, con una de las tasas metabólicas de reposo más altas reportadas (Newton, 2008) cuestiona todo el razonamiento de nuestra pregunta de investigación, es posible que esta especie no suela experimentar condiciones de hipoxia y que su pequeño tamaño (peso medio de 4.25 g) junto a su eficiente sistema respiratorio, logran el vuelo con concentraciones bajas de Mb. Además, el alto contenido de azúcares de su dieta podría permitir a estos organismos acumular altas concentraciones de glucosa o fructosa en el músculo que se asociarían a la Mb y aumentaría así la afinidad por sus sustratos (posiblemente glucosilada), o tal vez mantienen el citosol de los músculos a un pH menor que 7 y así aumentan la concentración de la Mb en los músculos.

También la mayor carga exhibida por el colibrí altiandino *O. melanogaster*, comparado con el colibrí de ana *C. anna*, podría indicar la existencia de una clina altitudinal en la carga y concentración de la Mb en troquílidos, debido a la disminución de la presión parcial del oxígeno. Se trataría de algo similar a lo reportado en algunos grupos de mamíferos (Wright & Davis, 2015), que no se puede asegurar, no obstante, comparando solamente estas dos especies.

Los cormoranes y cotúas presentan claras adaptaciones al buceo y, la elevada carga de la Mb (~4 e) posiblemente representa una más, permitiendo a estos organismos alcanzar profundidades considerables [hasta los 94 m (Watanabe et al., 2011)] por un prolongado tiempo [hasta 306 s (Watanabe et al., 2011)]. De igual forma, la elevada carga neta de los pingüinos (~5 e) cargas junto a la presencia de múltiples cisteínas y otras posibles adaptaciones al buceo, posibilitan que estas aves alcancen grandes profundidades [más de 500 m (Lovette & Fitzpatrick, 2016)] y se sumerjan por un tiempo prolongado (Weber et al., 1974), estos valores concuerdan con las elevadas concentraciones de Mb reportadas para estas aves (las mayores en todos los vertebrados) y también con la afinidad de ésta por el oxígeno con los menores P50 registrados (Wright & Davis, 2015).

Esta elevada carga neta positiva permite una mayor concentración de la Mb en los músculos esqueléticos y cardíaco, ya que la repulsión electrostática impide la asociación y precipitación de estos monómeros (evitando daño celular) (Mirceta et al., 2013) y, la carga es inversamente proporcional a la distancia de Debye (el radio de la capa de iones que apantallan dicha carga) reduciendo así el tamaño efectivo de la proteína. También permite una interacción directa de la Mb con la membrana de las mitocondrias y la membrana plasmática (Postnikova et al., 2009).

Resulta difícil asociar la elevada carga del potó gigante *N. grandis* con su estilo de vida, una especie de caprimulgiforme neotropical de tierras bajas, es posible que experimente condiciones de hipoxia. Y la menor carga encontrada en el águila real *A. chrysaetos chrysaetos*, comparado con los demás accipítridos, es contrario a lo reportado (Rizvi et al., 2021), si esta especie presenta una elevada concentración de esta proteína en los músculos, podría ser explicado por un evento de aclimatación a la altitud al mantener un menor pH del citosol muscular que las especies de tierras bajas; y algo similar

puede estar ocurriendo con el ganso indio *A. indicus* y la mayor concentración reportada de Mb comparado con las especies afines de tierras bajas (Lovette & Fitzpatrick, 2016).

Después de elaborar los PMGLS, se rescata un patrón más general, mayores cargas de Mb en todas aquellas especies de aves capaces de bucear, y una asociación positiva con la masa de las aves y la carga de la Mb, ésta podría sugerir una disminución en la eficiencia respiratoria a medida que aumenta la masa del ave. Pero contrario a lo esperado, la exposición a la hipoxia hipobárica no está asociada a una mayor carga de la Mb, por esto no es necesario usar el noble concepto de la adaptación en la evolución de la carga neta de esta proteína en aves migratorias de largas distancias; que lidian con las extremas condiciones de sus vuelos a través de otros mecanismos.

Las reconstrucciones ancestrales permiten afirmar que la capacidad de buceo en aves evolucionó de forma independiente y las principales desviaciones de la evolución de la Mb del modelo de evolución aleatoria están asociadas a un cambio significativo en la carga de la Mb, con un aumento en las especies capaces de bucear y una disminución en troquílidos y Tinamiformes; junto a grandes cambios en la masa en diferentes grupos, congruentes con los PGMLS elaborados.

### Identificación de sustituciones convergentes

El hecho de no encontrar candidatos a sustituciones convergentes en las aves migratorias de largas distancias concuerda con la no asociación entre la carga neta de la Mb y el estado migratorio, y evidencia que tampoco ocurrieron convergencias a nivel de aa asociadas al estado migratorio y la afinidad de la Mb por sus sustratos.

La variabilidad encontrada en las TFN dependía del número de especies involucradas junto al tipo de sustitución, si representaba una o varias transiciones o transversiones. El modelo PC al no encontrar en ningún caso una sustitución convergente, sugiere un alto grado de conservación en los cambios a nivel de proteína que experimenta la Mb sin evidentes cambios de perfiles en los aa. Sin embargo, éstos fueron identificados por el modelo PCOC que presenta una mayor potencia (Rey et al., 2018).

La histidina, lisina, arginina o glutamina que presentan aquellas especies de aves en el sitio 9 representa una convergencia asociado a un significativo aumento en la carga neta de la Mb ( $> 3 e$ ), mostrando de forma evidente las restricciones que limitan el cambio de esta propiedad, y su ubicación en el inicio del bolsillo del grupo hemo podría sugerir que está involucrada en las rutas superficiales en el flujo de los diversos ligandos de esta enzima (Tomita et al., 2010).

La otra convergencia encontrado en la posición 66 entre el zambullidor colombino *G. stellata* y los mosquiteros (Phylloscopidae) es muy significativo, esta cisteína podría estar involucrada en un mecanismo regulatorio del monóxido de nitrógeno (Helbo & Fago, 2011; Rayner et al., 2005; Tejero & Gladwin, 2014) asociado a la capacidad de buceo de los zambullidores [ $> 100$  m de profundidad (Lovette & Fitzpatrick, 2016)] y el vuelo de estas aves de percha, posiblemente la única adaptación encontrada relacionada con las extremas condiciones de vuelo que experimentan estas aves capaces de migrar largas distancias (Newton, 2008).

En el otro candidato a convergencia encontrado en la posición 22 entre pingüinos, álcidos, zambullidores, cetáceos y pinnípedos; la alanina podría estar involucrada en la estabilidad estructural de la proteína (Lin et al., 1994), la treonina podría aumentar la carga de la misma y la prolina podría alterar de forma significativa la estructura circundante. Éstos representan cambios estructurales asociados con su capacidad de buceo. Al igual que el paralelismo que exhiben estos grupos en la posición 110, donde

esta alanina además de aportar estabilidad a la estructura, permite conectar los bolsillos fantasmas Ph1 y Ph2 junto a los bolsillos Xe4 y Xe2, que regulan el paso de los sustratos fuera del sitio activo (Tomita et al., 2010). También se ha propuesto la posibilidad del transporte de ligandos en estos bolsillos, aumentando la capacidad de carga de la Mb por el oxígeno (Tomita et al., 2010). De forma similar a la hemocianina, estos poros podrían transportar lípidos y hormonas (Tomita et al., 2010).

Algo similar ocurre en la posición 57 entre los Suliformes y mamíferos acuáticos evaluados, de nuevo, la alanina puede estar involucrada en la estabilización de la estructura y la arginina podría conferir una mayor carga.

También, la convergencia encontrada en el sitio 45 en aquellas aves con una elevada carga neta de Mb (> 4 e), con una lisina o arginina, expone nuevamente las fuertes restricciones que tiene la evolución de esta propiedad. Al igual que la maravillosa convergencia identificada en los animales buceadores evaluados, con una alanina, glutamina, ácido glutámico o ácido aspártico en la posición 27; donde la alanina podría estar asociada a una mayor estabilidad (Lin et al., 1994), y los demás aa parecen aumentar la carga neta de la Mb.

Finalmente, los múltiples candidatos de sustituciones convergentes encontradas entre los cormoranes, cotúas y el potó gigante *N. grandis* están involucradas en el considerable aumento que presentan estos grupos en la carga neta de sus Mb, que nuevamente está altamente restringida en los sitios 9, 27, 34 y 45.

Todas estas posibles convergencias representan claros candidatos para experimentación.

### Estimación de la afinidad de la Mb por distintos ligandos

En el pico de zapato *Balaeniceps rex*, la grulla coronada cuelligrís *Balearica regulorum*, el casuario *Casuaris casuaris*, la avestruz *Struthio camellus* y el turaco gigante *Corythaeola cristata* no fue posible acoplar al grupo hemo en su respectivo bolsillo; esto se debió probablemente a ligeras desviaciones en sus estructuras terciarias de los respectivos modelos elaborados.

Como era esperado, el acoplamiento del grupo hemo a las apoMbs resulta en una interacción altamente favorable que es consistente con esta unión irreversible incluso a bajas concentraciones del grupo hemo (~nM) dentro de las condiciones del citosol muscular (Kundu, et al., 2015).

El acoplamiento molecular sugiere que tanto la glucosa-6-fosfato como el lactato son moduladores de la actividad enzimática de la Mb en aves. En el primero, se espera que la glucosa-6-fosfato estabilice al grupo hemo y al mismo tiempo desestabilice la proteína en general, un proceso que se ha evaluado a partir de una concentración de 0.5 M (Nasreen et al., 2020) y es consistente con el reportado incremento del transporte de glucosa hacia los músculos estimulado por el ejercicio (P. J. Butler, 1991). En el segundo, se ha descrito con anterioridad la inhibición del lactato sobre la curva de asociación de la Mb con el oxígeno a partir de los 0.2 M (Giardina et al., 1996) concentraciones inferiores a las que alcanza el músculo esquelético de las aves durante el ejercicio (P. J. Butler, 1991) y parece que el mecanismo involucra una distorsión e la estructura del bolsillo del grupo hemo al desplazar la hélice H.

Por otro lado, la afinidad reportada para el oxígeno y el monóxido de nitrógeno entra en un orden de magnitud esperado para interacciones reversibles. Y la reducida afinidad encontrada entre la Mb y el

sulfuro de dihidrógeno podría indicar la ausencia de un intermediario desconocido en dicha reacción (Bostelaar et al., 2016).

### Pruebas de neutralidad

Dos de los sitios identificados en los análisis de convergencia (27 y 66) mostraron rastros de selección positiva en MEME y también fueron identificados por FUBAR, junto a las convergencias de los sitios 45, 58 y 110, representan claras adaptaciones asociadas a la capacidad de buceo y el metabolismo del monóxido de nitrógeno. El resto de las convergencias identificadas muestran fuertes rastros de selección negativa y parecen ser adaptaciones asociadas al aumento en la carga, causante de su restringida evolución.

La mayoría de los sitios con huellas de selección positiva, que no fueron identificados en los análisis de evolución convergente, están altamente conservados en aves, y parecen ser sinapomorfías de este grupo que pueden estar asociados a la evolución del vuelo activo.

## **Conclusión**

Los procedimientos anteriores nos permitieron analizar la estructura de la Mb desde un contexto evolutivo. En su pausada evolución, regida por una selección purificadora, las especies que poseen cargas netas de Mb similares suelen compartir un ancestro común reciente. Sin embargo, sobresale la maravillosa convergencia adaptativa encontrada entre aves y mamíferos acuáticos capaces de llevar a cabo prolongadas inmersiones en la búsqueda activa de presas. Éstos acumularon de forma independiente diferentes sustituciones a nivel de proteína que incrementaron la carga neta de la Mb.

Incluso encontramos sorprendentes paralelismos en estos grupos, relacionados con un aumento de la carga neta de la Mb, un incremento en la estabilidad de la proteína y el metabolismo del monóxido de nitrógeno.

Por otro lado, descubrimos que la carga neta de la Mb no evolucionó de forma convergente en las aves migratorias de largas distancias y éstas resisten a las extremas condiciones de sus vuelos por medio de otros mecanismos.

Finalmente, las convergencias descritas no parecen afectar directamente la afinidad de la Mb por sus ligandos, ya que el bolsillo del grupo hemo se encuentra altamente conservado. Y con los hallazgos del acoplamiento molecular se pudo proponer a la glucosa-6-fosfato y el lactato como posibles moduladores de la Mb en aves.

## Referencias

- Abascal, F., Zardoya, R., & Telford, M. J. (2010). TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Research*, 38, W7-13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq291>
- Alström, P., Ericson, P., Olsson, U., & Sundberg, P. (2006). Phylogeny and classification of the avian superfamily Sylvioidea. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 381-397. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.05.015>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Berthold, P. (1996). *Control of Bird Migration*. Chapman & Hall.
- Berthold, P., Gwinner, E., & Sonnenschein, E. (2003). *Avian migration*. Springer-Verlag.
- Birney, E., & Clamp, M. (2004). GeneWise and GenomeWise. *Genome research*, 14, 988-995. <https://doi.org/10.1101/gr.1865504>.
- Bostelaar, T., Vitvitsky, V., Kumutima, J., Lewis, B., Yadav, P., Brunold, T., Filipovic, M., Lehnert, N., Stemmler, T., & Banerjee, R. (2016). HYDROGEN SULFIDE OXIDATION BY MYOGLOBIN. *Journal of the American Chemical Society*, 37. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b03456>
- Butler, P. (2004). Metabolic regulation in diving birds and mammals. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 141, 297-315. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.01.010>
- Butler, P. J. (1991). Exercise in Birds. *Journal of Experimental Biology*, 160(1), 233-262. <https://doi.org/10.1242/jeb.160.1.233>
- Daanea, J. M., Giordanob, D., Coppolab, D., di Priscob, G., Detrich III, H. W., & Verdeb, C. (2020). Adaptations to environmental change: Globin superfamily evolution in Antarctic fishes. *Marine Genomics*, 49(100724), 1874-7787. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.100724>
- Darriba, D., Posada, D., Kozlov, A., Stamatakis, A., Morel, B., & Flouri, T. (2020). ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. *Molecular Biology and Evolution*, 37, 291-294. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>
- Endler, J. A. (1977). *Geographical variation, speciation, and clines* (1.<sup>a</sup>ed.). Princeton University Press.
- Enoki, Y., Ohga, Y., Ishidate, H., & Morimoto, T. (2008). Primary structure of myoglobins from 31 species of birds. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 149, 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.07.006>
- Futuyma, D. (2009). *Evolution*. SINAUER ASSOCIATES.
- Garry, D. J., Ordway, G. A., Lorenz, J. N., Radford, N. B., Chin, E. R., Grange, R. W., Bassel-Duby, R., & Williams, S. (1998). Mice without myoglobin. *Nature*, 395(6705), 905-908. <https://doi.org/10.1038/27681>
- Giardina, B., Ascenzi, P., Clementi, M., De Sanctisi, G., Rizzi, M., & Coletta, M. (1996). Functional Modulation by Lactate of Myoglobin. *The journal of biological chemistry*, 271, 16999-17001.
- He, K., Eastman, T. G., Czolacz, H., Li, S., Shinohara, A., Kawada, S., Springer, M. S., Berenbrink, M., & Campbell, K. L. (2021). Myoglobin primary structure reveals multiple convergent transitions

- to semi-aquatic life in the world's smallest mammalian divers. *eLife*, *10*(e66797), 1-27.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.66797>
- Helbo, S., & Fago, A. (2011). Allosteric modulation by S-nitrosation in the low-O<sub>2</sub> affinity myoglobin from rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *300*, 101-108.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00374.2010>
- Helbo, S., Gow, A., Jamil, A., Howes, B., Smulevich, G., & Fago, A. (2014). Oxygen-Linked S-Nitrosation in Fish Myoglobins: A Cysteine-Specific Tertiary Allosteric Effect. *PLoS ONE*, *9*, e97012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097012>
- Hoffmann, F. G., Opazo, J. C., & Storz, J. F. (2011). Differential Loss and Retention of Cytoglobin, Myoglobin, and Globin-E during the Radiation of Vertebrates. *Genome Biology and Evolution*, *3*, 588-600. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr055>
- Hoffmann, F. G., Opazo, J. C., & Storz, J. F. (2012). Whole-Genome Duplications Spurred the Functional Diversification of the Globin Gene Superfamily in Vertebrates. *Molecular Biology and Evolution*, *29*(1), 303-312. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr207>
- Holm, J., Dasmeh, P., & Kepp, K. P. (2016). Tracking evolution of myoglobin stability in cetaceans using experimentally calibrated computational methods that account for generic protein relaxation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1864*(7), 825-834. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.04.004>
- Irestedt, M., Fjeldsa, J., Johansson, U., & Ericson, P. (2002). Systematic relationships and biogeography of the tracheophone suboscines (Aves: Passeriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *23*, 499-512.
- Jetz, W., Thomas, G., Joy, J., Hartmann, K., & Mooers, A. (2012). The global diversity of birds in space and time. *Nature*, *491*, 444-448. <https://doi.org/doi:10.1038/nature11631>
- Johansson, U., Fjeldsa, J., & Bowie, R. (2008). Phylogenetic relationships within Passerida (Aves: Passeriformes): A review and a new molecular phylogeny based on three nuclear intron markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *48*, 858-876.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.05.029>
- Jønsson, K., Irestedt, M., Fuchs, J., Ericson, P., Christidis, L., Bowie, R., Norman, J., Pasquet, E., & Fjeldsa, J. (2008). Explosive avian radiations and multi-directional dispersal across Wallacea: Evidence from the Campephagidae and other Crown Corvida (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *47*, 221-236. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.01.017>
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L., Brookes, D., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D., Nielsen, J., Head-Gordon, T., Geng, W., ... Baker, N. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, *27*, 112-128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, *30*, 3059-3066.
- Kendrew, J. C. (1963). Myoglobin and the structure of proteins. *Science*, *139*(3561), 1259-1266.  
<https://doi.org/10.1126/science.139.3561.1259>
- Kozlov, A., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, *35*, 4453-4455. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>
- Kuhl, H., Frankl-Vilches, C., Bakker, A., Mayr, G., Nikolaus, G., Boerno, S., Klages, S., Timmermann, B., & Gahr, M. (2020). An Unbiased Molecular Approach Using 30-UTRs Resolves the Avian Family-Level Tree of Life. *Molecular Biology and Evolution*, *38*, 108-127.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msaa191>
- Kundu, J., Kar, U., Gautam, S., Karmakar, S., & Chowdhury, P. (2015). Unusual effects of crowders on heme retention in myoglobin. *Federation of European Biochemical Societies*.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.11.015>

- Lee, G. R., Won, J., Heo, L., & Seok, C. (2019). GalaxyRefine2: Simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure. *Nucleic Acids Research*, *47*, 451-455. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz288>
- LIN, L., PINKER, R., PHILLIPS, G., & KALLENBACH, N. (1994). Stabilization of myoglobin by multiple alanine substitutions in helical positions. *Protein Science*, *3*, 1430-1435.
- Longmire, J., Lewis, A., Brown, N., Buckingham, J., Clark, L., Jones, M., Meincke, L., Meyne, J., Ratliff, R., Ray, F., Wagner, R., & Moyzis, R. (1988). Isolation and Molecular Characterization of a Highly Polymorphic Centromeric Tandem Repeat in the Family Falconidae. *Genomics*, *2*, 14-24.
- Lovette, I. J., & Fitzpatrick, J. W. (Eds.). (2016). *The Cornell Lab of Ornithology Handbook of Bird Biology* (3.<sup>a</sup> ed.). Princeton University Press.
- Mirceta, S., Signore, A. V., Burns, J. M., Cossins, A. R., Campbell, K. L., & Berenbrink, M. (2013). Evolution of Mammalian Diving Capacity Traced by Myoglobin Net Surface Charge. *Science*, *340*(1234192), 1-8. <https://doi.org/10.1126/science.1234192>
- Nasreen, K., Imam, A., & Islam, A. (2020). Effect of Glucose on Thermal Stability of Myoglobin: A Biophysical and In silico Approach towards Stabilisation of Protein. *Physical Science & Biophysics Journal*, *4*, 000156.
- NCBI Resource Coordinators. (2018). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D8-D13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>
- Nery, M. F., Arroyo, J. I., & Opazo, J. C. (2013). Accelerated Evolutionary Rate of the Myoglobin Gene in Long-Diving Whales. *Journal of Molecular Evolution*, *76*(6), 380-387. <https://doi.org/10.1007/s00239-013-9572-1>
- Newton, I. (2008). *The Migration Ecology of Birds*. Elsevier Academic Press.
- Nguembock, B., Fjeldsa, J., Couloux, A., & Pasquet, E. (2009). Molecular phylogeny of Carduelinae (Aves, Passeriformes, Fringillidae) proves polyphyletic origin of the genera Serinus and Carduelis and suggests redefined generic limits. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *51*, 169-181. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.10.022>
- Olson, K., DeLeon, E., Gao, Y., Hurley, K., Sadauskas, V., Batz, C., & Stoy, G. (2013). Thiosulfate: A readily accessible source of hydrogen sulfide in oxygen sensing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *305*, 592-603. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00421.2012>
- Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *Journal of Chemical Theory and computation*, *7*(2), 525-537. <https://doi.org/10.1021/ct100578z>
- Opazo, J. C., Lee, A. P., Hoffmann, F. G., Toloza-Villalobos, J., Burmester, T., Venkatesh, B., & Storz, J. F. (2015). Ancient Duplications and Expression Divergence in the Globin Gene Superfamily of Vertebrates: Insights from the Elephant Shark Genome and Transcriptome. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(7), 1684-1694. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv054>
- Orme, D., Freckleton, R., Thomas, G., Petzoldt, T., Fritz, S., Isaac, N., & Pearse. (2013). The Caper Package: Comparative Analysis of Phylogenetics and Evolution in R. *R package version*, *5*, 1-36.
- Pages, T., & Planas, J. (1982). Muscle myoglobin and flying in Birds. *Comparative Biochemical Physiology*, *74*, 289-294.
- Pennycuik, C. J. (1989). *Bird flight performance: A practical calculation manual*. Oxford University Press.
- Postnikova, G., Tselikova, S., & Shekhovtsova, E. (2009). Myoglobin and Mitochondria: Oxymyoglobin Interacts with Mitochondrial Membrane during Deoxygenation. *Biochemistry (Moscow)*, *74*, 1211-1218. <https://doi.org/10.1134/S0006297909110054>
- Rappole, J. H. (2013). *The avian migrant: The biology of bird migration*. Columbia University Press.

- Rayner, B., Wu, B.-J., Raftery, M., Stocker, R., & Witting, P. (2005). Human S-Nitroso Oxymyoglobin Is a Store of Vasoactive Nitric Oxide. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *11*, 9985-9993. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410564200>
- Revell, L.J. (2012). phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, *3*, 217-223. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x>
- Rey, C., Guéguen, L., Sémon, M., & Boussau, B. (2018). Accurate Detection of Convergent Amino-Acid Evolution with PCOC. *Molecular Biology and Evolution*, *35*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy114>.
- Rizvi, S. M., Zheng, W., Zhang, C., & Zhang, Y. (2021). Computational analysis of vertebrate myoglobins reveals aggregation resistance in aquatic birds and higher surface hydrophobicity in fish. *bioRxiv*, 433090. <https://doi.org/10.1101/2021.02.26.433090>
- Romero-Herrera, A. E., Goodman, M., Dene, H., Bartnicki, D. E., & Mizukami, H. (1981). An exceptional amino acid replacement on the distal side of the iron atom in proboscidean myoglobin—PubMed. *Journal of Molecular Evolution*, *17*(3), 140-147. <https://doi.org/10.1007/BF01733907>
- Rosenblum, E., Parent, C., & Brandt, E. (2014). The Molecular Basis of Phenotypic Convergence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *45*, 203-226. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-120213-091851>
- Sen, S., Bose, T., Roy, A., & Sankar, A. (2007). Effect of non-enzymatic glycation on esterase activities of hemoglobin and myoglobin. *Molecular Cell Biochemistry*, *301*, 251-257. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9418-5>
- Sreenilayam, G., Moore, E., Steck, V., & Fasan, R. (2017). Metal Substitution Modulates the Reactivity and Extends the Reaction Scope of Myoglobin Carbene Transfer Catalysts. *Advanced Synthesis & Catalysis*, *359*, 2076-2089. <https://doi.org/10.1002/adsc.201700202>
- Stewart, J., Blakely, J., Karpowicz, P., Kalanxhia, E., Thatcher, B., & Martinc, B. (2004). Unusually weak oxygen binding, physical properties, partial sequence, autoxidation rate and a potential phosphorylation site of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) myoglobin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, *137*, 401-412. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.01.007>
- Storz, J. F., Opazo, J. C., & Hoffmann, F. G. (2011). Phylogenetic Diversification of the Globin Gene Superfamily in Chordates. *IUBMB Life*, *63*(5), 313-322. <https://doi.org/10.1002/iub.482>
- Studer, R., Christin, P., Williams, M., & Orengo, C. (2014). Stability-activity tradeoffs constrain the adaptive evolution of RubisCO. *PNAS*, *111*, 2223-2228.
- Suman, S., & Joseph, P. (2013). Myoglobin Chemistry and Meat Color. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, *4*, 79-99. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182623>
- Sun, Y., Wang, L., & Liu, H. (2012). Myoglobin functioning as cytochrome P450 for biosensing of 2,4-dichlorophenol. *Analytical methods*, *4*, 3358. <https://doi.org/10.1039/c2ay25574j>
- Suzukia, K., & Imaib, K. (1998). Evolution of myoglobin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *54*(9), 979-1004. <https://doi.org/10.1007/s000180050227>
- Tejero, J., & Gladwin, M. T. (2014). The globin superfamily: Functions in nitric oxide formation and decay. *Biological Chemistry*, *395*(3), 631-639. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0289>
- The UniProt Consortium. (2020). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D480-D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- Tobias, J. (2022). A bird in the hand: Global-scale morphological trait datasets open new frontiers of ecology, evolution and ecosystem science. *Ecology Letters*, *25*, 573-580. <https://doi.org/10.1111/ele.13960>

- Tomita, A., Kreutzer, U., Adachi, S., Koshihara, S., & Jue, T. (2010). 'It's hollow': The function of pores within myoglobin. *Journal of Experimental Biology*, *213*, 2748-2754. <https://doi.org/10.1242/jeb.042994>
- Trott, O., & Olson, A. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, *31*, 455-461.
- Vinogradov, S. N., Hoogewijs, D., Vanfleteren, J., Dewilde, S., Moens, L., & Hankeln, T. (2011). Evolution of the globin superfamily and its function. En *Hemoglobin: Recent development and topics* (pp. 231-254). Research Signpost.
- Voet, D., & Voet, J. G. (2004). *Biochemistry* (3.<sup>a</sup>ed.). John Wiley & Sons.
- Wang, Y. (2020). Myoglobin Post-translational Modifications and Fresh Beef Color Stability. *Theses and Dissertations--Animal and Food Sciences.*, 123. [https://uknowledge.uky.edu/animalsci\\_etds/123](https://uknowledge.uky.edu/animalsci_etds/123)
- Watanabe, Y., Takahashi, A., Sato, K., Viviant, M., & Bost, C.-A. (2011). Poor flight performance in deep-diving cormorants. *The Journal of Experimental Biology*, *214*, 412-421. <https://doi.org/10.1242/jeb.050161>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296-W303.
- Weaver, S., Shank, S. D., Spielman, S. J., Li, M., Muse, S. V., & Kosakovsky, S. L. (2018). Datamonkey 2.0: A modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes. *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 773-777. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx335>
- Weber, R., Hemmingsen, E., & Johansen, K. (1974). Functional and biochemical studies of penguin myoglobin. *Comportamental Biochemical Physiology*, *49*, 197-214.
- Weller, P., Jeffreys, A., Wilson, V., & Blanchetot, A. (1984). Organization of the human myoglobin gene. *The EMBO Journal*, *3*, 439-446.
- Witting, P., Douglas, D., & Grant, A. (2000). Reaction of Human Myoglobin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. INVOLVEMENT OF A THIYL RADICAL PRODUCED AT CYSTEINE 110\*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *275*, 20391-20398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000373200>
- Wright, T. J., & Davis, R. W. (2015). Myoglobin oxygen affinity in aquatic and terrestrial birds and mammals. *Journal of Experimental Biology*, *218*(14), 2180-2189. <https://doi.org/10.1242/jeb.119321>
- Zhang, P., Xu, J., Wang, X.-J., He, B., Gao, S.-Q., & Lin, Y.-W. (2019). The Third Generation of Artificial Dye-Decolorizing Peroxidase Rationally Designed in Myoglobin. *American Chemical Society Catalysis*, *9*, 7888-7893. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b02226>

## Anexo

Tabla 2. Nombre de las especies evaluadas y ubicación de su mb.

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Accipiter_gentilis_atricapillus</i>	JAESIU010004697.1	contig496_0	275754-290599
<i>Accipiter_nisus</i>	BJBX01010910.1	Acni_10910	59325-74168
<i>Aquila_chrysaetos_chrysaetos</i>	NC_044020.1	Cromosoma 17	3367152-3372857
<i>Buteo_japonicus</i>	ML989566.1	scaffold224	2271673-2286520
<i>Circaetus_pectoralis</i>	VZZV01000132.1	scaffold_117	351037-355887
<i>Haliaeetus_albicilla</i>	NW_009773053.1	scaffold11015	20721-15574
<i>Haliaeetus_leucocephalus</i>	NW_010972537.1	Scaffold101	2282224-2277082
<i>Haliaeetus_pelagicus</i>	BMBF01014113.1	Hape_14113	42535-57386
<i>Nisaetus_nipalensis</i>	BJES01001993.1	Nini_1993	5457-20291
<i>Pandion_haliaeetus</i>	VYZV01034330.1	scaffold5952	155804-151053
<i>Sagittarius_serpentarius</i>	VWYJ01014311.1	scaffold1278	99946-95153
<i>Spizaetus_tyrannus</i>	VXAF01000134.1	scaffold_93_2	34269-39103
<i>Anas_platyrhynchos</i>	NC_051772.1	Cromosoma 1	54955488-54961122
<i>Anas_platyrhynchos_platyrhynchos</i>	CAU_duck1.0	Cromosoma 1	54244406-54250983
<i>Anas_zonorhyncha</i>	NOIK01000454.1	scaffold456	121476-153992
<i>Anser_brachyrhynchus</i>	NXHY01000059.1	scaffold_58	2344576-2359292
<i>Anser_cygnoides_domesticus</i>	NW_013185696.1	scaffold163	3598219-3592626
<i>Anser_indicus</i>	VDDG01000105.1	scaffold_1648	8118033-8132666
<i>Anseranas_semipalmata</i>	VXAA01003071.1	scaffold2057	340801-336041
<i>Asarcornis_scutulata</i>	VZSO01000059.1	scaffold547	3476281-3471489
<i>Aythya_fuligula</i>	NC_045559.1	Cromosoma 1	55506848-55516067
<i>Branta_canadensis</i>	ML626558.1	scaffold13	3415125-3429854 140490926- 140505675
<i>Cairina_moschata</i>	CM030749.1	Cromosoma 1	140505675
<i>Chauna_torquata</i>	VXAL01013555.1 JABXOC010000286.	scaffold409	338056-342822
<i>Cygnus_atratus</i>	1	000029F	534497-549222
<i>Cygnus_cygnus</i>	BMBB01021782.1	Cycy_21782	43431-57317
<i>Cygnus_olor</i>	CM020065.2	Cromosoma 1	56123913-56138642
<i>Heteronetta_atricapilla</i>	CM021731.1	Cromosoma 1	55486767-55501522
<i>Nettapus_auritus</i>	CM021765.1	Cromosoma 1	54899243-54913924
<i>Oxyura_jamaicensis</i>	NC_048893.1	Cromosoma 1	54351881-54357339
<i>Stictonetta_naevosa</i>	CM021697.1	Cromosoma 1	53469213-53483972
<i>Apteryx_australis_mantelli</i>	NW_013995860.1	scaffold27	35580843-35582649
<i>Apteryx_haastii</i>	PTFD01000465.1	scaffold_464	246757-262282
<i>Apteryx_owenii</i>	PTFC01000487.1	scaffold_486	246699-262224
<i>Apteryx_rowi</i>	NW_020450698.1	scaffold_443	256367-250595
<i>Buceros_rhinoceros_silvestris</i>	NW_010431076.1	scaffold11949	27422-10882
<i>Bucorvus_abyssinicus</i>	VYZL01003052.1	scaffold1011	495554-500392
<i>Rhinopomastus_cyanomelas</i>	VXBP01004404.1	scaffold356	315946-311082
<i>Upupa_epops</i>	VZRI01002392.1	scaffold844	195416-200058
<i>Aegotheles_bennettii</i>	VZRW01002854.1	scaffold467	11002-14745

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Antrostomus_carolinensis</i>	NW_010326570.1	scaffold8367	17644-12697
<i>Calypte_anna</i>	NC_044244.1	Cromosoma 1	53333823-53339165
<i>Caprimulgus_europaesus</i>	OU015528.1	Cromosoma 5	51166357-51180977
<i>Chaetura_pelagica</i>	NW_009969339.1	scaffold79	1035930-1041324
<i>Chordeiles_acutipennis</i>	VXAQ01000409.1	scaffold_348	470831-475474
<i>Hemiprocne_comata</i>	VWZJ01010612.1	scaffold847	155478-151225
<i>Nyctibius_bracteatus</i>	VWZB01000865.1	scaffold_855	129091-124273
<i>Nyctibius_grandis</i>	VWYG01020076.1	scaffold231	73811-69020
<i>Nyctiprogne_leucopyga</i>	VZZU01000832.1	scaffold_814	265564-270214
<i>Oreotrochilus_melanogaster</i>	VZUB01001408.1	scaffold2201	599366-593867
<i>Podargus_strigoides</i>	VZTK01006942.1	scaffold630	5891-1502
<i>Steatornis_caripensis</i>	VZSC01003123.1	scaffold1166	367273-372055
<i>Cariama_cristata</i>	NW_009614435.1	scaffold994	24812-19681
<i>Chunga_burmeisteri</i>	VZRC01000129.1	scaffold_123	1436733-1441583
<i>Casuarius_casuarius</i>	VWPT01000012.1	scaffold_11	10396371-10390836
<i>Dromaius_novaehollandiae</i>	NW_020453693.1	scaffold_64	3799330-3793449
<i>Cathartes_aura</i>	KL305807.1	scaffold26783	9486-24236 160213911- 160228685
<i>Gymnogyps_californianus</i>	CM030802.1	Cromosoma 1	160228685
<i>Alca_torda</i>	VZSD01016873.1	scaffold9191	98486-94434
<i>Arenaria_interpres</i>	VXAK01009944.1	scaffold85	148987-144889
<i>Burhinus_bistriatus</i>	VYXH01005411.1	scaffold1181	149905-145809
<i>Burhinus_oedicephalus</i>	VFFE01006550.1	jcf7180000880783	291297-305411
<i>Calidris_pugnax</i>	NW_015094506.1	scaffold44	2477784-2473212
<i>Calidris_pygmaea</i>	QJSC01008973.1	scaf_17139	5665626-5679707
<i>Cephus_gryllus</i>	VZUD01000109.1	scaffold478_cov51	2288040-2283993
<i>Charadrius_alexandrinus</i>	VUYV01000082.1	scaffold358	2122198-2136291
<i>Charadrius_vociferus</i>	NW_009647738.1	scaffold413	1982487-1986917
<i>Chionis_minor</i>	VZSF01010064.1	scaffold3796	21170-17084
<i>Chroicocephalus_maculipennis</i>	VYZF01000082.1	scaffold_80	440991-445019
<i>Dromas_ardeola</i>	VYZM01007457.1	scaffold631	169730-173817
<i>Fratercula_cirrhata</i>	BMBE01029814.1	Frci_29814	56805-70844
<i>Glareola_pratincola</i>	VWPO01002423.1	scaffold_2413	12807-16891
<i>Himantopus_himantopus</i>	VXBK01006790.1	scaffold993	197641-201747
<i>Ibidorhyncha_struthersii</i>	VZSZ01001853.1	scaffold417	510135-505997
<i>Jacana_jacana</i>	VZTM01016970.1	scaffold5934	109456-105366
<i>Larus_smithsonianus</i>	WAAC01002072.1	scaffold2328	123618-137646
<i>Nycticryphes_semicollaris</i>	VXBJ01000704.1	scaffold711	1878713-1874618
<i>Pedionomus_torquatus</i>	VZRU01001358.1	scaffold6891	290329-294428
<i>Phaetusa_simplex</i>	VZZW01000877.1	scaffold_831	354098-358154 163337974- 163352099
<i>Pluvialis_apricaria</i>	CM030007.1	Cromosoma 1	163352099
<i>Pluvianellus_socialis</i>	VZTS01019160.1	scaffold5352 NO-	164015-159908
<i>Recurvirostra_avosetta</i>	SAYO01034131.1	DE_122734_length_99190_cov_35.23790	16378-30492
<i>Rhinoptilus_africanus</i>	VXBO01015171.1	scaffold3762	318055-322132
<i>Rissa_tridactyla</i>	VZUC01000028.1	scaffold55_cov42	2273950-2287978

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Rostratula benghalensis</i>	VXAI01000117.1	scaffold_111	2133627-2129571
<i>Rynchops niger</i>	VXBH01004691.1	scaffold74	153368-157423
<i>Sceloporus mira</i>	BJBW01003289.1	Scmi_3289	168295-181572
<i>Stercorarius parasiticus</i>	VWZL01003680.1	scaffold520	90428-94478
<i>Sterna hirundo</i>	CM020437.1	Cromosoma 1	58153990-58168048
<i>Thinocorus orbignyianus</i>	VXBW01005540.1	scaffold739	1020238-1016180
<i>Turnix velox</i>	VZTY01030238.1	scaffold58	180173-183969
<i>Uria aalge</i>	VZUE01000070.1	scaffold91_cov39	4458521-4462554
<i>Uria lomvia</i>	NOXD01000012.1	scaffold14_cov60	2267009-2281042
<i>Ciconia boyciana</i>	BDF01066152.1	Cibo_66152	5537-20338
<i>Ciconia maguari</i>	VXAE01010543.1	scaffold21737	50425-45611
<i>Colinus striatus</i>	NW_010713561.1	scaffold23409	10106-15354
<i>Urocolius indicus</i>	WBNH01007870.1	scaffold1957	100168-115108
<i>Alopecoenas beccarii</i>	VWYH01003987.1	scaffold5002	490012-494849
<i>Caloenas nicobarica</i>	VZSB01001948.1	ScfYJcd_134	4648879-4653727
<i>Columba janthina nitens</i>	BMBC01015453.1	Cojn_15453	365110-379945
<i>Columba livia</i>	NW_004973683.1	scaffold528	78595-72952
<i>Columbina picui</i>	VYZG01000362.1	scaffold_360	319730-324672
<i>Patagioenas fasciata monilis</i>	LSYS01008398.1	Sc31e1R_53	14324971-14329774 182845448- 182860271
<i>Streptopelia turtur</i>	LR594551.2	Cromosoma 1	182860271
<i>Baryphthengus martii</i>	VWZK01001913.1	scaffold14264	28580-23772
<i>Brachypteracias leptosomus</i>	VYZX01027600.1	scaffold4416	311808-307006
<i>Ceyx cyanopectus</i>	VYZU01010929.1	scaffold1280	15173-19898
<i>Chloroceryle aenea</i>	VWZY01009856.1	scaffold5159	53665-58277
<i>Eurystomus gularis</i>	VZZY01011227.1	scaffold8805	381225-376442
<i>Merops nubicus</i>	NW_008621958.1	scaffold50477	2165-7054
<i>Todus mexicanus</i>	WEIS01038170.1	scaffold26419	6770-21553
<i>Centropus unirufus</i>	VYZI01000084.1	scaffold_83	949535-953617
<i>Ceuthmochares aereus</i>	VWPQ01000808.1	scaffold_804	154786-158882
<i>Crotophaga sulcirostris</i>	VYZB01000065.1	scaffold_61	173943-169917
<i>Cuculus canorus</i>	NW_009246465.1	scaffold419	1055618-1051483
<i>Geococcyx californianus</i>	VWPV01031624.1	scaffold20751	104213-100647
<i>Anomalopteryx didiformis</i>	SZQC01000065.1	scaffold_64	3801162-3816681
<i>Eurypyga helias</i>	NW_010236672.1	scaffold13512	2480-6401
<i>Rhynochetos jubatus</i>	VZRY01001421.1	scaffold353	146359-142713
<i>Falco cherrug</i>	NW_004994992.1	scaffold108_1	2294247-2288582
<i>Falco naumanni</i>	NC_054058.1	Cromosoma 5	33851105-33845442
<i>Falco peregrinus</i>	NW_004930606.1	scaffold102_1	1370513-1364848
<i>Falco rusticolus</i>	NC_051191.1	Cromosoma 5	58524044-58529708
<i>Falco tinnunculus</i>	ML996737.1	scaffold30	2634229-2649034
<i>Herpetotheres cachinnans</i>	VXAJ01000421.1	scaffold_413	416686-412015
<i>Bucco capensis</i>	VWZO01003045.1	scaffold1552	74789-78934
<i>Galbula dea</i>	VWZX01005633.1	scaffold1191	93575-87705
<i>Alectoris rufa</i>	JADBKV010000013.1	scaffold13	1764886-1778268
<i>Alectura lathamii</i>	VXAV01005294.1	scaffold12505	90626-89510

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Bambusicola_thoracicus</i>	PPHD01000609.1	B.A.C_608	12643-9238
<i>Callipepla_squamata</i>		MCFN01000681.1	110520-107205
<i>Chrysolophus_pictus</i>	KZ860477.1	scaffold103	183333-196698
<i>Colinus_virginianus</i>		AWGT02006158.1	9614-12918
<i>Coturnix_japonica</i>	NC_029516.1	Cromosoma 1	47515839-47519545
<i>Gallus_gallus</i>	NC_052532.1	Cromosoma 1	52046549-52050266
<i>Lagopus_muta_japonica</i>	BJCA01002099.1	Lamu_2099	792-13150
<i>Meleagris_gallopavo</i>	NC_015011.2	Cromosoma 1	50294461-50298592
<i>Numida_meleagris</i>	NC_034409.1	Cromosoma 1	52720463-52724587
<i>Odontophorus_gujanensis</i>	VXAB01003205.1	scaffold3602	294586-297912
<i>Pavo_muticus</i>	JACDJE010000024.1	scaffold20	2642348-2655712
<i>Penelope_pileata</i>	WBMW01002985.1	scaffold468	1166692-1180334
<i>Phasianus_colchicus</i>	NW_022205449.1	scaffold159_cov57	2734372-2727407
<i>Syrnaticus_mikado</i>	QGNR01000019.1	scaffold19	14229286-14242516
<i>Tympanuchus_cupido_pinnatus</i>	MOXI01000013.1	Scf7LSr2_13	2171808-2185177
<i>Gavia_stellata</i>	NW_009293136.1	scaffold2277	18125-12958
<i>Antigone_vipio</i>	BJEU01010320.1	Grvi_10320	57585-71567
<i>Aramus_guarauna</i>	VXBL01005737.1	scaffold714	489907-493884
<i>Atlantisia_rogersi</i>	VZUJ01081524.1	NO- DE_1371_length_99673_cov_14.599_ID_2741	83100-87060
<i>Balearica_regulorum_gibbericeps</i>	NW_010764559.1	Scaffold47956	2507-6806
<i>Fulica_atra</i>	MU065405.1	Fatr_scaffold_00007	16792283-16806151
<i>Gallirallus_okinawae</i>	BDFH01015616.1	Gaok_15616	2571-16395
<i>Grus_americana</i>	WEIX01014524.1	scaffold3659	316553-330520
<i>Grus_japonensis</i>	BDFG01033404.1	Grja_33404	17165-31198
<i>Grus_monacha</i>	BJET01001902.1	Grmo_1902	146860-160845
<i>Grus_nigricollis</i>	SMUU01000414.1	ctg60	1949220-1963199
<i>Heliornis_fulica</i>	VXBZ01006688.1	scaffold1649	151515-155090
<i>Psophia_crepitans</i>	VWZZ01004287.1	scaffold927	484981-488933
<i>Zapornia_atra</i>	VZTU01025579.1	scaffold2882	312450-308580
<i>Leptosomus_discolor</i>	NW_009878416.1	scaffold7838	49284-54493
<i>Mesitornis_unicolor</i>	NW_010180685.1	scaffold5474	106861-102453
<i>Corythaeola_cristata</i>	WBMX01000862.1	scaffold_849	150851-164993
<i>Corythaixoides_concolor</i>	VXAM01000019.1	scaffold_7	4441418-4445574
<i>Tauraco_erythrolophus</i>	NW_010051951.1	scaffold7884	17731-13288
<i>Opisthocomus_hoazin</i>	NW_009899841.1	scaffold281	2864747-2860353
<i>Ardeotis_arabs</i>	JAAGAY010131240.1	jcf7180002665035	46513-60905
<i>Ardeotis_kori</i>	VWPR01000036.1	scaffold_35	1054611-1050268
<i>Chlamydotis_macqueenii</i>	NW_010453613.1	scaffold26231	2892-7626
<i>Chlamydotis_undulata_undulata</i>	QKYM02006071.1	jcf7180000846155	17588-31998
<i>Lophotis_ruficrista</i>	VWYV01000292.1	scaffold_286	378390-382543
<i>Tetrax_tetrax</i>	WHYT01016982.1	jcf7180000610616	58771-73145
<i>Acanthisitta_chloris</i>	NW_008675581.1	scaffold16055	3255-6633
<i>Acridotheres_javanicus</i>	PEJO01000052.1	scaffold_51	4329189-4342396

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Acrocephalus_arundinaceus</i>	VZST01007150.1	scaffold_7149	486-1551
<i>Aegithalos_caudatus</i>	WEIU01012703.1	scaffold5314	198374-211489
<i>Agelaius_phoeniceus</i>	VZSP01000321.1	scaffold4035	866036-869277
<i>Agelaius_tricolor</i>	JA- DODQ010001033.1	flattened_line_2064	68755-82002
<i>Alauda_arvensis</i>	CAD- DXX010000045.1	scaffold_44	2021038-2034192
<i>Alaudala_cheleensis</i>	VWYE01010507.1	scaffold318	338281-335128
<i>Aleadryas_rufinucha</i>	VZTH01007864.1	scaffold3781	512633-515786
<i>Amblyornis_subalaris</i>	JA- CAXG010000009.1	scaffold_8	6165915-6179067
<i>Anthoscopus_minutus</i>	VWYI01024910.1	scaffold15029	11107-14244
<i>Aphelocoma_coerulescens</i>	VZSI01000078.1	scaffold_71	364566-361428
<i>Atrichornis_clamosus</i>	WBMZ01017257.1	scaffold12666	5872-9899
<i>Bombycilla_garrulus</i>	VXBU01003598.1	scaffold676	805339-808498
<i>Brachypodius_atriceps</i>	VZSR01003524.1	Sct0y12_3524	4989117-4992262
<i>Buphagus_erythrorhynchus</i>	VZTT01022523.1	scaffold30732	9934-13077
<i>Calcarius_ornatus</i>	WBNL01000048.1	scaffold_47	2921946-2935187
<i>Callaeas_wilsoni</i>	VWPU01012739.1	scaffold6113	15827-12703
<i>Calyptomena_viridis</i>	WEIV01006904.1	scaffold3265	68283-81437
<i>Camarhynchus_parvulus</i>	NC_044586.1	Cromosoma 1A	21094653-21091133
<i>Cardinalis_cardinalis</i>	VYXE01015045.1	scaffold26	99554-96336
<i>Catharus_fuscescens</i>	VWYD01027227.1	scaffold1481	851474-854639
<i>Catharus_ustulatus</i>	CM020339.1	Cromosoma 4	25535988-25549147
<i>Cephalopterus_ornatus</i>	VZRE01012475.1	scaffold2694	354450-351262
<i>Cercotrichas_coryphoeus</i>	WBND01000199.1	scaffold_170	723360-736406
<i>Certhia_americana</i>	CM031879.1	Cromosoma 1A	48316477-48329613
<i>Certhia_brachydactyla</i>	VXBV01004136.1	scaffold215	770483-767348
<i>Certhia_familiaris</i>	WBNC01001012.1	scaffold_2335	321353-334491
<i>Cettia_cetti</i>	VZUI01029742.1	NO- DE_1304_length_127447_cov_13.13_ID_2607	19027-15891
<i>Chaetops_frenatus</i>	VZTR01012047.1	scaffold5322	4695-1637
<i>Chaetorhynchus_papuensis</i>	VWYX01000768.1	scaffold_763	295083-291944
<i>Chiroxiphia_lanceolata</i>	NC_045641.1	Cromosoma 5	53072160-53076233
<i>Chloebia_gouldiae</i>	QUSF01000028.1	scaffold_28	4166624-4179765
<i>Chlorodrepanis_virens</i>	LTAT01000002.1	Cromosoma 1A	51916772-51930029
<i>Chloropsis_cyanopogon</i>	WEZZ01009271.1	scaffold3209	320066-333184
<i>Chloropsis_hardwickii</i>	WEIW01000361.1	scaffold_299	739870-752985
<i>Cinclus_mexicanus</i>	VWYM01025003.1	scaffold4510	507953-504803
<i>Cisticola_juncidis</i>	VXBR01012244.1	scaffold372	75899-72753
<i>Climacteris_rufus</i>	VZRZ01007688.1	scaffold48	799603-802701
<i>Cnemophilus_loriae</i>	VZTF01009528.1	scaffold190	278094-281221
<i>Corapipo_altera</i>	NW_020884873.1	COAL_440	15086271-15082178
<i>Corvus_brachyrhynchus</i>	NW_008238664.1	scaffold56	3373397-3369493
<i>Corvus_cornix_cornix</i>	NC_047057.1	Cromosoma 1A	51549216-51553123
<i>Corvus_hawaiiensis</i>	QORP01000063.1	000012F	12888043-12901204
<i>Corvus_kubaryi</i>	NW_024582061.1	74	14638828-14634924

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Corvus_macrorhynchos</i>	BMBD01016509.1	Coma_16509	324375-337512
<i>Corvus_monedula</i>	CM023939.1	Cromosoma 1A	51563725-51576865
<i>Corvus_moneduloides</i>	NC_045479.1	Cromosoma 4	22593268-22589355
<i>Cyanistes_caeruleus</i>	NW_019776201.1	Cromosoma 1 parte 2	29453634-29457564
<i>Cyanoderma_ruficeps</i>	VZDJ01000426.1	scaffold134_len14369398_cov50	11816331-11829516
<i>Daphoenositta_chrysoptera</i>	VZRO01002533.1	scaffold1032	420171-423305
<i>Dasyornis_broadbenti</i>	VZRN01000216.1	scaffold20	744320-741325
<i>Dicaeum_eximium</i>	VWZP01009871.1	scaffold58	2438058-2441087
<i>Dicrurus_megarhynchus</i>	VXAD01012616.1	scaffold271	947166-950286
<i>Diglossa_brunneiventris</i>	CM032353.1	Cromosoma 1A	22029642-22042858
<i>Donacobius_atricapilla</i>	WBMV01015891.1	scaffold896	834656-843963
<i>Drymodes_brunneopygia</i>	VZTZ01063158.1	scaffold62631	114-1178
<i>Dryoscopus_gambensis</i>	WEIT01034728.1	scaffold29	319119-332253
<i>Edolisoma_coerulescens</i>	VWZW01006499.1	scaffold521	850711-853839
<i>Elachura_formosa</i>	WBN01000701.1	scaffold_669	213402-226506
<i>Emberiza_fucata</i>	VYZJ01000324.1	scaffold_305	175309-172102
<i>Empidonax_traillii</i>	NW_020955248.1	scaffold55	2164388-2168494
<i>Eopsaltria_australis</i>	QKXG01001195.1	EYR054_Scf1195	156984-170193
<i>Eremophila_alpestris_peregrina</i>	WMCF01000052.1	CLO_EAlp1.0_scaffold_52	3171281-3184441
<i>Erithacus_rubecula</i>	VZSK01000040.1	sc0000068_1	918745-915775
<i>Erpornis_zantholeuca</i>	VZTN01032988.1	scaffold4795	260056-263160
<i>Erythrocercus_mccallii</i>	VZRG01000395.1	scaffold_392	102211-99029
<i>Eulacestoma_nigropectus</i>	VZTE01001811.1	scaffold669	352188-349047
<i>Falcunculus_frontatus</i>	VZRV01004133.1	scaffold33	153890-150751
<i>Ficedula_albicollis</i>	NC_021672.1	Cromosoma 1A	52878870-52882779
<i>Formicarius_rufipectus</i>	VXAU01001959.1	scaffold1132	109288-112497
<i>Fringilla_coelebs_coelebs</i>	CM027225.1	Cromosoma 1A	49205943-49219221
<i>Furnarius_figulus</i>	VYZD01000017.1	scaffold_10	763895-760708
<i>Geospiza_fortis</i>	NW_005054334.1	scaffold173	2221951-2218385
<i>Geothlypis_trichas</i>	CM019904.1	Cromosoma 4	22293196-22306344
<i>Grallaria_varia</i>	VWZG01001393.1	scaffold101	68655-71863
<i>Grantiella_picta</i>	VZRM01002773.1	scaffold1053	264800-261697
<i>Gymnorhina_tibicen</i>	VXAZ01005444.1	scaffold25	1235334-1232201
<i>Locustella_ochotensis</i>	VXBM01000318.1	scaffold_304	494674-497415
<i>Hemignathus_wilsoni</i>	SGIP01000010.1	Hmun_k71_000010	9180852-9194131
<i>Hippolais_icterina</i>	VWYN01011261.1	scaffold74	24765-21607
<i>Hirundo_rustica_B10K-DU-001-67</i>	VZZX01002280.1	scaffold2047	367894-364716
<i>Hirundo_rustica_bHirRus1</i>	NC_053453.1	Cromosoma 4	54493245-54497123
<i>Horornis_vulcanius</i>	VZUA01053107.1	scaffold11788	52218-49115
<i>Hylia_prasina</i>	VYXD01009704.1	scaffold329	469881-466748
<i>Hypocryptadius_cinnamomeus</i>	VYZP01061159.1	scaffold8261	74819-78014
<i>Ifrita_kowaldi</i>	VZRS01006369.1	scaffold1850	354385-351250
<i>Illadopsis_cleaveri</i>	VXBB01020869.1	scaffold761	138078-135053
<i>Irena_cyanogastra</i>	VWZV01006690.1	scaffold2560	861090-864244
<i>Junco_hyemalis</i>	QZWM01001238.1	ScoVZU6_1238_HRSCAF__1266	51056642-51069837

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Lamprotornis superbus</i>	DUC010000060.1	scaffold_59-ref0001105	1257587-1270731
<i>Lanius ludovicianus</i>	VYXG01006681.1	scaffold1327	202067-198948
<i>Leiothrix lutea</i>	VXBY01000265.1	scaffold_258	573068-576058
<i>Lepidothrix coronata</i>	NW_016690282.1	Scaffold102	1750437-1754544
<i>Leptocoma aspasia</i>	VXAX01003260.1	scaffold614	506336-505268
<i>Leucopsar rothschildi</i>	VZTC01004407.1	scaffold4046	89309-92518
<i>Lichenostomus cassidix</i>	VLJF01000943.1	contig_23	26090209-26103344
<i>Lonchura striata domestica</i>	NC_042566.1	Cromosoma 1A	64433853-64429867
<i>Loxia curvirostra</i>	VZSM01001236.1	scaffold71	211617-208337
<i>Loxia leucoptera</i>	VWZM01009261.1	scaffold973	335437-339123
<i>Machaerirhynchus nigripectus</i>	VZRQ01009562.1	scaffold1174	324663-321533
<i>Malurus cyaneus samueli</i>	CM019237.1	Cromosoma 1A	41428556-41441665
<i>Malurus elegans</i>	VZRP01008616.1	scaffold4274	67917-71025
<i>Manacus vitellinus</i>	NW_021940682.1	scaffold_5_pilon	15023453-15019342
<i>Melanocharis versteri</i>	VZTG01007653.1	scaffold1003	2075731-2072588
<i>Melospiza melodia</i>	VZSA01001352.1	Contig2516	2895022-2898172
<i>Mionectes macconnelli</i>	VYZC01000156.1	scaffold_153	272463-269251
<i>Mixornis gularis</i>	QVAJ01000145.1	scaffold_144	216020-229196
<i>Mohoua ochrocephala</i>	VZTA01023393.1	scaffold4878	14335-11195
<i>Molothrus ater</i>	NC_050508.1	Cromosoma 1A	51593478-51597450
<i>Montifringilla adamsi</i>	GGNK010010559.1	scaffold53	2086231-2099459
<i>Pyrgilauda ruficollis</i>	NW_024527266.1	scaffold56	2097312-2093301
<i>Onychostruthus taczanowskii</i>	NW_024502902.1	scaffold53	4141735-4145746
<i>Motacilla alba alba</i>	NC_052031.1	Cromosoma 1A	51020298-51024305
<i>Motacilla alba B10K-DU-001-75</i>	VXBE01004360.1	scaffold1443	268017-264729
<i>Motacilla tschutschensis</i>	1	scaffold_44	4165188-4178496
<i>Myiagra hebetior</i>	VWZQ01006796.1	scaffold1064	1269017-1272110
<i>Mystacornis crossleyi</i>	VYZQ01022284.1	scaffold27206	430-3455
<i>Neodrepanis coruscans</i>	VYZS01026488.1	scaffold27706	9911-13068
<i>Neopelma chrysocephalum</i>	NW_020897714.1	neopelma1_59	19713771-19717883
<i>Neopipo cinnamomea</i>	VYZA01000170.1	scaffold_155	86190-89417
<i>Nesospiza acunhae</i>	VZSU01001120.1	scaffold1033	1815594-1812358
<i>Nicator chloris</i>	WAAE01018517.1	scaffold3987	320676-333835
<i>Notiomystis cincta</i>	VZRX01019750.1	scaffold1742	856612-859768
<i>Oenanthe oenanthe</i>	VXBF01004020.1	scaffold699	106141-109281
<i>Onychorhynchus coronatus</i>	VZRK01000093.1	scaffold_80	1406257-1409484
<i>Oreocharis arfaki</i>	VZRR01010047.1	scaffold3458	9818-6675
<i>Origma solitaria</i>	VZRL01006973.1	scaffold39	540940-544119
<i>Oriolus oriolus</i>	VXBT01010117.1	scaffold523	983562-986667
<i>Orthonyx spaldingii</i>	VZTJ01004286.1	scaffold16	2302388-2305506
<i>Oxylabes madagascariensis</i>	VYZR01015444.1	scaffold10746	41752-38492
<i>Oxyruncus cristatus</i>	VXAY01000094.1	scaffold163	323663-320292
<i>Pachycephala philippinensis</i>	VWZT01007609.1	scaffold932	148855-145724
<i>Pachyrampus minor</i>	VYXB01007240.1	scaffold2558	142996-146203

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Panurus_biarcticus</i>	VZRT01000345.1	scaffold_329	7704-10860
<i>Pardalotus_punctatus</i>	VZTX01010264.1	scaffold157	321102-324237
<i>Parus_major</i>	NC_031773.1	Cromosoma 1A	49896425-49900386
<i>Passer_domesticus</i>	CM004525.1	Cromosoma 1A	48760348-48773642
<i>Passer_montanus</i>	NW_024370485.1	scaffold55	3220465-3224480
<i>Passerina_amoena</i>	WBNP01002335.1	scaffold8931	96932-110141
<i>Peucedramus_taeniatus</i>	WBNO01029546.1	scaffold13454	169215-182406
<i>Phainopepla_nitens</i>	VXBQ01011808.1	scaffold6986	179426-182558
<i>Pheucticus_melanocephalus</i>	VZSJ01000896.1	scaffold5844	205177-208361
<i>Phylloscopus_plumbeitarsus</i>	LXOY01207347.1	scaffold208354	3882-17274
<i>Rhadina_sibilatrix</i>	VWYO01004213.1	scaffold2944	67219-63711
<i>Phylloscopus_trochiloides_viridanus</i>	LXPA01125804.1	scaffold126789	3879-14864
<i>Phylloscopus_trochilus_acredula</i>	LXGM01000016.1 JADMLD010001203.1	scaffold_19	6897827-6911036
<i>Phylloscopus_whistleri</i>	1	scaffold75	204965-218241
<i>Picathartes_gymnocephalus</i>	WEKY01048791.1	scaffold5976	145697-158812
<i>Pipra_filicauda</i>	NW_024104379.1	scaffold262	711082-714607
<i>Piprites_chloris</i>	VXAH01000100.1	scaffold_54	658712-661925
<i>Pitta_sordida</i>	WEKX01026009.1	scaffold8961	48085-61989
<i>Platysteira_castanea</i>	VYXC01012581.1	scaffold540	680883-677761
<i>Ploceus_nigricollis</i>	VXBC01001237.1	scaffold233	265592-268687
<i>Poecile_atricapillus</i>	VZSS01000011.1	scaffold_6	18764217-18767372
<i>Polioptila_caerulea</i>	VYXF01007460.1	scaffold75	99735-96541
<i>Pomatorhinus_ruficollis</i>	VZSW01000024.1	scaffold_22	2105564-2102375
<i>Pomatostomus_ruficeps</i>	VYZT01048425.1	scaffold29934	9724-6580
<i>Promerops_cafar</i>	VZSE01002177.1	scaffold51	569354-566162
<i>Prunella_fulvescens</i>	VZTP01042265.1	scaffold6087	231106-234215
<i>Prunella_himalayana</i>	VYZK01000111.1	scaffold_109	2181106-2178029
<i>Pseudopodoces_humilis</i>	NW_005087592.1	scaffold138	2100599-2096648
<i>Pseudorectes_ferrugineus</i>	QWTY01037805.1	pituhoi_L001_U_contig_37806	4138-17248
<i>Pteruthius_melanotis</i>	WEIY01000097.1	scaffold_72	2084464-2097575
<i>Ptilonorhynchus_violaceus</i>	VZRJ01007105.1	scaffold1640	730277-727135
<i>Ptilorrhoa_leucosticta</i>	VWYY01000201.1	scaffold_197	927995-931116
<i>Pycnonotus_jocosus</i>	VWYP01023766.1	scaffold3624	318014-321199
<i>Quiscalus_mexicanus</i>	VWYF01011016.1	scaffold11466	136404-133217
<i>Regulus_satrapa</i>	VWZN01004070.1	scaffold314	149076-152086
<i>Rhabdornis_inornatus</i>	VWZS01003242.1	scaffold864	1332911-1336147
<i>Rhagologus_leucostigma</i>	VZTD01003250.1	scaffold468	596414-599543
<i>Rhegmatorhina_hoffmannsi</i>	CM031049.1	Cromosoma 5	50781708-50794919
<i>Rhipidura_dahli</i>	VXAC01003213.1	scaffold641	951519-948611
<i>Rhodinocichla_rosea</i>	VWYZ01000332.1	scaffold_305	454229-457426
<i>Sakesphorus_luctuosus</i>	VWZD01010262.1	scaffold108	817899-814674
<i>Sapayoa_aenigma</i>	VZSY01000211.1	scaffold_184	372370-369195
<i>Saxicola_maurus_maurus</i>	OAMK01000004.1	Sc0000003	34161196-34174338
<i>Sclerurus_mexicanus</i>	VWZF01001715.1	scaffold1430	883374-886555
<i>Scytalopus_superciliaris</i>	VXBX01005245.1	scaffold988	432731-435695

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Serilophus lunatus</i>	VXBA01001095.1	scaffold342	982889-986081
<i>Serinus canaria</i>	NW_022044632.1	scaffold_6	21923272-21919174
<i>Setophaga kirtlandii</i>	VXAS01011930.1	scaffold1041	867430-870575
<i>Sialia sialis strain Louisiana</i>	VRYO01001878.1	ScbwfqO_1879	28038742-28051906
<i>Sinosuthora webbiana</i>	VXBN01012628.1	scaffold1277	350268-353438
<i>Sitta europaea</i>	VXBS01002373.1	scaffold700	261169-258099
<i>Smithornis capensis</i>	VWYW01000028.1	scaffold_26	2924155-2927329
<i>Spizella passerina</i>	WBNQ01047507.1	scaffold2490	17616-30793
<i>Sporophila hypoxantha</i>	NDFG01003943.1	Contig3966	792490-805717
<i>Sterrhoptilus dennistouni</i>	VWZU01002837.1	scaffold7971	261488-258326
<i>Struthidea cinerea</i>	VZTI01005559.1	scaffold671	2594396-2597536
<i>Sturnus vulgaris</i>	NW_014650745.1	Scaffold284	956640-952676
<i>Sylvia atricapilla</i>	VZSL01000097.1	Super-Scaffold_78	180401-177254
<i>Sylvia borin</i>	VXBG01004384.1	scaffold448	692243-695353
<i>Sylvietta virens</i>	VXAN01000130.1	scaffold_112	2266407-2269512
<i>Tachuris rubrigastra</i>	VZRD01000151.1	scaffold_147	1088422-1091615
<i>Tachycineta bicolor</i>	VKGD01002874.1	scaffold_2881	3753-16922
<i>Taeniopygia guttata</i>	NC_044212.2	Cromosoma 1A	50659646-50663569
<i>Thryothorus ludovicianus</i>	VZTB01015922.1	scaffold933	393619-390502
<i>Tichodroma muraria</i>	WAAG01051620.1	scaffold14035	17077-30229
<i>Toxostoma redivivum</i>	VXBI01011679.1	scaffold1149	1519854-1516679
<i>Turdus rufiventris</i>	PYHW01009870.1	contig5585383	1802408-1815554
<i>Tyrannus savana</i>	VXAW01008179.1	scaffold337	332134-335364
<i>Urocynchramus pylzowi</i>	VZRH01001637.1	scaffold925	551127-554227
<i>Vidua macroura</i>	WBNN01035591.1	scaffold2167	62131-75256
<i>Vireo altiloquus</i>	VZRF01006366.1	scaffold1710	626698-629807
<i>Xiphorhynchus elegans</i>	VZUH01017764.1	scaffold_91988	
<i>Zonotrichia albicollis</i>	NW_005081603.1	Scaffold67	181930-177851
<i>Zosterops borbonicus</i>	SWJQ01000091.1	scaffold75_size2432240	462259-476061
<i>Zosterops hypoxanthus</i>	VWYL01026310.1	scaffold2004	364996-368202
<i>Zosterops japonicus</i>	JABUOJ010000104.1	lc1_126	985292-998482
<i>Zosterops lateralis</i>	LAI01000052.1	scaffold_51	583097-596310
<i>Zosterops pallidus</i>	STGZ01001955.1	scaffold1904	382699-396960
<i>Balaeniceps rex</i>	VYZW01050733.1	scaffold8354	228390-233502
<i>Cochlearius cochlearius</i>	VWPP01000180.1	scaffold_175	1308789-1304171
<i>Egretta garzetta</i>	NW_009258549.1	scaffold51	1510461-1505711
<i>Gorsachius goisagi</i>	BOSO01001662.1	Gogo_1662	193108-207903
<i>Mesembrinibis cayennensis</i>	VXAT01009204.1	scaffold9158	489963-494718
<i>Nipponia nippon</i>	NW_009057284.1	Scaffold109	369282-364133
<i>Pelecanus crispus</i>	NW_009104881.1	scaffold30288	16707-11625
<i>Scopus umbretta</i>	VZTL01076744.1	scaffold10062	112408-117162
<i>Phaethon lepturus</i>	NW_010531279.1	scaffold12553	17275-12803
<i>Phoenicopterus ruber ruber</i>	KK418250.1	scaffold46334	2437-6568
<i>Colaptes auratus</i>	JAAWVA010000004.1	Cromosoma 1	21205761-21264819
<i>Dendrocopos noguchii</i>	BJBY01016249.1	Deno_16249	5028-19134
<i>Eubucco bourcierii</i>	VWZE01005446.1	scaffold14019	9619-13610

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Indicator_maculatus</i>	VXBD01012026.1	scaffold659	2585717-2581577
<i>Melanerpes_aurifrons</i>	WWNC01000004.1	Melaner- pes_aurifrons_OMNH24340_contig_4	9989868-10003971
<i>Picoides_pubescens</i>	NW_009664372.1	scaffold25	4267080-4271837
<i>Pogoniulus_pusillus</i>	CM026790.1	Cromosoma 15	10342276-10357246
<i>Psilopogon_haemacephalus</i>	VWZI01012095.1	scaffold2018	486572-491251
<i>Ramphastos_sulfuratus</i>	WBNM01043309.1	scaffold3018	260231-275474
<i>Semnornis_frantzii</i>	VWYK01024079.1	scaffold41063	29292-24125
<i>Tricholaema_leucomelas</i>	WAAF01011419.1	scaffold8678	224233-239192
<i>Podiceps_cristatus</i>	KL258634.1	scaffold21646	20071-16523
<i>Podilymbus_podiceps</i>	VXAO01000547.1	scaffold_494	326320-329899
<i>Calonectris_borealis</i>	VZUG01019093.1	scaffold22006	80959-76115
<i>Fregetta_grallaria</i>	VZZT01000497.1	scaffold_486	341119-335729
<i>Fulmarus_glacialis</i>	NW_009211211.1	scaffold11295	110073-104959
<i>Oceanodroma_tethys</i>	VWZR01007034.1	scaffold2756	488611-493434
<i>Oceanites_oceanicus</i>	VWZA01000013.1	scaffold_11	1031317-1036129
<i>Pelecanoides_urinatrix</i>	VZTQ01005678.1	scaffold6083	151568-146746
<i>Phoebastria_albatrus</i>	BMBH01000009.1	Phaa_9	185954-200671
<i>Thalassarche_chlororhynchos</i>	VZTW01051577.1	scaffold4482	201939-197121
<i>Agapornis_roseicollis</i>	NDXB01003964.1	scaffold10981	48516-63309
<i>Amazona_aestiva</i>	LMAW01002845.1	scaffold_65	1320654-1325348
<i>Amazona_collaria</i>	RQIO01000003.1	TDTX972-JAMY3_00003	40016962-40031653
<i>Amazona_guildingii</i>	VXAR01011610.1	scaffold387	1324663-1329354
<i>Amazona_vittata</i>	AOCU02042430.1	ama_vit_scaffold00607935	261186-275877
<i>Anodorhynchus_hyacinthinus</i>	WOUG01000755.1	755	479321-494010
<i>Ara_glaucogularis</i>	CACR010000017.1	Super-Scaffold_100012	11704686-11719373
<i>Ara_macao</i>	KE009028.1	s_1_1NewScaffoldedcontig_22354	6023-20709
<i>Aratinga_solstitialis</i>	BHOG010000010.1	scaffold_9	18059857-18074531
<i>Aratinga_weddellii</i>	WYDH01006557.1	6557	111723265- 111737957
<i>Eolophus_roseicapilla</i>	WBNI01000059.1	scaffold_49	1331225-1345931
<i>Eupsittula_pertinax</i>	WUQE01001423.1	1423	26483-41171
<i>Guaruba_guarouba</i>	1 JAAAKP010007223.	2999	1352632-1367317
<i>Lophochroa_leadbeateri</i>	1	7223	77730252-77744964
<i>Melopsittacus_undulatus</i>	NC_047531.1	Cromosoma 5	47171604-47176608
<i>Myiopsitta_monachus</i>	CM029920.1	Cromosoma 4	68141693-68156384
<i>Nestor_notabilis</i>	NW_009944076.1	scaffold8389	105169-100117
<i>Nymphicus_hollandicus</i>	WTXV01000050.1	50	91649-106357
<i>Probosciger_aterimus</i>	VYZH01000017.1	scaffold_15	252183-247474
<i>Psittacula_krameri</i>	NFZL01004758.1	scaffold4506	148591-163495
<i>Psittacus_erithacus</i>	WYDI01001534.1	2059	10879-25577
<i>Psittacus_timneh</i>	WYDJ01000929.1	929	10820-25518
<i>Pyrrhura_cruentata</i>	WUAO01000701.1	701	34026129-34040523
<i>Pyrrhura_frontalis</i>	1 JAAAKN010000749.	749	52018765-52033413

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Pyrrhura griseipectus</i>	JAAAKS010000756. 1	756	1118445-1133091
<i>Pyrrhura lepida</i>	JAAB- NU010000669.1	669	36469-51115
<i>Pyrrhura molinae</i>	JAADKS010001862. 1	1862	14444-29091
<i>Pyrrhura perlata</i>	JAAGVT010000063. 1	63	11326753-11341399
<i>Strigops habroptila</i>	NC_044279.2	Cromosoma 3	74894068-74892214
<i>Pterocles burchelli</i>	VYZE01000246.1	scaffold_245	368761-364671
<i>Pterocles gutturalis</i>	NW_010098363.1	scaffold21776	19917-15559
<i>Pterocles orientalis</i>	WKFP01015504.1	jcf7180001136045	385925-400010
<i>Syrhaptus paradoxus</i>	VZTO01002866.1	scaffold2401	94162-98253
<i>Rhea americana</i>	PTEV01000086.1	scaffold_85	3214312-3229911
<i>Rhea pennata</i>	PTJI01000259.1	scaffold_259	604000-619634
<i>Aptenodytes forsteri</i>	NW_008794445.1	Scaffold284	740720-735593
<i>Aptenodytes patagonicus</i>	VULM01006140.1	123	1374296-1389126
<i>Eudyptes chrysocome</i>	VULL01001882.1	scaffold_38	2067217-2082057
<i>Eudyptes chrysolophus</i>	VULJ01003212.1	85	13126421-13141261
<i>Eudyptes filholi</i>	VULK01000405.1	scaffold_129	2357635-2372462
<i>Eudyptes moseleyi</i>	VULI01012245.1	scaffold86	2489145-2505858
<i>Eudyptes pachyrhynchus</i>	VULH01011446.1	scaffold217	2360033-2374859
<i>Eudyptes robustus</i>	VULG01057294.1	tarseq_24669	608386-623212
<i>Eudyptes schlegeli</i>	VULF01005462.1	scaffold134	2524925-2539765
<i>Eudyptes sclateri</i>	VULE01002629.1	scaffold_46	1527960-1542786
<i>Eudyptula albosignata</i>	VULD01004833.1	123	4827134-4841960
<i>Eudyptula minor</i>	VULC01013895.1	115	4838432-4853258
<i>Eudyptula novaehollandiae</i>	VULB01011539.1	219	4822261-4837087
<i>Me-gadyptes antipodes antipodes</i>	VULA01002506.1	4	27461195-27476020
<i>Pygoscelis adeliae</i>	NW_008825609.1	Scaffold399	448056-442424
<i>Pygoscelis antarcticus</i>	VUKZ01009972.1	129	2365015-2379843
<i>Pygoscelis papua</i>	VUKY01014327.1	128	507006-521835
<i>Spheniscus demersus</i>	VUKX01014533.1	38	27279482-27294303
<i>Spheniscus humboldti</i>	VUKW01004984.1	scaffold14	4602560-4617377
<i>Spheniscus magellanicus</i>	VUKV01013115.1	scaffold129	2089131-2103953
<i>Athene cunicularia</i>	NW_020799092.1	Cromosoma 1 parte 2	459779-453879
<i>Bubo bubo</i>	ML981084.1	scaffold944	77124-92299
<i>Bubo scandiacus</i>	MU208628.1	scaffold123	4482620-4497794
<i>Ciccaba nigrolineata</i>	VWZC01005258.1	scaffold9645	67879-74556
<i>Glaucidium brasilianum</i>	VXAP01000213.1	scaffold_186	1269749-1274918
<i>Otus sunia</i>	ML997808.1	scaffold930	4410456-4425583
<i>Strix occidentalis caurina</i>	NIFN02008677.1	Super-Scaffold_4_obj	58649229-58664395
<i>Tyto alba alba</i>	NW_022671385.1		3157673-3162711
<i>Struthio camelus australis</i>	NW_009271908.1	scaffold408	735783-741228
<i>Anhinga anhinga</i>	WBMU01000135.1	scaffold_131	278272-293046
<i>Anhinga rufa</i>	VZTV01057577.1	scaffold15501	15237-10445
<i>Fregata magnificens</i>	WAAD01003281.1	scaffold23511	13475-28317
<i>Phalacrocorax auritus</i>	NFMC01001377.1	scaffold1389	215750-230613

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>Phalacrocorax_brasilianus</i>	NFME01000480.1	scaffold496	5813-20562
<i>Phalacrocorax_carbo</i>	NW_009134459.1	scaffold21282	2294-7391
<i>Phalacrocorax_harrisi</i>	NEVG01000459.1	scaffold463	484227-499456
<i>Phalacrocorax_pelagicus</i>	NFMD01000387.1	scaffold395	803801-818581
<i>Sula_dactylatra</i>	WEKW01021210.1	scaffold2900	259867-274630
<i>Crypturellus_cinnamomeus</i>	PTEZ01000020.1	scaffold_19	3009691-3025879
<i>Crypturellus_soui</i>	VWPX01019907.1	scaffold535	190269-196517
<i>Crypturellus_undulatus</i>	VWPW01008193.1	scaffold647	192101-198283
<i>Eudromia_elegans</i>	VZSX01000149.1	scaffold_147	483189-489306
<i>Nothocercus_julius</i>	VZSV01000032.1	scaffold_30	6322606-6316417
<i>Nothocercus_nigrocapillus</i>	WBNA01000078.1	scaffold_76	1037123-1053272
<i>Nothoprocta_ornata</i>	VZSH01000043.1	scaffold_39	2695031-2701108
<i>Nothoprocta_pentlandii</i>	VZSG01000074.1	scaffold_73	327799-333896
<i>Nothoprocta_perdicaria</i>	NW_020456154.1	scaffold_86	2702391-2696025
<i>Tinamus_guttatus</i>	NW_010583973.1	scaffold8435	325-1652
<i>Apaloderma_vittatum</i>	NW_009693044.1	scaffold14470	108053-103010
<i>Trogon_melanurus</i>	VXAG01000135.1	scaffold_133	736746-731993
<i>Alligator_sinensis</i>	NC_000022.11	Cromosoma 22	35623354-35606764
<i>Homo_sapiens</i>		NW_006725354.1_cds_XP_007165766.1_1	
<i>Balaenoptera_acutorostrata</i>		NC_045794.1_cds_XP_036722853.1_1	
<i>Balaenoptera_musculus</i>		NW_022098037.1_cds_XP_022455612.1_1	
<i>Physeter_catodon</i>	WEKY01048791.1	scaffold5976	145697-158812
<i>Delphinapterus_leucas</i>		NW_021703783.1_cds_XP_029061405.1_1	
<i>Monodon_monoceros</i>		NW_006783590.1_cds_XP_007456317.1_1	
<i>Odobenus_rosmarus</i>	VXAB01003205.1	scaffold3602	294586-297912
<i>Lipotes_vexillifer</i>		NW_023398721.1_cds_XP_035956092.1_2	
<i>Phocoena_sinus</i>	BMBH01000009.1	Phaa_9	185954-200671
<i>Orcinus_orca</i>	VZRR01010047.1	scaffold3458	9818-6675
<i>Phoca_vitulina</i>		NC_045772.1_cds_XP_032502310.1_1	
<i>Halichoerus_grypus</i>		NW_025578510.1_cds_XP_045728583.1_1	
<i>Mirounga_angustirostris</i>		NW_023270739.1_cds_XP_034843514.1_1	
<i>Mirounga_leonina</i>		NW_006384927.1_cds_NP_001276998.1_1	
<i>Leptonychotes_weddellii</i>		NC_044322.1_cds_XP_030401180.1_1	
<i>Gopherus_evgoodei</i>		NC_057849.1_cds_XP_007062733.1_1	
<i>Chelonia_mydas</i>		NW_022641427.1_cds_XP_032630784.1_1	
<i>Chelonoidis_abingdonii</i>		NW_024885855.1_cds_XP_005300883.1_1	
<i>Chrysemys_picta</i>		NC_050068.2_cds_XP_038236618.1_2	
<i>Dermochelys_coriacea</i>		NC_059072.1_cds_XP_044858602.1_2	
<i>Mauremys_mutica</i>		NC_052623.1_cds_XP_039342828.1_1	
<i>Pelodiscus_sinensis</i>	WBMW01002985.1	scaffold468	1166692-1180334
<i>Mauremys_reevesii</i>		NW_024097037.1_cds_XP_039209007.1_1	
<i>Terrapene_carolina</i>	WHYT01016982.1	jcf7180000610616	58771-73145
<i>Trachemys_scripta</i>	WAAF01011419.1	scaffold8678	224233-239192
<i>Crotalus_tigris</i>		NC_046321.1_cds_XP_033018088.1_1	
<i>Pantherophis_guttatus</i>	VZRT01000345.1	scaffold_329	7704-10860
<i>Notechis_scutatus</i>	VZSV01000032.1	scaffold_30	6322606-6316417
<i>Protoboth-</i>	VZTP01042265.1	scaffold6087	231106-234215

Especie	Código de acceso	Scaffold	Segmento
<i>rops_mucrosquamatus</i>			
<i>Thamnophis_elegans</i>		NW_013658304.1_cds_XP_013916017.1_1	
<i>Thamnophis_sirtalis</i>	VXBW01005540.1	scaffold739	1020238-1016180
<i>Python_bivittatus</i>	VWYF01011016.1	scaffold11466	136404-133217
<i>Xiphorhynchus_elegans</i>	VZTU01025579.1	scaffold2882	312450-308580
<i>Pyrgilauda_ruficollis</i>	WUAO01000701.1	701	34026129-34040523
<i>Pseudonaja_textilis</i>	NW_005087592.1	scaffold138	2100599-2096648
<i>Gekko_japonicus</i>		NW_015165264.1_cds_XP_015265684.1_1	
<i>Pogona_vitticeps</i>	CM026790.1	Cromosoma 15	10342276-10357246
<i>Sceloporus_undulatus</i>	VWZF01001715.1	scaffold1430	883374-886555
<i>Varanus_komodoensis</i>	WBNN01035591.1	scaffold2167	62131-75256
<i>Zootoca_vivipara</i>	SWJQ01000091.1	scaffold75_size2432240	462259-476061
<i>Lacerta_agilis</i>		NC_046321.1_cds_XP_033018088.1_1	
<i>Podarcis_muralis</i>		NC_041321.1_cds_XP_028602583.1_1	
<i>Sceloporus_undulatus</i>		NC_056526.1_cds_XP_042324597.1_1	

Tabla 3. Carga neta a pH 7 y punto isoeléctrico de la Mb, junto a la masa promedio de la diferentes especies evaluadas.

Especie	Carga (e)	Punto isoeléctrico	Masa (g)
<i>Sagittarius_serpentarius</i>	2.80	9.24	4017
<i>Circaetus_pectoralis</i>	3.61	9.51	1500
<i>Spizaetus_tyrannus</i>	3.62	9.52	1013
<i>Aquila_chrysaetos_chrysaetos</i>	3.50	9.53	4263.5
<i>Chauna_torquata</i>	1.97	8.50	4400
<i>Anas_platyrhynchos</i>	2.63	9.20	1141
<i>Anas_zonorhyncha</i>	2.63	9.20	1011
<i>Anser_brachyrhynchus</i>	2.82	9.20	2646
<i>Anser_cygnoides_domesticus</i>	2.82	9.20	3513
<i>Anser_indicus</i>	2.82	9.20	2225
<i>Asarcornis_scutulata</i>	2.63	9.20	3000
<i>Aythya_fuligula</i>	2.63	9.20	701.5
<i>Branta_canadensis</i>	2.82	9.20	3727
<i>Cairina_moschata</i>	2.63	9.20	2450
<i>Cygnus_atratus</i>	2.82	9.20	5650
<i>Heteronetta_atricapilla</i>	2.82	9.20	539
<i>Nettapus_auritus</i>	2.63	9.20	266
<i>Oxyura_jamaicensis</i>	2.63	9.20	608.5
<i>Stictonetta-naevosa</i>	2.82	9.20	905.5
<i>Apteryx_australis_mantelli</i>	2.20	8.50	2330
<i>Apteryx_haastii</i>	2.20	8.50	2055
<i>Apteryx_rowi</i>	2.20	8.50	NA
<i>Apteryx_owenii</i>	2.20	8.50	1243
<i>Upupa_epops</i>	2.58	9.20	61.4
<i>Rhinopomastus_cyanomelas</i>	2.67	9.20	27.1
<i>Bucorvus_abyssinicus</i>	2.82	9.20	4000

Especie	Carga (e)	Punto isoeléctrico	Masa (g)
<i>Buceros_rhinoceros_silvestris</i>	2.86	9.20	2380
<i>Nyctibius_grandis</i>	4.62	9.71	547
<i>Hemiprocne_comata</i>	2.63	9.20	20.8
<i>Antrostomus_carolinensis</i>	2.65	9.23	109
<i>Caprimulgus_europaeus</i>	2.65	9.18	67
<i>Chordeiles_acutipennis</i>	2.65	9.23	47
<i>Nyctiprogne_leucopyga</i>	2.65	9.23	27.3
<i>Chaetura_pelagica</i>	2.64	9.16	23.6
<i>Oreotrochilus_melanogaster</i>	1.54	8.50	9.1
<i>Calypte_anna</i>	0.56	7.40	4.25
<i>Steatornis_caripensis</i>	2.65	9.19	408
<i>Casuaris_casuarius</i>	1.91	8.50	44000
<i>Balaenoptera_acutorostrata</i>	3.10	9.25	7500000
<i>Balaenoptera_musculus</i>	2.96	9.25	190000000
<i>Delphinapterus_leucas</i>	3.01	9.48	1500000
<i>Lipotes_vexillifer</i>	3.32	9.25	104500
<i>Monodon_monoceros</i>	3.34	9.25	1250000
<i>Orcinus_orca</i>	3.31	9.25	7200000
<i>Phocoena_sinus</i>	3.34	9.25	42500
<i>Physeter_catodon</i>	3.44	9.30	42500000
<i>Stercorarius_parasiticus</i>	1.65	8.50	445.5
<i>Arenaria_interpres</i>	1.65	8.50	136
<i>Calidris_pugnax</i>	1.66	8.50	136
<i>Calidris_pygmaea</i>	1.65	8.50	31.75
<i>Scolopax_mira</i>	1.65	8.50	447
<i>Himantopus_himantopus</i>	1.64	8.50	161
<i>Recurvirostra_avosetta</i>	1.64	8.50	304
<i>Larus_smithsonianus</i>	1.65	8.50	1085
<i>Phaetusa_simplex</i>	1.65	8.50	235
<i>Rissa_tridactyla</i>	1.65	8.50	416.3
<i>Rynchops_niger</i>	1.65	8.50	301.5
<i>Sterna_hirundo</i>	1.65	8.50	129.5
<i>Jacana_jacana</i>	2.67	9.20	108.3
<i>Glareola_pratincola</i>	2.62	9.20	84.9
<i>Rhinoptilus_africanus</i>	2.66	9.19	87.5
<i>Charadrius_alexandrinus</i>	1.65	8.50	42.3
<i>Pluvialis_apricaria</i>	1.66	8.50	214
<i>Burhinus_bistriatus</i>	2.60	9.30	787
<i>Uria_aalge</i>	3.68	9.51	992
<i>Uria_lomvia</i>	3.68	9.51	964
<i>Urocolius_indicus</i>	2.66	9.18	52.7
<i>Alopecoenas_beccarii</i>	2.65	9.19	94.8
<i>Caloenas_nicobarica</i>	2.65	9.19	540
<i>Columba_janthina_nitens</i>	2.65	9.19	397
<i>Columba_livia</i>	2.65	9.19	354.5
<i>Columbina_picui</i>	2.66	9.20	47
<i>Patagioenas_fasciata</i>	2.65	9.19	392

Especie	Carga (e)	Punto isoeléctrico	Masa (g)
<i>Streptopelia_turtur</i>	2.65	9.19	132
<i>Todus_mexicanus</i>	2.67	9.20	5.9
<i>Baryphthengus_martii</i>	2.62	9.20	165.5
<i>Brachypteracias_leptosomus</i>	2.65	9.16	185
<i>Alligator_sinensis</i>	1.80	8.46	NA
<i>Centropus_unirufus</i>	1.66	8.50	184.5
<i>Ceuthmochares_aereus</i>	1.67	8.50	65.8
<i>Crotophaga_sulcirostris</i>	2.65	9.22	82.2
<i>Cuculus_canorus</i>	2.66	9.22	111.5
<i>Geococcyx_californianus</i>	2.66	9.22	376
<i>Anomalopteryx_didiformis</i>	2.75	9.20	30000
<i>Rhynchotos_jubatus</i>	2.61	9.20	860
<i>Herpetotheres_cachinnans</i>	2.81	9.20	625
<i>Galbula_dea</i>	3.66	9.51	27.4
<i>Bucco_capensis</i>	1.65	8.45	54
<i>Gallus_gallus</i>	1.85	8.50	904
<i>Pavo_muticus</i>	1.85	8.50	2768
<i>Syrnaticus_mikado</i>	1.85	8.50	1158
<i>Odontophorus_gujanensis</i>	1.85	8.50	314.5
<i>Penelope_pileata</i>	1.83	8.50	1260
<i>Gavia_stellata</i>	2.81	9.00	1486
<i>Atlantisia_rogersi</i>	1.65	8.50	39.35
<i>Fulica_atra</i>	2.66	9.20	836
<i>Gallirallus_okinawae</i>	1.65	8.50	433
<i>Zapornia_atra</i>	1.65	8.50	77.45
<i>Psophia_crepitans</i>	1.65	8.50	1026
<i>Balearica_regulorum_gibbericeps</i>	2.32	9.06	3772
<i>Aramus_guarauna</i>	2.61	9.20	1080
<i>Leptosomus_discolor</i>	3.65	9.55	255
<i>Mesitornis_unicolor</i>	2.61	9.20	148
<i>Corythaeola_cristata</i>	3.12	9.22	965
<i>Corythaixoides_concolor</i>	3.61	9.56	258
<i>Tauraco_erythrolophus</i>	2.81	9.24	267.5
<i>Opisthocomus_hoazin</i>	2.75	9.24	696
<i>Zosterops_hypoxanthus</i>	2.68	9.20	12.5
<i>Erpornis_zantholeuca</i>	2.85	9.20	11.8
<i>Pteruthius_melanotis</i>	2.84	9.20	13.3
<i>Vireo_altiloquus</i>	1.86	8.50	17.9
<i>Mystacornis_crossleyi</i>	2.65	9.20	24.5
<i>Mionectes_macconnelli</i>	2.61	9.15	13.5
<i>Neopipo_cinnamomea</i>	1.62	8.43	7.7
<i>Catharus_fuscescens</i>	2.62	9.21	31.9
<i>Catharus_ustulatus</i>	2.62	9.21	30.3
<i>Sialia_sialis_strain_Louisiana</i>	2.62	9.21	27.5
<i>Turdus_rufiventris</i>	2.81	9.21	69.5
<i>Pachyramphus_minor</i>	2.61	9.15	36.6
<i>Sporophila_hypoxantha</i>	2.63	9.15	10.5

Especie	Carga (e)	Punto isoeléctrico	Masa (g)
<i>Rhegmatorhina_hoffmannsi</i>	2.79	9.15	31.4
<i>Sinosuthora_webbiana</i>	1.66	8.50	10.9
<i>Sylvia_atricapilla</i>	1.67	8.50	16.7
<i>Sylvia_borin</i>	1.66	8.50	18.2
<i>Leucopsar_rothschildi</i>	2.63	9.18	91.3
<i>Rhabdornis_inornatus</i>	2.63	9.18	39.1
<i>Erythrocerus_mccallii</i>	2.67	9.20	7.2
<i>Sapayoa_aenigma</i>	2.63	9.21	20.8
<i>Rhodinocichla_rosea</i>	2.63	9.18	48
<i>Anthoscopus_minutus</i>	1.67	8.50	6.6
<i>Ploceus_nigricollis</i>	2.63	9.18	27.1
<i>Platysteira_castanea</i>	2.65	9.20	14.1
<i>Manacus_vitellinus</i>	2.60	9.15	18.2
<i>Pipra_filicauda</i>	2.60	9.15	15.4
<i>Phylloscopus_plumbeitarsus</i>	1.66	8.30	8.6
<i>Phylloscopus_trochiloides_viridanus</i>	1.66	8.30	7.1
<i>Phylloscopus_trochilus_acredula</i>	1.67	8.30	8.7
<i>Phylloscopus_whistleri</i>	1.65	8.20	7.3
<i>Rhadina_sibilatrix</i>	1.67	8.30	9.2
<i>Illadopsis_cleaveri</i>	2.63	9.18	30.8
<i>Geothlypis_trichas</i>	1.63	8.44	9.45
<i>Setophaga_kirtlandii</i>	2.63	9.18	13.95
<i>Pachycephala_philippinensis</i>	2.69	9.20	22.3
<i>Pseudorectes_ferrugineus</i>	2.65	9.20	94
<i>Onychorhynchus_coronatus</i>	2.61	9.15	14
<i>Oxyruncus_cristatus</i>	2.60	9.15	42
<i>Orthonyx_spaldingii</i>	1.65	8.50	161
<i>Oriolus_oriolus</i>	2.68	9.19	79
<i>Nicator_chloris</i>	2.83	9.21	46.2
<i>Cercotrichas_coryphoeus</i>	2.65	9.20	20.4
<i>Erithacus_rubecula</i>	2.66	9.21	17.7
<i>Ficedula_albicollis</i>	1.67	8.50	12.7
<i>Oenanthe_oenanthe</i>	1.67	8.50	23.15
<i>Motacilla_tschutschensis</i>	2.64	9.19	14.4
<i>Myiagra_hebetior</i>	1.67	8.50	20.2
<i>Dryoscopus_gambensis</i>	2.65	9.20	31.9
<i>Sylvietta_virens</i>	2.64	9.20	8.4
<i>Hirundo_rustica_bHirRus1</i>	1.67	8.50	17.98
<i>Tachycineta_bicolor</i>	1.66	8.50	21.2
<i>Grallaria_varia</i>	2.59	9.16	119
<i>Furnarius_figulus</i>	2.60	9.15	28
<i>Chlorodrepanis_virens</i>	2.64	9.15	13.7
<i>Serinus_canaria</i>	2.64	9.15	24.3
<i>Dicrurus_megarhynchus</i>	2.65	9.20	130
<i>Cephalopterus_ornatus</i>	2.60	9.15	380
<i>Ptilorrhoa_leucosticta</i>	2.68	9.20	49.2
<i>Chloropsis_cyanopogon</i>	3.64	9.50	22

Especie	Carga (e)	Punto isoeléctrico	Masa (g)
<i>Cardinalis_cardinalis</i>	2.63	9.18	42.65
<i>Passerina_amoena</i>	2.63	9.18	15.5
<i>Pheucticus_melanocephalus</i>	2.63	9.18	47.15
<i>Calyptomena_viridis</i>	3.63	9.52	58.5
<i>Buphagus_erythrorhynchus</i>	2.63	9.18	50.75
<i>Oxylabes_madagascariensis</i>	1.68	8.50	23.3
<i>Alaudala_cheleensis</i>	2.65	9.20	22.2
<i>Eremophila_alpestris_peregrina</i>	2.65	9.20	32.2
<i>Hippolais_icterina</i>	1.61	8.50	13.2
<i>Mesembrinibis_cayennensis</i>	2.61	9.20	756
<i>Scopus_umbretta</i>	3.65	9.52	472
<i>Balaeniceps_rex</i>	3.96	9.49	5984
<i>Cochlearius_cochlearius</i>	2.62	9.20	695
<i>Egretta_garzetta</i>	2.61	9.20	312
<i>Gorsachius_goisagi</i>	2.61	9.20	527
<i>Semnornis_frantzii</i>	2.67	9.20	57.3
<i>Ramphastos_sulfuratus</i>	2.67	9.20	417
<i>Pogoniulus_pusillus</i>	2.66	9.20	9.6
<i>Tricholaema_leucomelas</i>	2.67	9.20	32.2
<i>Indicator_maculatus</i>	1.67	8.44	46.8
<i>Odobenus_rosmarus</i>	3.91	9.55	1000000
<i>Halichoerus_grypus</i>	3.37	9.24	185000
<i>Mirounga_angustirostris</i>	4.25	9.54	1450000
<i>Leptonychotes_weddellii</i>	4.30	9.51	500000
<i>Mirounga_leonina</i>	4.25	9.54	2050000
<i>Phoca_vitulina</i>	3.37	9.24	115000
<i>Homo_sapiens</i>	0.87	8.00	70000
<i>Anodorhynchus_hyacinthinus</i>	2.86	9.20	1331
<i>Psittacus_timneh</i>	2.83	9.21	333
<i>Probosciger_aterrimus</i>	2.83	9.21	841
<i>Pterocles_gutturalis</i>	2.57	9.20	338
<i>Rhea_americana</i>	2.11	8.49	23000
<i>Rhea_pennata</i>	3.04	9.23	23900
<i>Aptenodytes_forsteri</i>	4.99	9.70	33850
<i>Aptenodytes_patagonicus</i>	5.19	9.55	11751
<i>Megadyptes_antipodes_antipodes</i>	5.10	9.46	5330
<i>Pygoscelis_adeliae</i>	5.40	9.73	4850
<i>Pygoscelis_antarcticus</i>	5.45	9.71	4155.5
<i>Pygoscelis_papua</i>	5.44	9.73	5950
<i>Eudyptes_chrysocome</i>	5.09	9.46	2330
<i>Eudyptes_chrysolophus</i>	5.09	9.46	4490
<i>Eudyptes_filholi</i>	5.09	9.46	NA
<i>Eudyptes_moseleyi</i>	5.09	9.46	2327.9
<i>Eudyptes_pachyrhynchus</i>	5.09	9.46	3910
<i>Eudyptes_robustus</i>	5.09	9.46	3050
<i>Eudyptes_schlegeli</i>	5.09	9.46	4250
<i>Eudyptes_sclateri</i>	5.09	9.46	5908

Especie	Carga (e)	Punto isoeléctrico	Masa (g)
<i>Eudiptula_albosignata</i>	4.99	9.45	1319
<i>Eudiptula_minor</i>	4.99	9.45	1164.5
<i>Eudiptula_novaehollandiae</i>	4.99	9.45	1110
<i>Spheniscus_demersus</i>	4.99	9.45	3135
<i>Spheniscus_humboldti</i>	4.99	9.45	4379
<i>Spheniscus_magellanicus</i>	4.99	9.45	4120
<i>Crotalus_tigris</i>	-1.17	6.40	NA
<i>Gekko_japonicus</i>	2.50	9.40	NA
<i>Lacerta_agilis</i>	0.52	7.38	NA
<i>Notechis_scutatus</i>	-0.42	6.68	NA
<i>Pantherophis_guttatus</i>	-0.33	6.81	NA
<i>Podarcis_muralis</i>	-0.42	6.76	NA
<i>Pogona_vitticeps</i>	-0.32	6.81	NA
<i>Pseudonaja_textilis</i>	-0.25	6.85	NA
<i>Python_bivittatus</i>	0.74	8.00	NA
<i>Sceloporus_undulatus</i>	-0.21	6.90	NA
<i>Thamnophis_elegans</i>	-0.25	6.85	NA
<i>Thamnophis_sirtalis</i>	-0.26	6.85	NA
<i>Varanus_komodoensis</i>	-0.12	6.94	NA
<i>Zootoca_vivipara</i>	0.52	7.37	NA
<i>Ciccaba_nigrolineata</i>	2.87	9.20	458.5
<i>Glaucidium_brasilianum</i>	2.74	9.20	70.75
<i>Struthio_camelus_australis</i>	2.46	9.05	111000
<i>Anhinga_anhinga</i>	4.64	9.80	1235
<i>Anhinga_rufa</i>	4.64	9.73	1480.1
<i>Phalacrocorax_auritus</i>	4.64	9.80	1817
<i>Phalacrocorax_brasilianus</i>	4.64	9.80	1244.75
<i>Phalacrocorax_carbo</i>	3.65	9.60	2571.17
<i>Phalacrocorax_harrisi</i>	4.64	9.80	3050
<i>Phalacrocorax_pelagicus</i>	4.64	9.80	1856.5
<i>Chelonia_mydas</i>	1.69	8.50	129000
<i>Chelonoidis_abingdonii</i>	1.59	8.50	NA
<i>Chrysemys_picta</i>	1.72	8.50	NA
<i>Dermochelys_coriacea</i>	2.63	9.22	NA
<i>Gopherus_evgoodei</i>	2.35	9.31	NA
<i>Mauremys_mutica</i>	2.77	9.18	NA
<i>Mauremys_reevesii</i>	1.88	8.44	NA
<i>Pelodiscus_sinensis</i>	2.65	9.26	NA
<i>Terrapene_carolina</i>	1.72	8.50	NA
<i>Trachemys_scripta</i>	1.72	8.50	NA
<i>Crypturellus_soui</i>	0.88	8.00	217
<i>Crypturellus_undulatus</i>	0.73	8.00	567
<i>Nothocercus_julius</i>	2.00	8.52	693
<i>Nothocercus_nigrocapillus</i>	2.00	8.52	540
<i>Nothoprocta_ornata</i>	1.00	8.00	621.5
<i>Nothoprocta_pentlandii</i>	1.00	8.00	303

Especie	Carga (e)	Punto isoeléctrico	Masa (g)
<i>Nothoprocta_perdicaria</i>	1.00	8.00	458
<i>Eudromia_elegans</i>	1.89	8.47	703.5
<i>Apaloderma_vittatum</i>	3.66	9.52	55
<i>Trogon_melanurus</i>	2.63	9.20	114

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)