



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

“Exploración de los mecanismos genéticos involucrados en la
evolución de la dentición faríngea en peces óseos”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de:

Ingeniero en Biotecnología Molecular

JUAN PABLO NICOLÁS VENEGAS MARTÍNEZ

Director del Seminario de Título:
Dr. Alexander Omar Vargas Milne

28 de Junio de 2021
Santiago - Chile



DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el candidato

JUAN PABLO NICOLÁS VENEGAS MARTÍNEZ

“EXPLORACIÓN DE LOS MECANISMOS GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN LA EVOLUCIÓN DE LA DENTICIÓN FARÍNGEA EN PECES ÓSEOS”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Alexander Omar Vargas Milne

Director Seminario de Título:

COMISIÓN REVISORA Y EVALUADORA

Dr. Jorge Mpodozis Marín

Presidente Comisión:

Dr. Marco Méndez Torres

Evaluador:

Santiago de Chile, Septiembre 2021



BIOGRAFÍA



Nací en Santiago el 28 de abril de 1998. He vivido toda mi vida en la comuna de El Bosque. Completé la mayoría de mi educación primaria y secundaria en el Liceo Madre Cecilia Lazzeri, hasta el año 2015. Durante ese tiempo, descubrí un amor por la ciencia y la búsqueda de conocimiento, además de un ímpetu por crear. Estas dos se unieron en mi decisión de estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile el año 2016. A lo largo de mis estudios superiores me di cuenta realmente de la complejidad de la vida. Por esto mi interés cambió de la modificación de la vida a una fascinación por la complejidad biológica. Y en ningún ámbito esta complejidad es más evidente que en la evolución. De allí, la biología del desarrollo se reveló como otra arista fascinante para explorar. Poco después, comencé una pasantía en el Laboratorio de Ontogenia y Filogenia, donde he participado hasta el día de hoy. En el futuro espero continuar trabajando en el área del Evo-Devo, para descubrir más de la complejidad de la forma animal y enfrentarme a proyectos cada vez más ambiciosos.

AGRADECIMIENTOS

A Wikipedia, a Sci-Hub, y a todas las personas dispuestas a compartir el conocimiento.

Al Club de Rol de Ingeniería (CRI) por entregarme una vía de expresión creativa durante los tiempos difíciles a través de los cuales se desarrolló este trabajo.

A Sixto Morales Herrera, Delia Garrido y Sebastián Arizábalos, por notas muy asertivas sobre la redacción de este trabajo y apoyo invaluable a lo largo de todo el proceso.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
Estructura, desarrollo y origen de los dientes.....	1
Expresión génica en la odontogénesis.....	5
Rol odontogénico de <i>dlx2</i>.....	7
Rol odontogénico de <i>eve1</i>.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	16
Revisión de la morfología de la dentición en la evolución de vertebrados...16	
Región conservada del enhancer odontogénico de <i>dlx2</i>.....	18
Presencia del gen <i>eve1</i>.....	32
DISCUSIÓN Y PROYECCIONES.....	38
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	46
MATERIAL COMPLEMENTARIO.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	4
Figura 2.....	12
Figura 3.....	25
Figura 4.....	27
Figura 5.....	30
Figura 6.....	34
Figura 7.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP: bone morphogenetic protein.

MSX: muscle segment homeobox.

FGF: fibroblast growth factor.

PITX: paired-like homeodomain transcription factor.

DLX: distal-less homeobox.

EVE: even-skipped-like.

EVX: even-skipped homeobox.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

HOXB: homeo box B.

UBE2Z: Ubiquitin conjugating enzyme E2 Z

IGF2BP1: Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein

ATP5MC: ATP synthase membrane subunit c locus.

PB: Pares de bases.

RESUMEN

Una de las características distintivas de los vertebrados con mandíbula (Gnathostomata) es la dentición. A partir de elementos ancestrales comunes se ha desarrollado una enorme diversidad morfológica en los distintos grupos de vertebrados. Entre esta diversidad, se pueden encontrar dientes no solo en la región oral, sino también en la región faríngea, como el sistema de mandíbulas faríngeas en teleósteos y otros peces de aleta radiada (Actinopterygii). Estas mandíbulas faríngeas poseen dientes grandes similares a los de las mandíbulas orales, que además comparten mecanismos moleculares específicos del desarrollo dental. Los cambios en los patrones de expresión de morfógenos son una fuente de variación importante para la evolución morfológica. A su vez, estos patrones de expresión son modulados por factores de transcripción y secuencias regulatorias en el genoma. Por lo tanto, resulta interesante explorar la asociación entre cambios morfológicos en la evolución de la dentición faríngea, y la distribución filogenética de ciertos elementos genéticos que regulan la odontogénesis. Sin embargo, no existe claridad sobre el momento en la evolución en que aparece la dentición faríngea, incluso discutiéndose la posibilidad de un origen sumamente antiguo, previo a los dientes orales. Para aclarar este tema, se realizó una revisión de la literatura morfológica de la dentición faríngea en vertebrados fósiles y actuales, a fin de realizar análisis en un contexto filogenético-comparativo. Esta revisión reveló que la primera dentición faríngea hace su aparición mucho después que los dientes orales, en forma de placas dentales con pequeños

dientes sobre los arcos branquiales, hacia el origen del grupo corona de Osteichthyes. Luego, estos dientes aumentan de tamaño sobre los arcos más posteriores en algunos Actinopterygii, formando los dientes de las mandíbulas faríngeas. Para evaluar la correspondencia de estos cambios morfológicos con la aparición de mecanismos genéticos, se estudiaron elementos que están involucrados en el desarrollo de la dentición oral y faríngea de peces teleósteos, realizando una búsqueda de sus secuencias en genomas publicados de vertebrados. Se consideraron para este análisis una región conservada de una secuencia enhancer del gen *dlx2*, y el gen *eve1*. Se encontró que estos elementos genéticos se originaron hacia el grupo corona de Osteichthyes, coincidiendo con el origen de la dentición faríngea. Además, la distribución en la filogenia de la región enhancer apoya un origen del rol odontogénico de *dlx2* en Osteichthyes, en lugar de un origen ancestral en Gnathostomata. Por otro lado, se encontró la presencia no reportada previamente de *eve1* en el celacanto *Latimeria chalumnae*, cambiando la posición probable de la pérdida de este gen en el linaje conducente a tetrápodos, siendo posible que estuviese presente en tetrapodomorfos tempranos.

Se puede concluir que la dentición faríngea y mecanismos genéticos de la odontogénesis involucrando a *dlx2* y *eve1* se originan hacia el grupo corona de Osteichthyes, en un punto mucho más reciente de lo que se había sugerido anteriormente. A través de este acercamiento comparativo y bioinformático, fue posible formular hipótesis evolutivas relevantes para la evolución de la dentición faríngea, que podrán ser complementadas de manera experimental a futuro.

ABSTRACT

One of the most distinct characteristics of jawed vertebrates (Gnathostomata) is the presence of teeth. Teeth display enormous morphological diversity in different groups arising from common ancestral structures. Within this diversity, teeth can be found not only on the oral region, but also in the pharyngeal region, such as the pharyngeal jaw apparatus of teleosts and other ray finned fishes (Actinopterygii). These pharyngeal jaws possess large teeth comparable to those on the oral jaws and also share specific molecular markers of tooth development. Changes in the developmental expression patterns of morphogens are an important source of morphological evolution. In turn, these patterns of expression are driven by transcription factors and regulatory sequences in the genome. Thus, exploring the link between morphological changes throughout vertebrate dentition evolution with the distribution of certain genetic elements in genome databases is an interesting endeavor. However, there is currently no consensus on the point of origin of these pharyngeal teeth, with the idea that they may predate even oral teeth being prevalent. To shed light on this subject, a review of the morphological literature was undertaken, to establish analyses in a comparative phylogenetic context. This review revealed the origin of pharyngeal dentition, in the form of tooth plates with small teeth on the pharyngeal arches towards the origins of crown Osteichthyes. Later, these teeth enlarged in size on the posteriormost arches in some Actinopterygii lineages, forming the teeth of the pharyngeal jaw apparatus. To evaluate the correspondence of these morphological changes with the appearance of genetic mechanisms, a survey on genome databases of

elements involved in both oral and pharyngeal tooth development in teleosts was undertaken. For this analysis, a conserved region within an enhancer for the *dlx2* gene and the presence of the *eve1* gene were considered. It was found that these genetic elements originated towards the origin of crown Osteichthyes, coinciding with the appearance of pharyngeal teeth. Furthermore, the phylogenetic distribution of the *dlx2* enhancer region supports a late origin of the gene's odontogenic role, starting in Osteichthyes as opposed to an ancestral origin in Gnathostomata. On the other hand, the presence of a previously undescribed *eve1* gene was found on the coelacanth *Latimeria chalumnae*, changing the most likely position of the loss of this gene in the lineage leading to tetrapods, allowing for the possibility that it may have been present in early tetrapodomorphs.

In conclusion, pharyngeal teeth and novel odontogenesis mechanisms involving *dlx2* and *eve1* originated towards the origin of crown Osteichthyes, at a much later time than previously suggested. Using a dual comparative and bioinformatic approach, interesting hypotheses regarding the evolution of pharyngeal teeth were established and can be tested through experimental methods in the future.

INTRODUCCIÓN

Estructura, desarrollo y origen de los dientes:

Los dientes son estructuras mineralizadas propias de los vertebrados que consisten en una capa de esmalte o esmaltoide recubriendo dentina, que a su vez recubre una pulpa rica en nervios y vasos sanguíneos (Stock, 2001; Koussoulakou y col., 2009). Los dientes se originan en el desarrollo temprano de manera simultánea con la formación de los arcos branquiales, donde interactúan tejidos epiteliales y mesenquimáticos originados de todas las capas germinales (Soukup y col., 2008; Fraser y col., 2009; Berio & Debais-Thibaud, 2019). El proceso de formación de los dientes se encuentra conservado en gran medida en los vertebrados, incluso cuando las estructuras finales presentan una alta diversificación morfológica (Jackman y col., 2004). Los dientes pertenecen a un grupo de estructuras más amplio: los odontodos. Estas son estructuras descritas originalmente como unidades de tejido mineralizado que se forman de una yema única e incluyen un hueso de unión, dentina, y por lo general una capa de esmalte o esmaltoide. Los odontodos incluyen denticulos en la superficie corporal de condrictios, rastrillos branquiales, y dientes de las regiones orofaríngeas de osteíctios (mandíbulas, arcos branquiales, y otras superficies; Fig. 1A).

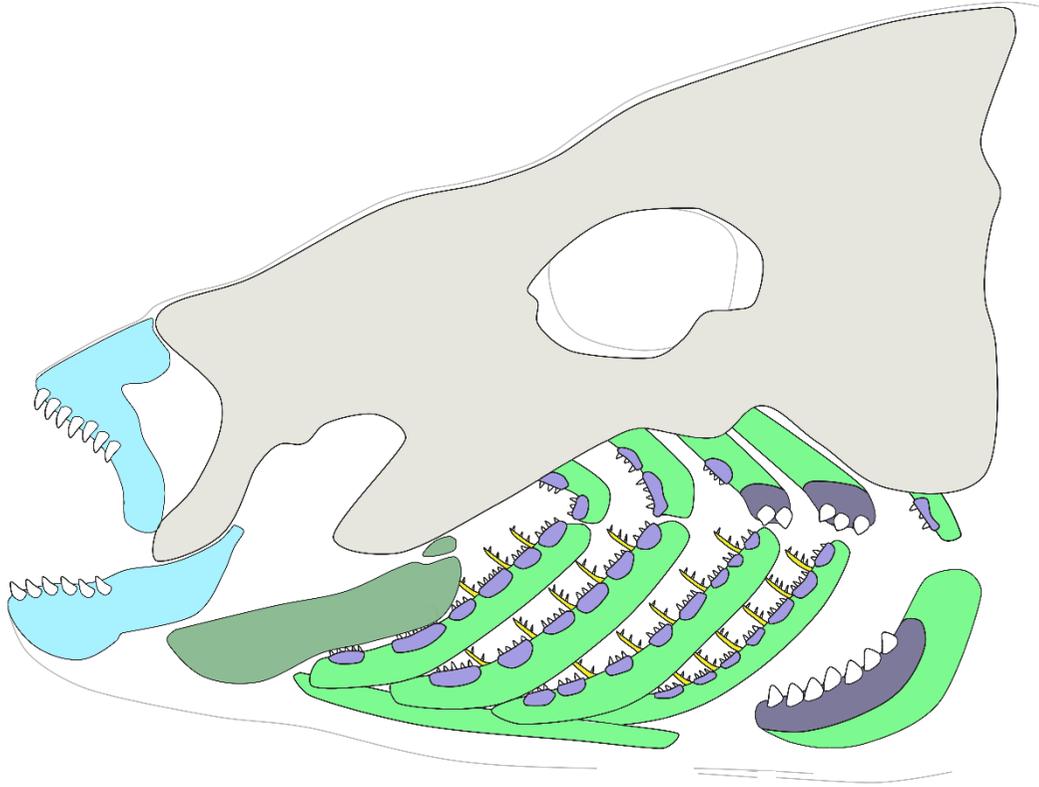
Se acepta que todos los odontodos son estructuras homólogas que se originaron de manera temprana en los vertebrados agnatos (Fraser y col., 2010). Sin embargo, aún es discutido cuáles fueron los odontodos que dieron origen a los dientes. Se han postulado distintos

modelos de este origen. El modelo “inside-out” postula que odontodos originalmente ubicados en la faringe posterior dieron origen a los dientes, y que luego ampliaron su distribución hacia anterior, especializándose en dientes orales. Esto se basa, en parte, en la presencia de odontodos semejantes a dientes en la región faríngea de telodontos, un grupo de peces agnatos fósiles. Este origen temprano implicaría que los dientes faríngeos son ancestrales a los orales, y por lo tanto los mecanismos moleculares compartidos entre estas dos estructuras serían sumamente antiguos. El modelo “outside-in”, por otro lado, postula que odontodos dérmicos en la superficie corporal externa pasaron a invadir la cavidad orofaríngea, donde se especializaron en dientes orales. Hallazgos recientes y reinterpretaciones del registro fósil han apoyado fuertemente el modelo “outside-in”, siendo particularmente importante la identificación de los odontodos faríngeos de telodontos como una adaptación independiente. Esta conclusión se alcanzó analizando de manera más precisa los patrones de distribución de estos odontodos en los distintos clados de telodontos y grupos emparentados, los cuales sugieren fuertemente que son un carácter derivado en sólo algunos telodontos, como *Loganellia*, y por lo tanto convergente con los dientes faríngeos de los gnatostomados (Reif, 1982; Huysseune y col., 2009; Donoghue & Rücklin, 2014; Witten y col., 2014; Haridy y col., 2019; Chen y col., 2020). Este debate ha generado cierta confusión sobre el origen evolutivo de la dentición en distintas ubicaciones de la región orofaríngea que se encuentran en vertebrados actuales, en particular los teleósteos.

Además de las mandíbulas orales, los teleósteos y otros actinopterigios actuales presentan un segundo aparato de masticación ubicado en la faringe, con dientes que se consideran homólogos a los orales: similares en estructura, desarrollo, expresión genética y función (véase el esquema en la Figura 1A; Huisseune y col., 2009; Louchart & Viriot, 2009; Hulsey y col., 2020). Estos han sido comparados a los antiguos "dientes" faríngeos de telodontos, pero ahora que estos últimos han sido descartados como dientes verdaderos, se hacen necesarios nuevos estudios para evaluar alternativas sobre el origen de los dientes de la región faríngea (Donoghue & Rücklin, 2014).

En la Figura 1A se presenta un esquema representativo de la dentición en teleósteos para asistir en el entendimiento de la morfología y ubicación relativa de las estructuras que serán mencionadas en este trabajo. Los peces teleósteos son el grupo de vertebrados más abundantes en la actualidad, y presentan una enorme diversidad de morfologías. Pero en general presentan dos aparatos masticatorios con dientes robustos: unas mandíbulas orales en el extremo anterior y unas mandíbulas faríngeas en la región más posterior. Estos se encuentran involucrados en la captura y procesamiento de alimentos. También presentan rastrillos branquiales derivados de odontodos proyectando desde los arcos branquiales que cumplen distintas funciones de filtración. Además, presentan dientes más pequeños que recubren las superficies orofaríngeas, incluyendo arcos branquiales y rastrillos branquiales (Nelson, 1969; Vandewalle et al., 1994; Huisseune y col., 2009; Berkovitz & Shellis, 2016).

A



- Mandíbulas Orales
- Arcos Branquiales
- Placas dentales faríngeas
- Neurocráneo
- Rastrillos Branquiales
- Mandíbulas Faríngeas [
- Arco Hioideo

B

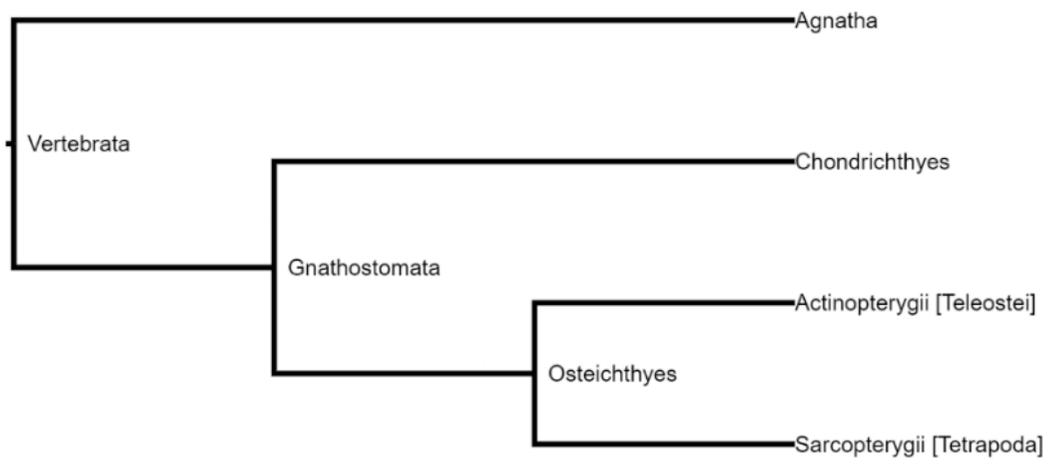


Figura 1: Morfología dental generalizada para Teleostei y Filogenia simple. (A) Esquema simplificado de la morfología de la dentición en un teleósteo. Se muestran las ubicaciones relativas de las distintas estructuras tratadas en este seminario: dientes en mandíbulas orales; rastrillos branquiales; dientes faríngeos en placas dentales sobre los arcos branquiales; dientes en los rastrillos branquiales; y dientes en mandíbulas faríngeas. (B) Relaciones filogenéticas simplificadas entre los principales grupos de vertebrados.

A pesar de vastas descripciones de los dientes faríngeos en los distintos grupos de Actinopterygii, en particular de Teleostei, se ha integrado poco conocimiento sobre su evolución. Es clave obtener información precisa sobre el momento en la evolución en que apareció la dentición faríngea, para poder identificar los procesos genéticos y del desarrollo que puedan haber estado involucrados. En este contexto, se realizará una revisión bibliográfica sobre los cambios morfológicos en la dentición a lo largo de la evolución de los vertebrados, con el fin de establecer una secuencia de transiciones que llevaron a las estructuras dentales presentes en organismos actuales y fósiles.

Además, esta revisión actuará como un marco sobre el cual evaluar caracteres moleculares del desarrollo dental, cuyo análisis puede aportar información desde otras líneas de evidencia para esclarecer los procesos involucrados en la evolución de la dentición faríngea.

Expresión génica en la odontogénesis:

Se han realizado estudios extensivos sobre la expresión genética durante el desarrollo de los dientes, particularmente en modelos murinos y teleósteos. A partir de estos, se ha determinado que existen redes de expresión génica comunes a dientes orales y faríngeos (Fraser y col., 2009; Hulsey y col., 2016; Singh y col., 2021). Sin embargo, muchos de estos genes también afectan la morfogénesis de otros odontodos y diversos órganos, como aquellos de las familias *Bmp*, *Msx*, *Fgf*, *Pitx*, *Dlx*, entre otros (Thesleff, 1995; Koussoulakou y col., 2009). Por esto, las diferencias morfológicas entre los odontodos deben atribuirse entonces a diferencias en la distribución espaciotemporal de la expresión de estos genes. Esta distribución se encuentra dirigida por enhancers, secuencias regulatorias en el genoma que permiten la reorganización espacial de la cromatina para la transcripción de genes bajo condiciones específicas. Es de particular importancia, también, la expresión de factores de transcripción, que a su vez pueden llevar a la expresión de otro conjunto de genes dependiendo de condiciones específicas (Prud'homme y col., 2007; Carroll, 2008; Pennacchio y col., 2013; Wagner, 2014).

Se han descrito diversas situaciones en las que cambios en secuencias genéticas regulatorias llevan a cambios morfológicos significativos, y en algunos casos, mutaciones en ellas recapitulan transiciones evolutivas importantes. Entre estas destacan los descubrimientos de numerosos enhancers y regiones regulatorias dirigiendo la expresión de factores de transcripción que se han asociado a cambios morfológicos como:

extensiones del esqueleto axial en amniotas; reducción o extensión de las extremidades en vertebrados; patrones de coloración desarrollados repetidas veces en la evolución de moscas; y la formación de morfologías dentales particulares en roedores (Belting y col., 1998; Shapiro y col., 2004; Maas & Fallon, 2005; Prud'homme y col., 2006; Cretekos y col., 2008; Pennacchio y col., 2013; Aigler y col., 2014; Tapaltsyan y col., 2016). Por medio de un análisis de estas secuencias regulatorias en poblaciones o en la filogenia es posible asociar variaciones a nivel molecular con variaciones morfológicas. Lo mismo ocurre con la aparición y pérdida de ciertos genes. Existen diversos ejemplos de esta aproximación de asociación genético/morfológica para dilucidar procesos evolutivos (Stock, 2001; Kawasaki y col., 2007; Zhu & Yu 2009; Schmid & Sánchez-Villagra, 2010; Meredith y col., 2014).

De este modo, al realizar un análisis bioinformático de las secuencias de genes odontogénicos y compararlo con la dentición en los distintos grupos evaluados, es posible evaluar si existe una correlación entre la presencia de nuevos elementos de regulación genética con cambios morfológicos importantes que hayan ocurrido en la evolución. Para este trabajo, se tomarán en cuenta dos genes, *dlx2* y *eve1*, que son diente-específicos, es decir: se encuentran involucrados en el desarrollo de dientes orales y faríngeos, pero no en la formación de otros odontodos. Debido a esto, es posible que presenten una relación con eventos importantes en la evolución de la dentición en vertebrados, como sería la aparición de dientes en la región faríngea.

Rol odontogénico de *dlx2*

Uno de los genes a evaluar es *dlx2*. Este pertenece a la familia de genes *dlx*, que codifican factores de transcripción homeóticos similares a *distal-less* y participan en distintos eventos del desarrollo, incluyendo la formación de muchas de las sinapomorfías de los vertebrados (MacDonald y col., 2010; Debiais-Thibaud y col., 2013). Específicamente, *dlx2* se encuentra involucrado en diversos procesos del desarrollo, como la formación del sistema nervioso, patterning de los arcos branquiales y odontogénesis, entre otros (Thomas y col., 2000; Depew y col., 2002; Jackman y col., 2004; MacDonald y col., 2010; Square y col., 2017).

Hay evidencia de que el gen *dlx2* está involucrado en el desarrollo de los dientes tanto en mamíferos como en teleósteos (Zhao y col., 2000; Borday-Birraux y col., 2006; Debiais-Thibaud y col., 2007). Se ha reportado su expresión durante el desarrollo tanto de dientes orales como faríngeos del medaka (*Oryzias latipes*), el tetra (*Astyanax mexicanus*) y pez cebra (*Danio rerio*; Jackman & Stock, 2006; Borday-Birraux y col., 2006; Debiais-Thibaud y col., 2008). A pesar de esto, no se ha encontrado su expresión en dientes en el condictio *Scyliorhinus canicula*, presentándose solo en los dentículos dérmicos. Entonces, es posible que los Chondrichthyes hayan perdido la expresión ancestral de *dlx2* en dientes, o que *dlx2* haya tomado su rol odontogénico solo en Osteichthyes. Sin

embargo, hace falta más evidencia para discriminar estas posibilidades (Debiais-Thibaud y col., 2011).

El gen *dlx2* se expresa tanto en el mesénquima como en el epitelio dental en distinta medida a lo largo de la odontogénesis, en conjunto con otros genes *dlx* en dominios sobrelapados (Zhao y col., 2000; Borday-Birraux y col., 2006; Debiais-Thibaud y col., 2007). Mutaciones del gen *dlx2* no alteran la morfología dental en ratones. Sin embargo, mutaciones dobles para *dlx2* y *dlx1* llevan a la ausencia de molares, confirmando la acción redundante de estos genes (Thomas & Sharpe, 1998). Se han visto resultados muy similares en ensayos con morfolinós en los dientes faríngeos del pez cebra (Jackman & Stock, 2006). De acuerdo con lo anterior, la sobreexpresión de *dlx2* lleva a dismorfia dental en ratones (Dai y col., 2017). En conjunto, estos experimentos demuestran la importancia de *dlx2* y sus parálogos en la morfología dental.

Se ha descrito una región enhancer que dirige la expresión de *dlx2* en dientes en tetrápodos y teleósteos (tanto faríngeos como orales, de acuerdo con cada especie; Thomas y col., 2000; Jackman & Stock, 2006). Esta consiste en una secuencia de 4 kb inmediatamente río arriba del gen *dlx2*, y en pez cebra incluye varios sitios de unión para los factores de transcripción de las vías Bmp, Fgf y para otros factores *Dlx*. Esta región enhancer, sin embargo, es considerablemente divergente entre tetrápodos y teleósteos, excepto por un segmento de 61 pb altamente conservado, sugiriendo un rol funcional. Este segmento

presenta sitios de unión para factores de transcripción *Dlx*, *FoxA*, *C/Ebp*, y *Ap-1* (Jackman & Stock, 2006).

La acción ligada a la odontogénesis de esta región y su conservación aparente en Osteichthyes indican que puede ser un elemento regulatorio asociado a cambios morfológicos que pueden haber ocurrido en este grupo.

Rol odontogénico de *eve1*

El otro gen implicado en el análisis de este seminario es *eve1*, de la familia *evx*. Los genes *evx* son genes homeóticos en vertebrados, homólogos a *even skipped (eve)* de *Drosophila*. *eve1* es un parálogo del gen *evx1* originado por una duplicación genómica en la base de Osteichthyes (Joly y col., 1993; Avaron y col., 2003; Debais-Thibaud y col., 2007). El gen *evx1* se encuentra involucrado en el desarrollo del patterning anteroposterior durante la gastrulación, el desarrollo del sistema nervioso, formación de estructuras intestinales y la elongación de la cola (Ruiz i Altaba & Melton, 1989; Dush & Martin, 1992; Avaron y col., 2003; Bell y col., 2016).

El gen *eve1* se ha descrito solamente en Actinopterygii, considerándose perdido en el linaje que lleva hacia tetrápodos. *eve1* y *evx1* en Teleostei presentan dominios de expresión complementarios correspondientes a la expresión de *evx1* en tetrápodos, cuya condición se considera ancestral (Avaron y col., 2003). Sin embargo, *eve1* se encuentra expresado también en sitios no representados en el patrón de *evx1* de tetrápodos,

notablemente en la formación de dientes (Joly y col., 1993; Barro y col., 1995; Avaron y col., 2003). Existe evidencia que indica que *eve1* cumple un rol en la formación de dientes faríngeos y orales de los teleósteos *Danio rerio* y *Oryzias latipes*, en fases de iniciación, morfogénesis y diferenciación (Laurenti y col., 2004; Debiais-Thibaud y col., 2007). La aparición de este gen y la ganancia de su función odontogénica puede estar relacionada con posibles cambios en la dentición en Osteichthyes, por lo que acotar el rango temporal de su pérdida en el linaje de tetrápodos podría ayudar a establecer una asociación con la morfología de estos grupos.

Una vez que se establezca un marco de la historia evolutiva de la dentición, por medio de una revisión bibliográfica, será posible asociar la distribución de conservación de la región del enhancer de *dlx2* y el gen *eve1* en distintos organismos actuales, por medio de búsquedas en genomas de vertebrados publicados.

Hipótesis: Si elementos genéticos asociados a la odontogénesis oral y faríngea (la región conservada del enhancer de *dlx2* y el gen *eve1*) guardan relación con el origen de la dentición faríngea, presentarán un origen en la filogenia que coincida con la aparición de estos dientes.

Objetivo General:

Explorar la relación entre caracteres moleculares involucrados en la odontogénesis oral y faríngea (región del enhancer de *dlx2* y el gen *eve1*), y la morfología de la dentición faríngea en vertebrados a lo largo de la evolución.

Objetivos específicos:

- Recopilar la información morfológica disponible respecto a la morfología de la dentición faríngea en vertebrados actuales y fósiles.
- Evaluar la presencia de ciertos elementos genéticos involucrados en la odontogénesis en especies actuales (región del enhancer de *dlx2* y gen *eve1*), en bases de datos genómicas.
- Comparar la distribución de los caracteres morfológicos y moleculares evaluados en los principales grupos de vertebrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para aproximarnos a los objetivos propuestos, se realizó una búsqueda extensiva de la literatura por descripciones de la distribución de la dentición en vertebrados actuales. También se complementa con descripciones de la dentición de representantes fósiles. Se buscó información en publicaciones sobre cada clado presentado en la Figura 2, en la que se incluyen los principales grupos de vertebrados. Se puso énfasis en la condición morfológica propuesta por estas publicaciones para la base de cada grupo.

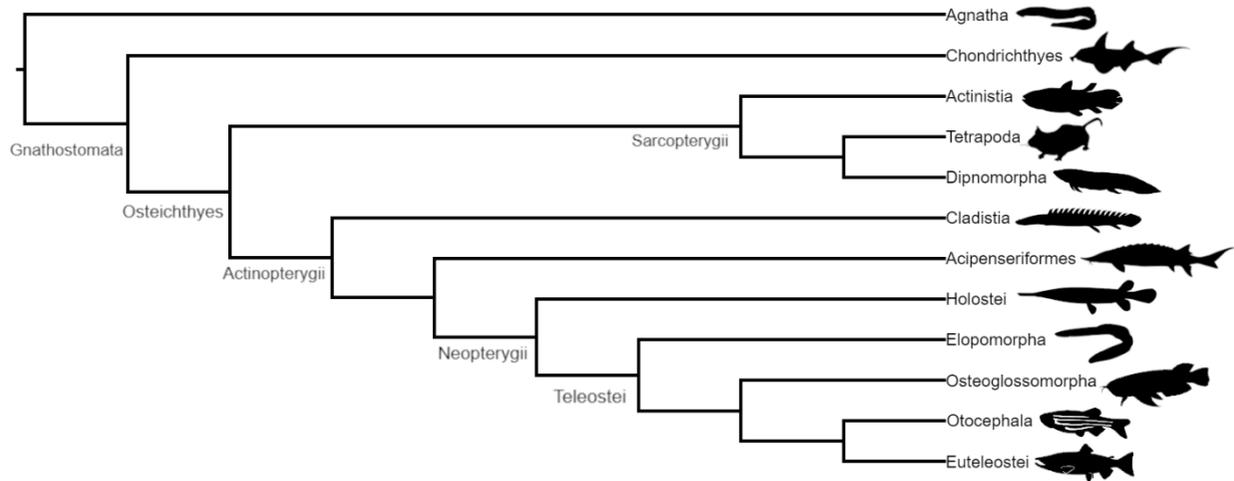


Figura 2: Filogenia de Vertebrados. Árbol filogenético simplificado incluyendo los principales grupos de vertebrados con representantes actuales considerados para el análisis. Se presentan siluetas de representantes actuales de cada grupo en las puntas de cada rama. Filogenia adaptada desde Betancur-R y col., 2017. Las siluetas fueron obtenidas desde Phylopic.org. La silueta para

Chondrichthyes corresponde a una imagen *Callorhincus milii* de Tony Ayling (vectorizada por Milton Tan).

Para evaluar la distribución en la filogenia de la región conservada del enhancer del gen *dlx2*, se realiza una búsqueda por medio de BLAST (Altschul y col., 1990) y BLAT (Kent, 2002) de genes ortólogos de *dlx2b* de *Danio rerio* [ENSDARG00000017174] en vertebrados en las bases de datos de genomas Ensembl (Yates y col., 2019) y GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information; Benson y col., 2016). A partir de esto se encontraron 100 ortólogos putativos de *dlx2* con e-values satisfactorios considerando el tamaño de las secuencias, y ubicados en regiones cromosómicas coherentes, provenientes de 72 especies de vertebrados. En el caso de los Agnatha, *Petromyzon marinus* y *Eptatretus burgeri*, se obtuvo la secuencia del gen *dlx5*, el ortólogo más cercano a *dlx2* presente en estos animales. Se extendió la búsqueda a whole-genome-shotgun-sequences de la base de datos de NCBI para recopilar información de especies pertenecientes a grupos filogenéticamente relevantes que no presentan genomas anotados. Estas fueron *Amblyraja radiata*, *Pristis pectinata*, *Acipenser ruthenus*, *Acipenser oxyrinchus*, *Anguilla japonica* y *Anguilla rostrata*. Se recopilaron todas las secuencias encontradas incluyendo 20.000 pares de bases río arriba y abajo, cuando fuera posible, para asegurar la captura de las secuencias regulatorias asociadas.

Una vez recopiladas estas secuencias, se ubicó en cada una la secuencia conservada de 61 pb del enhancer odontogénico descrito por Jackman y Stock (Jackman & Stock, 2006) por medio del software UniDPlot, que permite identificar similitudes sutiles entre secuencias (Sire & Girondot, 2010). Se utilizaron los parámetros estándar para este programa, con un rango de ventana de 30 a 40 pares de bases, dependiendo de la calidad de la secuencia. Se recopilaron todas las regiones del enhancer encontradas y se procedió a realizar un alineamiento múltiple en BioEdit (Hall, 1999). Este alineamiento se hizo en primera instancia con el software ClustalW (Larkin y col., 2007) de alineamiento múltiple de secuencias y luego fue ajustado de manera manual. A partir del alineamiento múltiple se obtuvo una matriz de identidad comparando todas las secuencias entre sí utilizando la herramienta BioEdit. El alineamiento fue modificado para cuantificar los valores de identidad para la región del enhancer completa y para los sitios de unión de factores de transcripción reportados por separado (para los factores *Dlx*, *Hnf-3*, *C/Ebp* y *Ap-1*; Jackman & Stock, 2006). Los sitios de unión fueron comparados con las matrices de frecuencia correspondientes descritas en la base de datos JASPAR (Fornes y col., 2019) para cada factor de transcripción, para evaluar su afinidad relativa.

De manera similar, se recopilaron secuencias homólogas del gen *eve1* y *evx1*, su parálogo más cercano en especies de vertebrados en la base de datos genómicos Ensembl. Se obtuvieron secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las proteínas predichas de 90 genes homólogos de *eve1* en 76 especies. En el caso de *evx1* se obtuvieron secuencias

nucleotídicas y aminoacídicas de 98 genes en 84 especies. Se obtuvieron también secuencias nucleotídicas de organismos filogenéticamente importantes desde whole-genome-shotgun-sequences de la base de datos de NCBI. Estos fueron *Acipenser ruthenus* y *Anguilla japonica*. También se obtuvieron secuencias de *Lepidosiren paradoxa* desde el proyecto transcriptómico de código PRJNA301439. Se puso particular énfasis en especies de Sarcopterygii, ya que este grupo no presenta secuencias reportadas para *eve1*. Para algunas de estas especies se encontraron homólogos putativos que no habían sido reportados previamente. Se aplicó el algoritmo BLAST recíprocamente entre las secuencias putativas y genes *eve1*, *evx1* y *evx2* de *Danio rerio* reportados para establecer su homología. Los candidatos fueron posteriormente evaluados por su ubicación cromosómica y la ubicación relativa de genes colindantes (sintenia). Para evaluar la posible funcionalidad de los candidatos encontrados, fueron traducidos con el software Expasy (Artimo y col., 2012) y se realizaron alineamientos con ClustalW en BioEdit de las proteínas codificadas, para identificar corrimientos del marco de lectura o degeneración de dominios conservados. Con este alineamiento, se generaron también árboles filogenéticos por Neighbour-Joining, también utilizando ClustalW, en base a todas las secuencias proteicas recopiladas, para evaluar el agrupamiento de los distintos candidatos.

RESULTADOS

Revisión de la morfología de la dentición en la evolución de vertebrados:

A continuación, se presentará una descripción resumida de la distribución de odontodos orofaríngeos en grupos de vertebrados actuales, con énfasis en la condición ancestral propuesta para cada uno en la literatura (Para mayor claridad sobre la filogenia, revisar la Figura 2 y, para la morfología de cada grupo, la Figura Complementaria 1). Se complementa también, cuando es relevante, con información de especies fósiles. Lamentablemente, el registro fósil de la región faríngea es pobre, debido a la delicadeza de estas estructuras y su posición interna, sin embargo, la información disponible puede esclarecer la morfología ancestral de ciertos grupos a evaluar.

Agnatha: Los vertebrados sin mandíbula actuales, representados por los mixinos y lampreas, no presentan dentición. Los primeros odontodos se formaron en miembros derivados extintos de agnatos en distintas ubicaciones corporales, pero se encuentran ausentes en los representantes actuales (Smith & Coates, 2001; Fraser y col., 2010; Rücklin y col., 2012; Donoghue & Rücklin, 2014).

Gnathostomata: En los vertebrados con mandíbula se pueden ubicar los primeros dientes verdaderos, posicionados en el margen oral en placodermos fósiles (Rücklin y col., 2012, Vaškaninová y col., 2020) y los primeros rastrillos branquiales cerca del origen de los gnathostomados corona (Nelson, 1968b). A partir de esta condición ancestral se derivan los Chondrichthyes y Osteichthyes (Nelson, 1969; 1970; Maisey y col., 2013).

Chondrichthyes: Los condriictios, que incluyen a tiburones, rayas (Elasmobranchii) y quimeras (Holocephali) modernas, son los animales actuales más basales que presentan dientes, los cuales se encuentran arreglados en filas. Estos dientes se ubican solo en el margen oral en la mayoría de los grupos. También presentan, como característica ancestral, dentículos dérmicos que recubren sus superficies corporales y rastrillos branquiales en sus arcos branquiales (Nelson, 1969; Smith & Coates, 2001; Maisey y col., 2013).

Osteichthyes: Los peces óseos, representados en la actualidad por los Sarcopterygii y los Actinopterygii, conforman el grupo mayoritario de vertebrados. Estos presentan, como condición ancestral probable, dientes orales marginales, rastrillos branquiales, y dientes en miniatura recubriendo la superficie orofaríngea. Estos dientes en miniatura se originan en este grupo y son morfológicamente muy similares a los dientes orales, arreglándose en filas y ubicándose sobre láminas delgadas de hueso, conocidas como placas dentales (Wacker y col., 2001; Ahlberg y col., 2006; Donoghue & Rücklin, 2014). Esta condición se observa en el osteíctio troncal *Lophosteus*, por ejemplo (Chen y col., 2017; 2020). En los peces óseos corona aparecen estas placas también sobre los arcos branquiales y dientes no asociados a placas dentales sobre la superficie de los rastrillos branquiales (Grande & Bemis, 1998; Atukorala & Franz-Odenaal, 2014; Chen y col., 2017). Estas estructuras presentan características particulares en los grupos que componen los peces óseos, como se discutirá más adelante.

Sarcopterygii: De la condición basal de Osteichthyes se derivan los peces de aleta lobulada, que incluyen a los celacantos, peces pulmonados y tetrápodos.

Actinistia: Los celacantos del género *Latimeria* actuales y muchas formas fósiles presentan una morfología dental similar a la ancestral de Osteichthyes, con dientes orales, placas dentales con dientes pequeños sobre superficies orofaríngeas y arcos branquiales, aunque no presentan rastrillos branquiales (Smith, 1979; Hughes, 1998).

Dipnomorpha: Los peces pulmonados actuales, incluyendo diversos representantes extintos, presentan una dentición sumamente derivada, con estructuras dentales trituradoras formadas por fusión de unidades dentales individuales en el paladar y la superficie inferior de la mandíbula (Smith, 1977; Kemp, 1979; Butler, 1995). Aparte de esta transformación, los peces pulmonados perdieron las placas dentales en sus arcos branquiales, pero mantienen sus rastrillos branquiales (Bartsch, 1994; Ahlberg y col., 2006; Huysseune y col., 2009). Los Porolepiformes, miembros troncales de este grupo, presentan dentición menos derivada, incluyendo placas dentales orofaríngeas, pero no hay evidencia de éstas sobre los arcos branquiales (Ahlberg, 1991; Downs y col., 2011).

Tetrapoda: Los tetrápodos presentan una gran variación en sus arreglos dentales, en general manteniendo una tendencia hacia la reducción de la dentición fuera de los márgenes orales, con solo los grupos menos derivados manteniendo dientes extraorales (Davit-Béal, 2009; Huysseune y col., 2009). Sin embargo, como condición ancestral del grupo se encuentra la presencia de placas dentales con dientes en la superficie oral y arcos

branquiales, y la ausencia de rastrillos branquiales, como se puede ver en el tetrápodo troncal *Eusthenopteron* (Jarvik, 1980; Huysseune y col., 2009; Chen y col., 2017).

Actinopterygii: Los actinopterigios, o peces de aleta radiada corresponden a un grupo muy diverso de vertebrados, particularmente los Teleostei, por lo que solo se describe su morfología general. La condición ancestral probable para este grupo es similar a la descrita para Osteichthyes. Actinopterygii troncales del registro fósil, como *Mimipiscis*, *Moythomasia* y *Raynerius*, presentan esta condición, con placas dentales con pequeños dientes faríngeos de tamaño equivalente en todos los arcos branquiales (Gardiner, 1984; Giles y col., 2015). También, especies actuales de Actinopterygii suelen presentar dientes pequeños por sobre los rastrillos branquiales (Nelson, 1969; Sire y col., 1998; Smith, 2003).

A pesar de que no estaba presente en la base o el grupo corona de este clado, en la gran mayoría de los representantes actuales de Actinopterygii existe una adaptación particular: un aparato de mandíbulas faríngeas. En estos animales los dientes faríngeos posteriores adoptan un tamaño y forma comparable a los dientes orales y un reordenamiento muscular permite generar otra estructura de mordida. El componente superior de la mandíbula faríngea se forma por los faringobranquiales del 2°, 3° o 4° arco branquial dependiendo de la especie. El componente inferior se forma en general por ceratobranquial del 5° arco branquial. Este aparato de mandíbulas faríngeas asiste tanto en el transporte intrafaríngeo de alimento como en su procesamiento, dependiendo de la especie (Nelson, 1969;

Vandewalle y col., 1994; Debiais-Thibaud y col., 2008; Berkovitz & Shellis, 2016). Esta disposición se presenta tanto en los grupos Cladistia y Neopterygii, como se verá más adelante.

Cladistia: El grupo Cladistia, representado por los bichires actuales, corresponde al clado más basal de los Actinopterygii. Este grupo presenta dientes orales, placas dentales con dientes por toda la cavidad orofaríngea incluyendo sobre los arcos branquiales, rastrillos branquiales y mandíbulas faríngeas. Estas últimas presentan una morfología particular, ya que su componente inferior está formado por el 4° arco branquial (el 5° se encuentra ausente en este clado; Allis, 1922; Wacker y col., 2001; Claeson y col., 2007; Carvalho y col., 2013). Este hecho podría indicar un origen independiente del carácter con respecto a otros Actinopterygii que lo presentan. Podría indicar también, por otro lado, una transformación homeótica de la mandíbula faríngea de origen ancestral hacia el cuarto arco una vez que se perdió el quinto. El registro fósil de Cladistia permite esclarecer esta ambigüedad, con *Fukangichthys*, que ha sido propuesto como un miembro troncal. Este no presenta un quinto arco branquial, ni presenta evidencia de una especialización de mandíbulas faríngeas en el cuarto arco (Giles y col., 2017). Esto sugiere que estas mandíbulas faríngeas se originaron en el grupo corona de Cladistia, en animales con sólo 4 arcos branquiales.

Acipenseriformes: Este clado corresponde a un orden basal de Actinopterygii representado por los esturiones y peces espátula actuales. Estos presentan una reducción

sustancial de su dentición, además de una ausencia de mandíbula faríngea. Los dientes solo son observables en individuos juveniles, perdiéndose totalmente a lo largo de la ontogenia (Nelson, 1969; Smith y col., 2015; Warth y col., 2017). En Acipenseriformes se presentan, sin embargo, rastrillos branquiales convencionales (Grande & Bemis, 1991). La ausencia de dentición en adultos es claramente una condición derivada para este grupo, pero genera incertidumbre sobre la condición ancestral que tendrían en relación a las mandíbulas faríngeas. Estas podrían haber sido perdidas de manera secundaria si es que se originaron cerca de la base de los Actinopterygii corona, o nunca haber estado presentes en Acipenseriformes, habiéndose originado independientemente en Cladistia y Neopterygii (ver a continuación). El registro fósil apoya esta última hipótesis, con el Acipenseriformes troncal *Chondrosteus* presentando dientes orales y faríngeos en adultos, pero sin evidencia de placas dentales de mayor tamaño en los arcos posteriores (Hilton & Forey, 2009).

Neopterygii: De una condición similar a la ancestral para actinopterygios se derivan los neopterygios, que incluyen a Holostei y Teleostei. Los representantes modernos de este grupo presentan dientes en la mandíbula oral, las superficies orofaríngeas, incluyendo arcos branquiales y en las mandíbulas faríngeas. Sin embargo, uno de los pocos Neopterygii troncales del registro fósil con estructuras faríngeas preservadas es *Bobasatrania*, con una morfología dental muy derivada. Este se trata de un aparato de masticación lingual análogo al de Osteoglossomorpha (ver más adelante),

con ausencia de mandíbulas faríngeas y dientes orales (Böttcher, 2014; Latimer & Giles, 2018). Esto indicaría que las mandíbulas faríngeas se originarían en el ancestro de los Neopterygii corona, de manera independiente con las adaptaciones faríngeas de Cladistia. Aunque también es posible que haya ocurrido una pérdida de las mandíbulas faríngeas en *Bobasatrania*, debido a su morfología particular, y que este carácter haya estado en el ancestro de todos los Neopterygii.

Holostei: Este grupo, representado por el pez *Amia calva* y los pejelagartos, son los Actinopterygii modernos más basales que presentan la dentición característica del grupo. Tienen dientes orales marginales, placas dentales orofaríngeas sobre los arcos branquiales y dientes robustos sobre la estructura del 5° arco arreglada en una mandíbula faríngea simple, además de rastrillos branquiales con dientes (Nelson, 1969; 2009; Thies, 1989).

Teleostei: Este clado conforma el grupo más diverso de vertebrados existentes. Estos presentan una enorme variedad de morfologías dentales, que se mantienen en el esquema general de Neopterygii, similar a los Holostei en las formas basales, pero con morfologías más derivadas en subgrupos posteriores, que serán evaluados a continuación (Nelson, 1969; 2009; Vandewalle y col., 1994).

Elopomorpha: Los elopomorfos corresponden al grupo más basal de Teleostei, presentando gran variación morfológica, destacando las anguilas verdaderas. Algunos subgrupos presentan la morfología considerada ancestral para Teleostei, como las

especies del género *Elops*, con dientes orales, placas dentales orofaríngeas sobre los arcos branquiales, mandíbulas faríngeas simples, y rastrillos branquiales (Nelson, 1969; Vandewalle y col., 1994). Pero subgrupos más derivados presentan adaptaciones interesantes, particularmente la familia Muraenidae (Nelson, 1968a). Estos últimos carecen de quinto arco branquial, y presentan una mandíbula faríngea raptorial muy desarrollada conformada por el cuarto arco, de manera similar a Cladistia (Mehta, 2008). Esto ocurre también de manera independiente en otros Elopomorpha, siendo particularmente común dentro del orden Anguilliformes (Nelson, 1968a). Esta condición es claramente derivada debido a la posición anidada de estas formas entre grupos con mandíbulas faríngeas en el 5° arco.

Osteoglossomorpha: El siguiente clado de Teleostei más basal son los osteoglosomorfos. Además de las mandíbulas faríngeas, este grupo presenta una adaptación particular en su dentición, utilizando principalmente un “Aparato de masticación lingual” para procesar su alimento. Este se encuentra compuesto de dentición muy desarrollada en el componente basibranquial de sus arcos branquiales y el paladar, con musculatura que permite movimientos masticatorios (Nelson, 1968a; 2009; Sanford & Lauder, 1989; 1990; Vandewalle y col., 1994). De cualquier manera, la condición ancestral para este grupo se asemeja a la primitiva esperada para Teleostei, con dientes orales, placas dentales orofaríngeas sobre los arcos branquiales, rastrillos branquiales y mandíbulas faríngeas. Cabe destacar que las mandíbulas faríngeas se pierden en algunas

formas, como *Paramormyrops*, presumiblemente por la redundancia funcional con el aparato de masticación lingual (Nelson, 1968a).

Otocephala: Este grupo es bastante diverso, incluyendo desde pirañas a peces gato a varios animales modelo, como el pez cebra (*Danio rerio*) o el tetra (*Astyanax mexicanus*). Su aparato dental presenta una tendencia hacia la reducción de las placas dentales orofaríngeas y dientes orales, con un fortalecimiento de las mandíbulas faríngeas (Nelson, 1967a; Atukorala & Franz-Odenaal, 2014; Jandzik & Stock, 2020). En algunos grupos, como los del orden Cypriniformes, se ha perdido completamente la dentición oral, delegando todo el procesamiento de alimento a las mandíbulas faríngeas (Stock, 2006).

Euteleostei: Este grupo corresponde a la división más diversa de Teleostei y Actinopterygii en general. Este clado incluye los Protacanthopterygii y Neoteleostei. Estos presentan una morfología muscular más sofisticada para el movimiento de la mandíbula faríngea (Nelson, 1967b; Lauder & Wainwright, 1992; Chardon y col., 2000). Algunos Protacanthopterygii, que incluye salmones y afines, presentan un sistema de aparato de masticación lingual análogo al de Osteoglossomorpha (Camp y col., 2009; Gromova & Makhotin, 2016). En Neoteleostei, el grupo más derivado, continúa la tendencia al fortalecimiento del aparato dental faríngeo por sobre el oral, presentando gran diversidad dependiendo de la dieta (Vandewalle y col., 1994; Wainwright y col., 2012). Esta última es particularmente notable en las adaptaciones dentales de la familia Cichlidae (Streelman y col., 2003; Burrell, 2014).

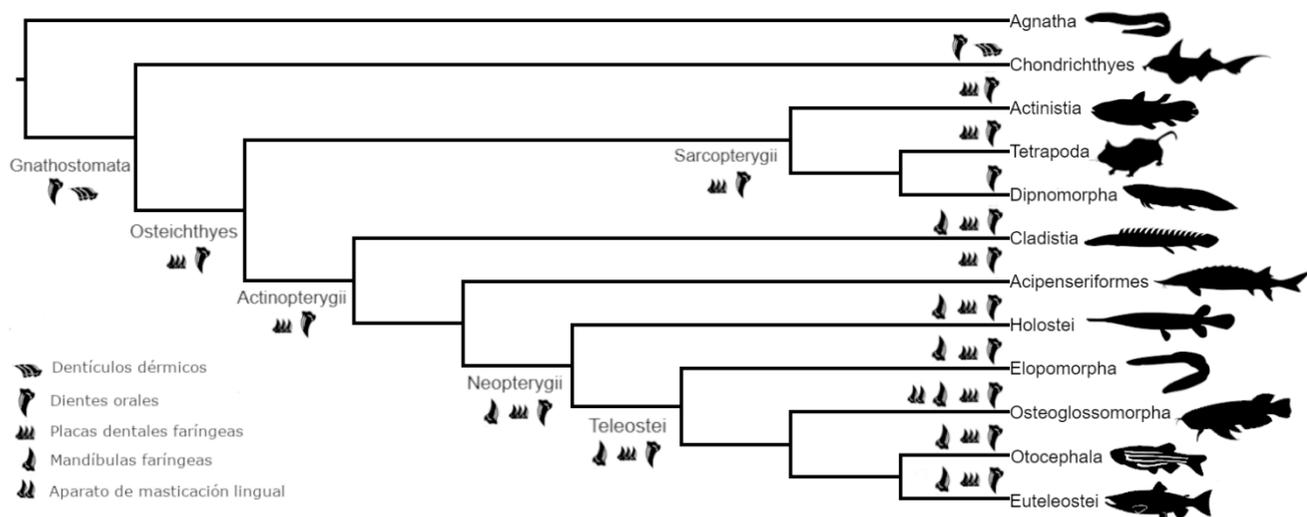


Figura 3: Los dientes faríngeos se originan en Osteichthyes y las mandíbulas faríngeas de manera independiente en Cladistia y Neopterygii. Filogenia simplificada de vertebrados representando la morfología general de la dentición en los grupos evaluados. Se señala una condición representativa para cada grupo de presencia de dentículos dérmicos, dientes orales, placas dentales con dientes faríngeos en los arcos branquiales, aparato de mandíbulas faríngeas y aparato de masticación lingual (se marca la condición ancestral inferida para cada grupo). En ciertos nodos se señalan la condición propuesta para ancestros en la base de clados más inclusivos. Por simplicidad se consideran las mandíbulas faríngeas de Cladistia como el mismo carácter que las presentes en Neopterygii. Filogenia adaptada desde Betancur-R y col., 2017. Las siluetas fueron obtenidas desde Phylopic.org. La silueta para Chondrichthyes corresponde a una imagen *Callorhincus milii* de Tony Ayling (vectorizada por Milton Tan).

Este análisis de la literatura revela dos etapas claves para la evolución de las mandíbulas faríngeas, luego del origen de los dientes en Gnathostomata. Primero, en la base del grupo corona de Osteichthyes se originan placas dentales con dientes en miniatura por toda la cavidad orofaríngea, incluyendo superficies de los arcos branquiales (Fig. 3 y Fig. 4). Luego, los dientes ubicados sobre los arcos branquiales posteriores aumentan de tamaño hasta uno comparable con los orales. Esto aparentemente ocurre de manera independiente en dos linajes, sobre las placas dentales más posteriores disponibles; sobre las del 5° arco branquial en Neopterygii; y sobre el 4° arco branquial en Cladistia (Fig. 3). Esto indica por lo menos dos etapas en los que cambios importantes en los mecanismos odontogénicos deben haber ocurrido, afectando tanto la distribución de los dientes, como su morfología, para dar lugar a las mandíbulas faríngeas. De esta manera, el análisis demuestra que el origen de la dentición faríngea no es ancestral en la filogenia, como se postula en el modelo “inside-out”. Se ve claramente que la dentición faríngea, en forma de placas dentales con dientes por la cavidad orofaríngea, es una innovación evolutiva mucho más reciente, originándose en el grupo corona de Osteichthyes.

El análisis de la literatura revela también otra transición morfológica importante; una pérdida secundaria de las placas dentales sobre los arcos branquiales que se daría de manera independiente en los Tetrapodos más derivados y en la base de Dipnomorpha

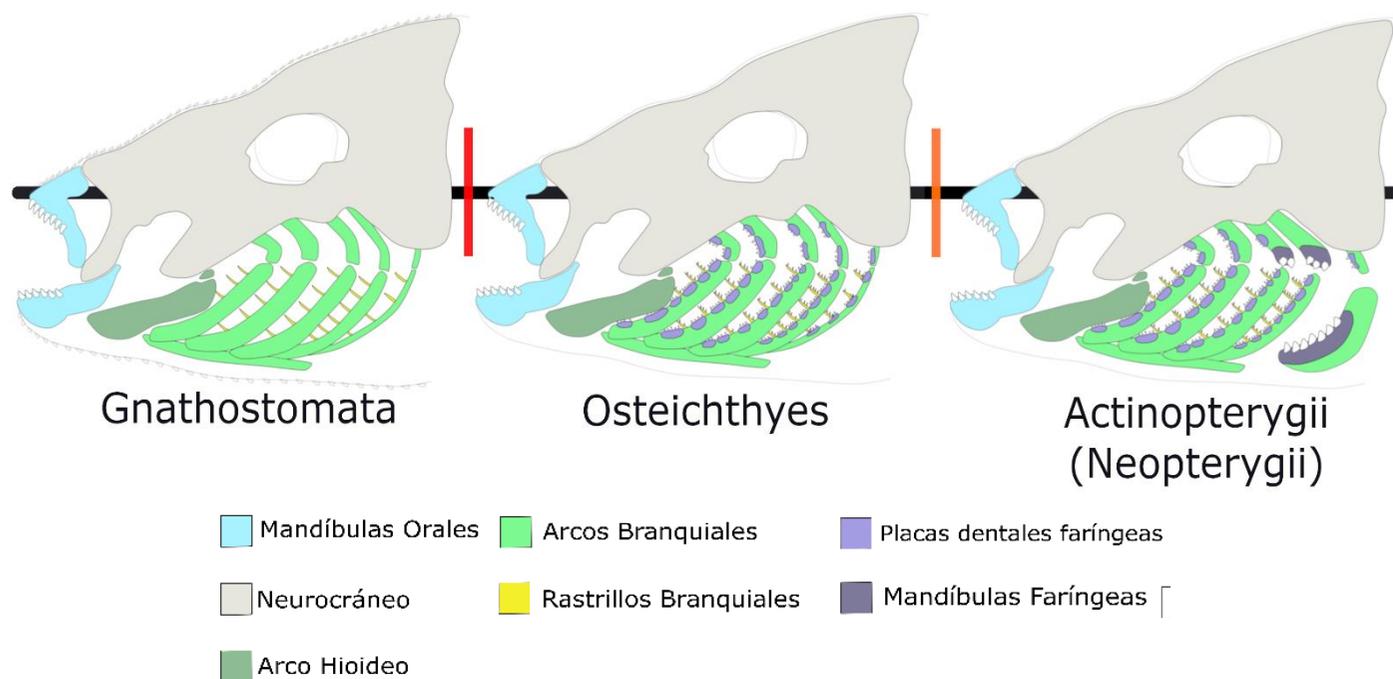


Figura 4: Historia evolutiva de las mandíbulas faríngeas. Representaciones esquemáticas de la dentición en distintos grupos arreglados en una secuencia de cambio morfológico, evidenciando los pasos claves para la evolución de las mandíbulas faríngeas. Se marca con naranja la aparición de las placas dentales con dientes en los arcos branquiales hacia Osteichthyes y con rojo la formación de mandíbulas faríngeas en ciertos Actinopterygii, por medio de un mayor tamaño de los dientes de los arcos branquiales posteriores y reordenamientos musculares. Por simplicidad de la representación se representan sólo las mandíbulas faríngeas de Neoteleostei y se omiten las de Cladistia.

Una vez construida una serie de eventos que ocurrieron a lo largo de la evolución de la dentición faríngea, es posible utilizarla como marco de referencia para analizar la distribución en la filogenia de la región del enhancer de *dlx2* y el gen *eve1*.

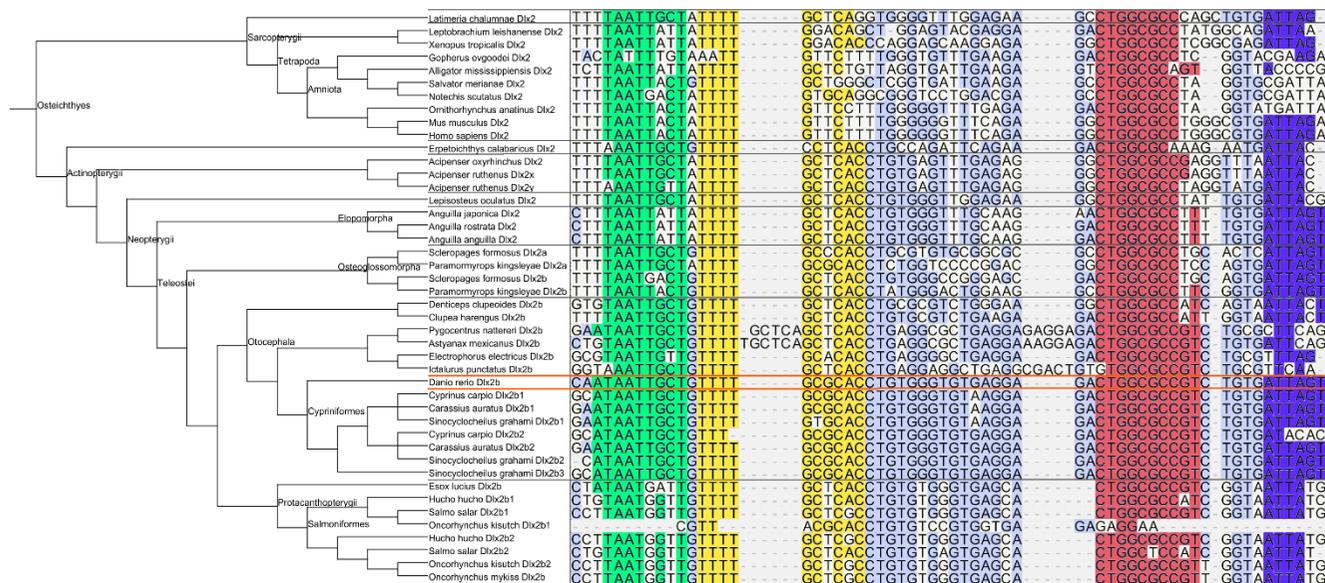
Región conservada del enhancer odontogénico de *dlx2*:

Se encontró la presencia de una secuencia reconocible como la región conservada del enhancer de *dlx2* en 44 especies, de las 72 con ortólogos para el gen. La secuencia solo fue encontrada en Osteichthyes, estando ausente en todos los otros vertebrados analizados. Algunos de los grupos analizados presentan múltiples copias del gen *dlx2* en su genoma; con dos variantes *a* y *b* en Teleostei; y cuatro variantes *a1*, *a2*, *b1* y *b2* en las familias Cyprinidae y Salmonidae, debido a eventos de duplicaciones genómicas en la base de estos grupos (Glasauer & Neuhauss, 2014). Una excepción resultan las especies de teleósteos del orden Elopomorpha, cuya información genómica disponible no permite distinguir dos parálogos de *dlx2*. Otra especie que presenta dos parálogos de *dlx2* corresponde a *Acipenser ruthenus*, debido a varios eventos de reorganización genómica desde su divergencia con los otros Acipenseriformes (Stöck y col., 2020).

Interesantemente, la región conservada solo fue encontrada en los parálogos *dlx2b* de Teleostei, con la excepción de los osteoglosomorfos analizados, *Scleropages formosus* y *Paramormyrops kingsleyae*, donde se reconoce la secuencia en *dlx2a* y *dlx2b*. Estos corresponden a algunos de los representantes más basales de los teleósteos (excluyendo

Elopomorpha), indicando una posible divergencia entre este segmento regulatorio entre *dlx2a* y *dlx2b* en grupos más derivados. De acuerdo con lo anterior, en Neoteleostei, que sufrieron una pérdida del parólogo *dlx2b* (Debiais-Thibaud y col., 2008), la región conservada no es reconocible. Todas las especies de tetrápodos analizadas presentan la secuencia, excepto las aves (*Taeniopygia guttata* y *Gallus gallus*), posiblemente siendo perdida en asociación a la pérdida de dientes ocurrida en las aves modernas, como se ha visto con otros elementos genéticos asociados a la odontogénesis en este grupo (Meredith y col., 2014).

En las especies con la región conservada, esta siempre se encuentra río arriba del gen *dlx2*. Sin embargo, su posición relativa es muy variable, abarcando desde menos de 300



pares de bases en *Paramormyrops kingsleyae* a sobre 10.000 en *Xenopus tropicalis*, con un promedio de alrededor de 2.000 pares de bases desde el inicio de la transcripción de *dlx2*.

Figura 5: La secuencia conservada del enhancer de *dlx2* se encuentra solo en Osteichthyes.

Filogenia de vertebrados y alineamiento de la región conservada del enhancer de *dlx2*. Se señalan en celeste los sitios que presentan identidad con la secuencia de *Danio rerio*. En colores se marcan los sitios de unión para factores de transcripción señalados por Jackson y Stock con identidad con la secuencia de *Danio rerio*, la cual se destaca con un recuadro. Verde: *Dlx*; Amarillo: *FoxA*; Rojo: *C/Ebp*; Azul: *Ap-1*. Figura editada desde un alineamiento y árbol generado por Mesquite (Maddison & Maddison, 2019)

Como es de esperarse, las secuencias analizadas de grupos más emparentados con *Danio rerio* presentan mayor conservación, particularmente en Neopterygii. Sin embargo, al analizar de manera más detallada las secuencias recopiladas es posible observar patrones en la secuencia de los sitios de unión de factores de transcripción descritos para esta región (Fig. 5; Jackson & Stock, 2006). En *Ictalurus punctatus*, del orden Siluriformes, el sitio de unión para *Ap-1* se encuentra ausente, probablemente en un evento independiente, debido a la posición anidada de esta especie dentro de Teleostei con sitios conservados. También presenta una inserción de 5 nucleótidos entre los sitios de unión para *FoxA* y *C/Ebp*. Las especies del orden Characiformes analizadas presentan una inserción de 5 o 6 nucleótidos en medio del sitio de unión para *FoxA*, posiblemente interrumpiendo su función. En casos de duplicaciones secundarias del gen *dlx2b*, los sitios de unión para factores de transcripción mantienen su secuencia, excepto en el caso del género

Oncorhynchus de Salmoniformes, donde en *dlx2b1*, el sitio se encuentra altamente degenerada o no es reconocible; y en *Cyprinus carpio*, donde el sitio de unión para *Ap-1* se ve degenerado. Estas variaciones en los sitios de unión de factores de transcripción no parecen tener una señal filogenética llamativa, ni una correlación con la morfología dental de las especies que la presentan. Esto sugiere que se trata de eventos independientes, sin relevancia para la aparición de la dentición faríngea.

La pérdida de *dlx2b* en Neoteleostei, y también de la secuencia analizada, indicaría que la función conjunta del gen y el enhancer se vio desacoplada de la morfología dental, ya que este grupo no presenta diferencias morfológicas considerables con el resto de los Neopterygii. En el Neoteleostei *Oryzias latipes* se observa expresión transiente de *dlx2a* en distintas fases del desarrollo de dientes orales y faríngeos (Debiais-Thibaud y col., 2008). Esto se encuentra en agudo contraste con la expresión de *dlx2a* en el Otocephala *Danio rerio*, que presenta expresión solo en el primer diente faríngeo. Mientras que *dlx2b* se expresa de manera consistente a lo largo de todo del desarrollo dental (Borday-Birraux y col., 2006). Es posible que en Neoteleostei *dlx2a* esté supliendo el rol del *dlx2b* perdido en ese linaje.

Al considerar que la secuencia analizada se encuentra conservada solo en Osteichthyes, se ve que su probable punto de origen coincide con el origen de los representantes actuales de este grupo. Esto sugiere que la aparición de la secuencia conservada del enhancer odontogénico de *dlx2* estaría involucrada en la aparición de los dientes faríngeos en los

osteíctios corona (Fig. 6). Esto apoyaría también la hipótesis de que la expresión odontogénica de *dlx2* en general se origina en los Osteichthyes, indicando que la ausencia de expresión de *dlx2* en dientes del tiburón *Scyliorhinus canicula* reportada previamente corresponde a la condición ancestral de Gnathostomata (Debiais-Thibaud y col., 2011).

Presencia del gen *eve1*:

En el caso de *eve1*, se recopilaron por medio de BLAST genes ortólogos putativos en todos los genomas de Osteichthyes no tetrápodos disponibles, y una selección de tetrápodos. El gen *eve1* está presente en la mayoría de las especies evaluadas, con algunas excepciones que involucran pérdidas evidentemente secundarias, como *Hippocampus comes*, anidado entre Neoteleostei que si presentan el gen.

Notablemente, por primera vez se encontró el gen *eve1* en un pez Sarcopterygii, el celacanto *Latimeria chalumnae*. Se encontró en el genoma LatCha1 (GCA_000225785.1) en la base de datos Ensembl con el código ENSLACG00000015759. El gen presenta mayor identidad y menor e-value en alineamiento con *eve1* que con *evx1* o *evx2* de pez cebra. En el análisis de sintenia se ve que este gen se encuentra rodeado por múltiples genes *hoxb* río arriba y *ube2z*, *igf2bp1* y *atp5mc* río abajo, de manera inversa al gen *eve1* de *Danio rerio*, como se esperaría luego de una inversión en el sentido de esta sección del genoma (Stock y col., 1996).

En un alineamiento proteico, la proteína hipotética de ENSLACG00000015759 no presenta cambios en el marco de lectura ni rearrreglos significativos. Incluso se ve considerablemente conservado un segmento de la proteína, el dominio homeobox, que compone el sitio de unión a DNA del factor transcripcional (Bürglin & Affolter, 2016). Por esto, la evidencia apunta a que *eve1* en celacanto codifica una proteína funcional.

Otro caso relevante fue la ausencia putativa del gen *eve1* en el pez pulmonado *Lepidosiren paradoxa*. Para esta especie fue necesario tomar información transcriptómica de la base de datos NCBI, donde se encontraron dos aciertos significativos en BLAST con *eve1* de *Danio rerio*, GEHZ01079332.1 y GEHZ01033113. Sin embargo, en alineamientos presentaban mayor identidad y menor e-value con los genes *evx1* y *evx2*, indicando que se tratan de homólogos para estos genes, y que *eve1* posiblemente se perdió en este linaje. Aunque es posible que *eve1* de *Lepidosiren* no haya sido representado en el transcriptoma reportado, ya sea por su falta de expresión en el tejido analizado, o simplemente falta de cobertura de la secuenciación. La identidad de las secuencias putativas como *evx1* y *evx2* fue confirmada además con alineamientos de secuencias proteicas con ortólogos de pez cebra. Es importante considerar que los peces pulmonados presentan una morfología dental muy derivada, por lo que, aunque el gen no estuviese presente en este clado, podría haberse perdido al involucrarse nuevos mecanismos odontogénicos, de manera independiente a la pérdida de *eve1* que ocurrió en tetrápodos.

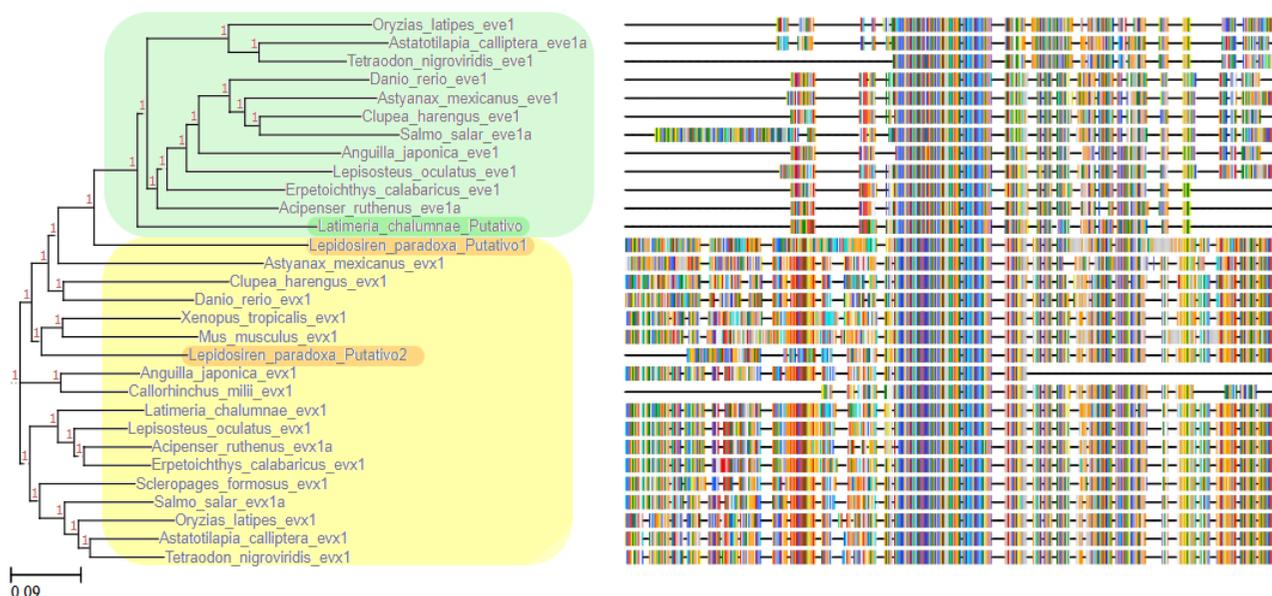


Figura 6: El gen *eve1* se encuentra presente en *Latimeria Chalumnae*. Árbol filogenético simplificado y alineamiento de ortólogos de vertebrados de *eve1* y *evx1*. En verde se marca una agrupación de genes *eve1*, incluyendo el gen candidato de *Latimeria chalumnae*. En amarillo se marca una agrupación de genes *evx1*, incluyendo las posiciones de ambos candidatos de *Lepidosiren paradoxa*. El gen putativo 1 de *Lepidosiren* pareciera agruparse con *eve1*, sin embargo, su identidad como *evx2* es clara en los análisis, incluyendo el alineamiento presentado. Ante la falta de otros genes *evx2* este candidato presenta una posición confusa. Un árbol extensivo, con todas las especies incluidas en el análisis se presenta en el Material Complementario (Fig. Complementaria 2). Figura editada desde un árbol y alineamiento generado por ETE 3 (Huerta-Cepas y col., 2016).

Finalmente, el alineamiento y árbol posterior obtenido con las proteínas *eve1* y *evx1* reportadas en vertebrados (Fig. 6; Fig. Complementaria 2) agrupa el gen candidato de *Latimeria* con *eve1*, mientras que los candidatos de *Lepidosiren* se agrupan con *evx1*.

Juntos, estos datos confirman la presencia del gen *eve1* en *Latimeria chalumnae* y, con los datos transcriptómicos disponibles, sugieren que no se encuentra presente en *Lepidosiren paradoxa*. Esto, a su vez indica que la pérdida del gen *eve1* puede ubicarse con mayor precisión en algún punto posterior a la divergencia de *Latimeria* y Rhipidistia (peces pulmonados y tetrápodos). Si se considera representativa la evidencia transcriptómica de *Lepidosiren paradoxa*, entonces la pérdida de *eve1* se puede acotar aún más, a un punto entre la divergencia de *Latimeria* y la de *Lepidosiren* en la rama de los Sarcopterygii, hace alrededor de 415 millones de años. (Fig. 7; Evans, 2009).

La distribución de *eve1* en vertebrados actuales se corresponde con animales que presentan placas dentales faríngeas. Ambos el gen y el carácter emergen hacia Osteichthyes y aparentemente se pierden hacia los tetrápodos actuales (Fig. 7). Esto sugiere que el gen *eve1*, con un patrón de expresión odontogénico no presente en los genes *evx*, pudo estar involucrado en la aparición de las placas dentales con dientes en Osteichthyes corona, y se mantiene como un factor clave en la morfología dental. Considerando esta asociación, la presencia de placas dentales orofaríngeas en tetrápodos troncales, como *Eusthenopteron*, sugeriría que también presentaban *eve1*, solo perdiéndose en el linaje llevando a los tetrápodos corona. Este escenario implicaría

también una pérdida independiente del gen en los peces pulmonados, si es que la información transcriptómica es confiable, lo cual coincide con su falta de placas dentales faríngeas.

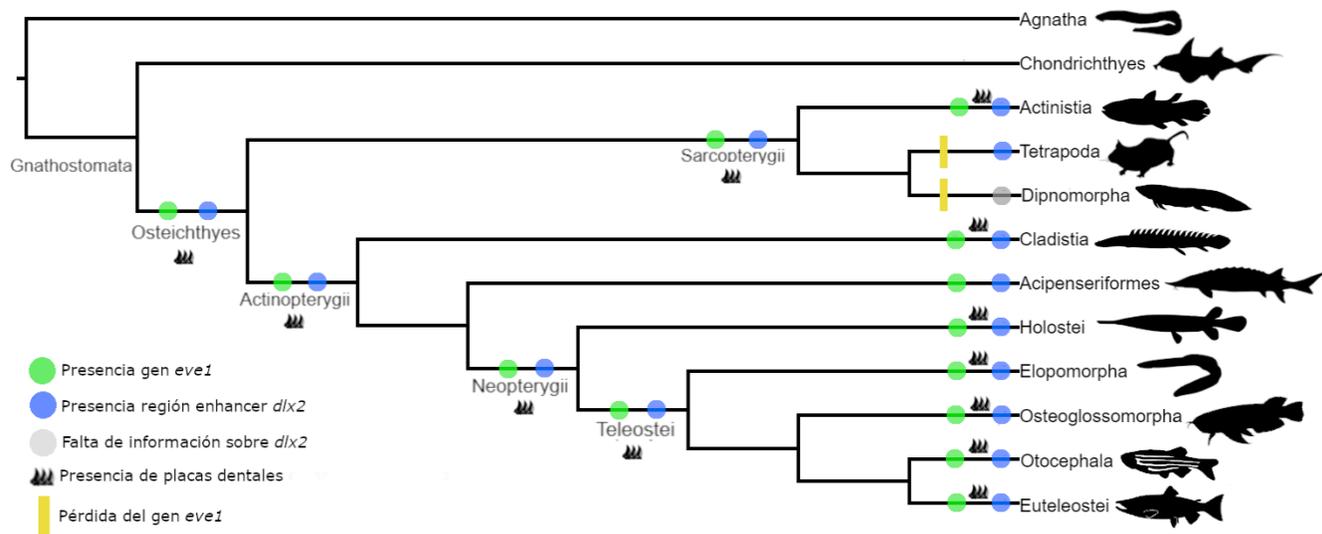


Figura 7: La aparición de la región del enhancer de *dlx2* y del gen *eve1* coincide con la aparición de las placas dentales faríngeas en Osteichthyes. Filogenia de vertebrados simplificada representando los principales caracteres morfológicos y genéticos evaluados que se encuentran presentes en los representantes actuales de cada grupo, y los caracteres probables de ancestros de grupos claves. Se señala la presencia de placas dentales sobre los arcos branquiales, la presencia del gen *eve1* en verde, y la presencia de la región conservada del enhancer de *dlx2* en azul. Se señala la presencia de la región del enhancer *dlx2* en Euteleostei debido a su presencia en Protacanthopterygii, que probablemente representa la condición ancestral. La presencia de la región enhancer *dlx2* en Dipnomorpha se marca con gris por falta de información genómica. Con

barras amarillas se señalan los posibles eventos de pérdida del gen *eve1* de manera independiente en Dipnomorpha y hacia tetrápodos corona, aunque existe la posibilidad que haya sido un evento en el nodo que conecta estos grupos. Se puede ver el origen de ambos caracteres genéticos analizados coinciden con la aparición de placas dentales faríngeas en Osteichthyes, estando ausentes en vertebrados basales. Filogenia adaptada desde Betancur-R y col., 2017. Las siluetas fueron obtenidas desde Phylopic.org. La silueta para Chondrichthyes corresponde a una imagen *Callorhincus milii* de Tony Ayling (vectorizada por Milton Tan).

DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

Al estudiar detalladamente la evolución de la dentición en los vertebrados, se volvió aparente que un paso clave para la aparición del sistema de mandíbulas faríngeas en Actinopterygii fue la aparición de placas dentales por la cavidad orofaríngea, y particularmente sobre los arcos branquiales que ocurrió en la base del grupo corona de Osteichthyes. Sobre esta información fue posible asociar la distribución en la filogenia de los caracteres moleculares analizados, los cuales coinciden con esta transición morfológica (Fig. 7).

Fue posible describir la distribución en la filogenia de vertebrados de una región particular de un enhancer odontogénico del gen *dlx2* y la presencia del gen *eve1*, y compararla con la evidencia morfológica recopilada. La distribución en la filogenia de la región conservada del enhancer de *dlx2* indica que esta se origina hacia Osteichthyes, coincidiendo con el punto de origen de las placas dentales en los arcos branquiales. Esto sugiere que esta región del enhancer se vio involucrada en la aparición de los dientes faríngeos. Una posibilidad es que esta modificación en el enhancer haya permitido que el dominio de expresión de *dlx2* se haya extendido hacia posterior. De esta manera induciendo la expresión de genes odontogénicos en las regiones faríngeas y gatillando la formación de placas dentales y dientes. Por otra parte, la aparición de esta región conservada en un enhancer odontogénico en Osteichthyes apoya también la idea que el gen *dlx2* tomó un rol en el desarrollo dental en linajes más derivados, explicando la

ausencia de expresión de *dlx2* en dientes de Chondrichthyes como una condición ancestral.

La presencia de *eve1* en *Latimeria chalumnae* entrega indicios de que *eve1* también puede haberse visto involucrado en la evolución de los dientes faríngeos, ya que su presencia se corresponde con especies que presentan esta característica, y ambos se originan el grupo corona de Osteichthyes. De manera similar a *dlx2*, la aparición de expresión odontogénica de *eve1* podría haber participado en la formación de placas dentales en regiones más posteriores, extendiendo la distribución de los dientes. El gen *eve1* encontrado en celacanto también sugiere que el gen se perdió en un punto más cercano al linaje de los tetrápodos modernos de lo que se pensaba previamente (Avaron y col., 2003), abriendo la posibilidad que haya estado en tetrapodomorfos tempranos, como *Eusthenopteron*, coincidiendo con la morfología de su dentición. Aunque también es posible que se haya perdido en la base de Rhipidistia (peces pulmonados y tetrápodos), y no tuviera un rol en la odontogénesis faríngea de tetrapodomorfos basales.

Estos datos en conjunto sugieren que en el origen del grupo corona de Osteichthyes surgieron elementos moleculares que permitieron la activación de los mecanismos odontogénicos, previamente sensibles a las condiciones solo de las mandíbulas orales, en regiones más posteriores de la cavidad orofaríngea, dando origen a dientes faríngeos. Posteriormente, en la base de los Neopterygii corona y en Cladistia, otros elementos, desconocidos hasta el momento, llevan al aumento de tamaño de los dientes faríngeos en

los arcos posteriores y rearrreglos musculares que llevan a la formación de las mandíbulas faríngeas.

Fue posible obtener ciertas asociaciones relevantes, sin embargo, el trabajo bioinformático presenta limitaciones metodológicas importantes. Por un lado, el alcance del estudio se encuentra limitado por las secuencias disponibles en bases de datos. A pesar de que existe un amplio abanico de genomas de vertebrados anotados en Ensembl, y que puede ser complementado con GenBank de NCBI, una parte importante de la diversidad morfológica de Osteichthyes se vio excluida de este trabajo. Será posible complementar este trabajo en el futuro cuando los esfuerzos de secuenciación y anotación de genomas hayan cubierto más especies. Otro factor limitante era la información sobre enhancers odontogénicos. Existe una extensa lista de genes descritos que influyen el desarrollo dental (Fraser y col., 2009; Hulsey y col., 2016; Singh y col., 2021). Sin embargo, la mayoría de estos genes son muy ancestrales, altamente conservados y se encuentran involucrados en muchos procesos del desarrollo, por lo que es necesario analizar los elementos regulatorios que dirigen su expresión. Aunque muchas de estas secuencias se encuentran descritas por medio de estudios de asociación a escala genómica, relativamente pocas han sido comprobadas experimentalmente, o se ha descrito su patrón de expresión debido a distintas dificultades metodológicas (Visel y col., 2009; Pennacchio y col., 2013).

Un alcance clave desde este trabajo sería evaluar la expresión de los genes analizados en los dientes pequeños en las placas dentales orofaríngeas de Osteichthyes. Estas estructuras se encuentran severamente poco estudiadas, sin análisis específicos de su expresión génica hasta la fecha, posiblemente debido a su tamaño y su desarrollo tardío relativo a los otros dientes (Atukorala & Franz-Odenaal, 2014). Por esto, a lo largo de este seminario se ha asumido que presentan patrones de expresión equivalentes al patrón común de dientes orales y faríngeos, sin embargo, esto necesita ser confirmado de manera empírica.

Otro elemento importante a destacar es que las secuencias recopiladas y analizadas para *dlx2* corresponden a regiones particulares de enhancers odontogénicos putativos, ya que solo se ha comprobado su función por medio de ensayos con reporteros en *Danio rerio*, *Astyanax mexicanus*, y *Mus musculus* (Thomas y col., 2000; Jackman & Stock, 2006). Por esto, sería de gran valor evaluar la función de las secuencias analizadas en un modelo *in vivo*. Esto permitiría, por un lado, comprobar si la secuencia enhancer de otras especies actuales es funcional en organismos modelo (como *Astyanax mexicanus*), siendo de particular interés las de los grupos Cladistia, Acipenseriformes, o de Tetrapoda. También permitiría comprobar si las secuencias conservadas analizadas en efecto son capaces de dirigir por sí solas la expresión de *dlx2* en dientes, o si su delección altera el funcionamiento del enhancer completo. Otro experimento de gran valor para reforzar los alcances de este trabajo sería evaluar si la región río arriba asociada a *dlx2* en condricios es incapaz de

dirigir la expresión odontogénica de *dlx2* en teleósteos, para reforzar la influencia de la aparición del enhancer en la función del gen en el desarrollo dental. Todo esto es particularmente importante, ya que es muy difícil predecir la funcionalidad de secuencias enhancer en base a su identidad de secuencia. Un cambio de unos pocos nucleótidos, o solo uno, en secuencias enhancers puede traer consigo un cambio morfológico en algunos casos (Maas & Fallon, 2005; Prud'homme y col., 2006), mientras que otros enhancers pueden conservar su función a pesar de ser muy divergentes (Fisher, 2006; Weirauch & Hughes, 2010). Por esto, es difícil extraer conclusiones sólidas sobre la relación entre la variación en secuencias encontradas y su efecto en la morfología sin estudios de expresión.

En el caso del gen *eve1* las proyecciones son menos; pero sería importante evaluar la función del gen encontrado en *Latimeria chalumnae* en peces modelo transgénicos, para estudiar su rol odontogénico in vivo. Sería muy valioso analizar el patrón de expresión de *eve1* en el desarrollo del celacanto para evaluar si presenta expresión odontogénica como en Teleostei. Lamentablemente, material de estos animales es prácticamente inaccesible. Sin embargo, la identificación de secuencias regulatorias que dirijan la expresión de *eve1* en dientes en especies modelo permitiría la búsqueda de secuencias homólogas en el genoma de *Latimeria*. Estas secuencias luego podrían ser introducidas en organismos modelo para luego evaluar si generan el mismo patrón de expresión de *eve1*.

Sería de gran valor trabajar en describir nuevas secuencias regulatorias odontogénicas, particularmente para los genes con roles conocidos en el desarrollo dental (Fraser y col., 2009; Hulsey y col., 2016; Singh y col., 2021). Esto permitiría adaptar la metodología de este seminario para estudiar su distribución en la filogenia, compararla con la morfología presente en la diversidad de Osteichthyes y finalmente analizar las consecuencias morfológicas de las distintas variantes en animales modelo. Para esto, sería recomendable utilizar modelos como *Astyanax mexicanus* u *Oryzias latipes*, ya que presentan dentición oral y faríngea, a diferencia del ciprínido *Danio rerio* que se suele utilizar, que solo tiene dentición faríngea.

CONCLUSIONES

Se encontraron resultados concordantes con la hipótesis propuesta. Los caracteres moleculares revisados se encuentran relacionados con un evento importante en la evolución de la dentición faríngea, que fue revelado por el análisis morfológico: la aparición de placas dentales en los arcos branquiales. La aparición de estas placas dentales con dientes en los arcos branquiales de Osteichthyes corona resulta ser un evento clave para la evolución de las mandíbulas faríngeas presentes en Actinopterygii actuales. Además, este análisis permite esclarecer cualquier duda remanente sobre el origen de la dentición faríngea, siendo estructuras claramente más recientes de lo que se sostenía en el contexto del modelo de origen dental “inside-out”.

Ambos elementos genéticos analizados, la región conservada del enhancer de *dlx2* y el gen *eve1*, presentan una distribución en especies actuales que coincide con la aparición de placas dentales faríngeas con dientes en Osteichthyes. Esto sugiere que el origen de estos dientes faríngeos fue permitido por la aparición de mecanismos genéticos que extendieron los dominios de expresión de los mecanismos odontogénicos previamente restringidos a la mandíbula oral.

La información obtenida para *dlx2* apoya también un origen de la actividad odontogénica de este gen en Osteichthyes, en vez de un origen ancestral en Gnathostomata. Mientras que la presencia previamente no descrita de *eve1* en *Latimeria* sugiere una pérdida de este

gen en un punto más cercano al origen de los tetrápodos modernos de lo que se pensaba, abriéndose la posibilidad de que estuviera presente en tetrapodomorfos basales.

Sería de mucho valor expandir este trabajo con experimentos *in vivo* para evaluar los patrones de expresión en los poco estudiados dientes de las placas dentales orofaríngeas.

Además de analizar de manera directa el efecto de las secuencias analizadas en este trabajo sobre la morfología dental en animales modelo. A través de estos experimentos sería posible fortalecer las conclusiones obtenidas, y extender la estrategia de investigación a otros pares de caracteres genético-morfológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahlberg, P. E. (1991). A re-examination of sarcopterygian interrelationships, with special reference to the Porolepiformes., 103(3), 241–287. doi:10.1111/j.1096-3642.1991.tb00905.x
- Ahlberg, P. E., Smith, M. M., & Johanson, Z. (2006). Developmental plasticity and disparity in early dipnoan (lungfish) dentitions. *Evolution Development*, 8(4), 331–349. doi:10.1111/j.1525-142x.2006.00106.x
- Aigler, S. R., Jandzik, D., Hatta, K., Uesugi, K., & Stock, D. W. (2014). Selection and constraint underlie irreversibility of tooth loss in cypriniform fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(21), 7707–7712. doi:10.1073/pnas.1321171111
- Allis E. P. (1922). The Cranial Anatomy of Polypterus, with Special Reference to Polypterus bichir. *Journal of anatomy*, 56(Pt 3-4), 189–294.43.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., ... Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W597–W603. doi:10.1093/nar/gks400
- Atukorala, A. D. S., & Franz-Odenaal, T. A. (2014). Spatial and temporal events in tooth development of *Astyanax mexicanus*. *Mechanisms of Development*, 134, 42–54. doi:10.1016/j.mod.2014.09.002
- Avaron, F., Thaëron-Antono, C., Beck, C. W., Borday-Birraux, V., Géraudie, J., Casane, D., & Laurenti, P. (2003). Comparison of even-skipped related gene expression pattern in vertebrates shows an association between expression domain loss and modification of selective constraints on sequences. *Evolution & development*, 5(2), 145–156. doi:10.1046/j.1525-142x.2003.03021.x
- Bartsch, P. (1994). Development of the cranium of *Neoceratodus forsteri*, with a discussion of the suspensorium and the opercular apparatus in Dipnoi. *Zoomorphology*, 114(1), 1–31. doi:10.1007/bf00574911

Belting, H. G., Shashikant, C. S., & Ruddle, F. H. (1998). Modification of expression and cis-regulation of *Hoxc8* in the evolution of diverged axial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2355–2360. doi:10.1073/pnas.95.5.2355

Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D37–D42. doi:10.1093/nar/gkw1070

Berio, F., & Debiais-Thibaud, M. (2019). Evolutionary developmental genetics of teeth and odontodes in jawed vertebrates: a perspective from the study of elasmobranchs. *Journal of Fish Biology*. doi:10.1111/jfb.14225

Berkovitz, B & Shellis, R.P. (2016). Osteichthyes. In *The Teeth of Non-mammalian Vertebrates*. Academic Press.

Betancur-R, R., Wiley, E., O., Arratia, G., Acero, A., Bailly, N., Miya, M., Lecointre, G. & Ortí, G. (2017). Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 162. doi:10.1186/s12862-017-0958-3

Borday-Birraux, V., Van der Heyden, C., Debiais-Thibaud, M., Verreijdt, L., Stock, D. W., Huysseune, A., & Sire, J. Y. (2006). Expression of *Dlx* genes during the development of the zebrafish pharyngeal dentition: evolutionary implications. *Evolution & development*, 8(2), 130–141. doi:10.1111/j.1525-142X.2006.00084.x

Böttcher, R. (2014). Phylloodont tooth plates of *Bobasatrania scutata* (Gervais, 1852) (Actinopterygii, Bobasatraniiiformes) from the Middle Triassic (Longobardian) Grenzbonebed of southern Germany and eastern France, with an overview of Triassic and Palaeozoic phylloodont tooth plates. *Neues Jahrbuch für Mineralogie - Abhandlungen* 274(2-3), 291– 311. doi: 10.1127/njgpa/2014/0454

Bürglin, T. R., & Affolter, M. (2016). Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma*, 125(3), 497–521. doi:10.1007/s00412-015-0543-8

Burruss, E. D. (2014). Cichlid fishes as models of ecological diversification: patterns, mechanisms, and consequences. *Hydrobiologia*, 748(1), 7–27. doi:10.1007/s10750-014-1960-z

- Butler P. M. (1995). Ontogenetic aspects of dental evolution. *The International journal of developmental biology*, 39(1), 25–34.
- Camp, A. L., Konow, N., & Sanford, C. P. (2009). Functional morphology and biomechanics of the tongue-bite apparatus in salmonid and osteoglossomorph fishes. *Journal of anatomy*, 214(5), 717–728. doi:10.1111/j.1469-7580.2009.01056.x
- Carroll S. B. (2008). Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell*, 134(1), 25–36. doi:10.1016/j.cell.2008.06.030
- Carvalho, M., Bockmann, F. A., & de Carvalho, M. R. (2013). Homology of the Fifth Epibranchial and Accessory Elements of the Ceratobranchials among Gnathostomes: Insights from the Development of Ostariophysans. *PLoS ONE*, 8(4), e62389. doi:10.1371/journal.pone.0062389
- Chardon, M., Vandewalle, P. & Parmentier. E. (2000). The branchial basket in teleost feeding. *Cybium* 2000, 24(4): 319-342
- Chen, D., Blom, H., Sanchez, S., Tafforeu, P., Märss, T. & Ahlberg, PE. (2017). Development of cyclic shedding teeth from semi-shedding teeth: the inner dental arcade of the stem osteichthyan *Lophosteus*. *Royal Society Open Science* 4(5), 161084.
- Chen, D., Blom, H., Sanchez, S., Tafforeau, P., Märss, T., & Ahlberg, P. E. (2020). The developmental relationship between teeth and dermal odontodes in the most primitive bony fish *Lophosteus*. *eLife*, 9, e60985. doi:10.7554/eLife.60985
- Claeson, K. M., Bemis, W. E., & Hagadorn, J. W. (2007). New interpretations of the skull of a primitive bony fish *Erpetoichthys calabaricus* (Actinopterygii: Cladistia). *Journal of Morphology*, 268(11), 1021–1039. doi:10.1002/jmor.10567
- Cretekos, C. J., Wang, Y., Green, E. D., Martin, J. F., Rasweiler, J. J., 4th, & Behringer, R. R. (2008). Regulatory divergence modifies limb length between mammals. *Genes & development*, 22(2), 141–151. doi:10.1101/gad.1620408
- Davit-Béal, T., Tucker, A. S., & Sire, J.-Y. (2009). Loss of teeth and enamel in tetrapods: fossil record, genetic data and morphological adaptations. *Journal of Anatomy*, 214(4), 477–501. doi:10.1111/j.1469-7580.2009.01060.x

Dai, J., Si, J., Ouyang, N., Zhang, J., Wu, D., Wang, X., & Shen, G. (2017). Dental and periodontal phenotypes of *Dlx2* overexpression in mice. *Molecular Medicine Reports*, 15, 2443-2450. doi: 10.3892/mmr.2017.6315

Debiais-Thibaud, M., Borday-Birraux, V., Germon, I., Bourrat, F., Metcalfe, C. J., Casane, D., & Laurenti, P. (2007). Development of oral and pharyngeal teeth in the medaka (*Oryzias latipes*): comparison of morphology and expression of *eve1* gene. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 308(6), 693–708. doi:10.1002/jez.b.21183

Debiais-Thibaud, M., Germon, I., Laurenti, P., Casane, D., & Borday-Birraux, V. (2008). Low divergence in *Dlx* gene expression between dentitions of the medaka (*Oryzias latipes*) versus high level of expression shuffling in osteichthyans. *Evolution & Development*, 10(4), 464–476. doi:10.1111/j.1525-142x.2008.00257.x

Debiais-Thibaud, M., Oulion, S., Bourrat, F., Laurenti, P., Casane, D., & Borday-Birraux, V. (2011). The homology of odontodes in gnathostomes: insights from *Dlx* gene expression in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *BMC evolutionary biology*, 11, 307. doi:10.1186/1471-2148-11-307

Debiais-Thibaud, M., Metcalfe, C. J., Pollack, J., Germon, I., Ekker, M., Depew, M., Laurenti, P., Borday-Birraux, V. y Casane, D. (2013). Heterogeneous Conservation of *Dlx* Paralog Co-Expression in Jawed Vertebrates. *PLoS ONE*, 8(6), e68182. doi:10.1371/journal.pone.0068182

Depew, M. J., Lufkin, T., & Rubenstein, J. L. (2002). Specification of jaw subdivisions by *Dlx* genes. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5592), 381–385. doi:10.1126/science.1075703

Donoghue, P. C. J., & Rücklin, M. (2014). The ins and outs of the evolutionary origin of teeth. *Evolution & Development*, 18(1), 19–30. doi:10.1111/ede.12099

Downs, J. P., Daeschler, E. B., Jenkins, F. A., Shubin, N. H. (2011). A new species of *Laccognathus* (Sarcopterygii, Porolepiformes) from the Late Devonian of Ellesmere Island, Nunavut, Canada. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 31(5), 981–996. doi:10.1080/02724634.2011.599462

Evans, S. E., (2009). Evolution and Phylogeny of Vertebrates. *Encyclopedia of Neuroscience*, 1194–1197. doi:10.1007/978-3-540-29678-2_3114

Fisher, S. (2006). Conservation of RET Regulatory Function from Human to Zebrafish Without Sequence Similarity. *Science*, 312(5771), 276–279. doi:10.1126/science.1124070

Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L., & Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, 151(4), 1531–1545.

Fornes, O., Castro-Mondragon, J. A., Khan, A., van der Lee, R., Zhang, X., Richmond, P. A., Modi, B. P., Correard, S., Gheorghe, M., Baranašić, D., Santana-Garcia, W., Tan, G., Chèneby, J., Ballester, B., Parcy, F., Sandelin, A., Lenhard, B., Wasserman, W. W., & Mathelier, A. (2020). JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research*, 48(D1), D87–D92. doi:10.1093/nar/gkz1001

Fraser, G. J., Hulsey, C. D., Bloomquist, R. F., Uyesugi, K., Manley, N. R., & Streelman, J. T. (2009). An Ancient Gene Network Is Co-opted for Teeth on Old and New Jaws. *PLoS Biology*, 7(2), e1000031. doi:10.1371/journal.pbio.1000031

Fraser, G. J., Cerny, R., Soukup, V., Bronner-Fraser, M., & Streelman, J. T. (2010). The odontode explosion: The origin of tooth-like structures in vertebrates. *BioEssays*, 32(9), 808–817. doi:10.1002/bies.200900151

Gardiner, B.G. (1984). The relationships of the palaeoniscid fishes, a review based on new specimens of *Mimia* and *Moythomasia* from the Upper Devonian of Western Australia. *Bulletin of the British Museum (Natural History)* 37, 173– 428.

Giles, S., Darras, L., Clément, G., Blicek, A. & Friedman, M. (2015). An exceptionally preserved Late Devonian actinopterygian provides a new model for primitive cranial anatomy in ray-finned fishes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282(1816), 20151485. doi: 10.1098/rspb.2015.1485

Giles, S., Xu, G.H., Near, T.J. & Friedman, M. (2017). Early members of ‘living fossil’ lineage imply later origin of modern ray-finned fishes. *Nature* 549, 265– 268. doi: 10.1038/nature23654

Glasauer, S. M., & Neuhauss, S. C. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular genetics and genomics: MGG*, 289(6), 1045–1060. doi:10.1007/s00438-014-0889-2

Grande, L., & Bemis, W. E. (1991). Osteology and Phylogenetic Relationships of Fossil and Recent Paddlefishes (Polyodontidae) with Comments on the Interrelationships of Acipenseriformes. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 11(sup001), 1–121. doi:10.1080/02724634.1991.10011424

Grande, L. & Bemis, W.E. (1998). A Comprehensive Phylogenetic Study of Amiid Fishes (Amiidae) Based on Comparative Skeletal Anatomy. An Empirical Search for Interconnected Patterns of Natural History. *Journal of Vertebrate Paleontology* 18(S1), 1– 696.

Gromova, E. S., & Makhotin, V. V. (2016). Functional morphology of the visceral apparatus of Atlantic salmon *Salmo salar* (Salmonidae). *Journal of Ichthyology*, 56(4), 505–521. doi:10.1134/s0032945216040044

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98

Haridy, Y.; Gee, B. M.; Witzmann, F.; Bevitt, J. J.; Reisz, R. R. (2019). Retention of fish-like odontode overgrowth in Permian tetrapod dentition supports outside-in theory of tooth origins. *Biology Letters*, 15(9), 20190514–. doi:10.1098/rsbl.2019.0514

Hilton, E.J. & Forey, P.L. (2009). Redescription of †*Chondrosteus acipenseroides* Egerton, 1858 (Acipenseriformes, †Chondrosteidae) from the lower Lias of Lyme Regis (Dorset, England), with comments on the early evolution of sturgeons and paddlefishes. *Journal of Systematics Paleontology* 7(4), 427– 453. doi: 10.1017/S1477201909002740

Huerta-Cepas, J., Serra, F. Bork, P. (2016) ETE 3: Reconstruction, Analysis, and Visualization of Phylogenomic Data, *Molecular Biology and Evolution* (33), 1635–1638. doi:10.1093/molbev/msw046

Hughes, G. M. (1998). The gills of the coelacanth, *Latimeria chalumnae* Latimeriidae. What can they teach us? *Italian Journal of Zoology*, 65(sup1), 425–429. doi:10.1080/11250009809386859

Hulsey, C. D., Fraser, G. J., & Meyer, A. (2016). Biting into the Genome to Phenome Map: Developmental Genetic Modularity of Cichlid Fish Dentitions. *Integrative and Comparative Biology*, 56(3), 373–388. doi:10.1093/icb/icw059

Hulsey, C. D., Cohen, K. E., Johanson, Z., Karagic, N., Meyer, A., Miller, C. T., Sadier, A., Summers, A. P., & Fraser, G. J. (2020). Grand Challenges in Comparative Tooth Biology. *Integrative and comparative biology*, 60(3), 563–580. doi:10.1093/icb/icaa038

Huysseune, A., Sire, J.-Y., & Witten, P. E. (2009). Evolutionary and developmental origins of the vertebrate dentition. *Journal of Anatomy*, 214(4), 465–476. doi:10.1111/j.1469-7580.2009.01053.x

Jackman, W. R., Draper, B. W., & Stock, D. W. (2004). Fgf signaling is required for zebrafish tooth development. *Developmental Biology*, 274(1), 139–157. doi:10.1016/j.ydbio.2004.07.003

Jackman, W. R., & Stock, D. W. (2006). Transgenic analysis of *Dlx* regulation in fish tooth development reveals evolutionary retention of enhancer function despite organ loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51), 19390–19395. doi:10.1073/pnas.0609575103

Jandzik, D. y Stock, D. W., 2020. Differences in developmental potential predict the contrasting patterns of dental diversification in characiform and cypriniform fishes. *bioRxiv* 2020.07.26.221986; doi:10.1101/2020.07.26.221986

Jarvik, E. (1980). *Basic structure and evolution of vertebrates*. London, UK: Academic Press.

Joly, J. S., Joly, C., Schulte-Merker, S., Boulekbache, H., & Condamine, H. (1993). The ventral and posterior expression of the zebrafish homeobox gene *eve1* is perturbed in dorsalized and mutant embryos. *Development (Cambridge, England)*, 119(4), 1261–1275.

Kawasaki, K., Buchanan, A. V., & Weiss, K. M. (2007). Gene Duplication and the Evolution of Vertebrate Skeletal Mineralization. *Cells Tissues Organs*, 186(1), 7–24. doi:10.1159/000102678

Kemp, A. (1979). The histology of tooth formation in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* Krefft. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 66(3), 251–287. doi:10.1111/j.1096-3642.1979.tb01910.x

Kent, WJ. (2002). BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Research*, (4):656-664. doi: 10.1101/gr.229202.

Koussoulakou, D. S.; Margaritis, L. H.; Koussoulakos, S. L. (2009). A Curriculum Vitae of Teeth: Evolution, Generation, Regeneration. *International Journal of Biological Sciences*, (), 226–243. doi:10.7150/ijbs.5.226

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (Oxford, England), 23(21), 2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404

Lauder, G. V. y Wainwright. P. C. 1992. Function and History: The Pharyngeal Jaw Apparatus in Primitive Ray-finned Fishes. En Mayden. R. L. *Systematics, Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes*. p 455-471. Stanford University Press, Palo Alto, CA.

Laurenti, P., Thaëron, C., Allizard, F., Huysseune, A., & Sire, J.-Y. (2004). Cellular expression of *eve1* suggests its requirement for the differentiation of the ameloblasts and for the initiation and morphogenesis of the first tooth in the zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Dynamics*, 230(4), 727–733. doi:10.1002/dvdy.20080

Latimer, A.E. & Giles, S. (2018). A giant dapediid from the Late Triassic of Switzerland and insights into neopterygian phylogeny. *Royal Society Open Science* 5(8), 180497. doi: 10.1098/rsos.180497

Louchart, A., & Viriot, L. (2011). From snout to beak: the loss of teeth in birds. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(12), 663–673. doi:10.1016/j.tree.2011.09.004

Maas, S. A., & Fallon, J. F. (2005). Single base pair change in the long-range Sonic hedgehog limb-specific enhancer is a genetic basis for preaxial polydactyly. *Developmental Dynamics*, 232(2), 345–348. doi:10.1002/dvdy.20254

MacDonald, R. B., Debiais-Thibaud, M., Martin, K., Poitras, L., Tay, B.-H., Venkatesh, B., & Ekker, M. (2010). Functional conservation of a forebrain enhancer from the elephant shark (*Callorhynchus milii*) in zebrafish and mice. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 157. doi:10.1186/1471-2148-10-157

Maddison, W. P. & Maddison, D.R. (2019) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.61. www.mesquiteproject.org

- Maisey, J. G., Turner, S., Naylor, G. J. P., & Miller, R. F. (2013). Dental patterning in the earliest sharks: Implications for tooth evolution. *Journal of Morphology*, n/a–n/a. doi:10.1002/jmor.20242
- Mehta, R. S., & Wainwright, P. C. (2008). Functional morphology of the pharyngeal jaw apparatus in moray eels. *Journal of Morphology*, 269(5), 604–619. doi:10.1002/jmor.10612
- Meredith, R. W., Zhang, G., Gilbert, M. T., Jarvis, E. D., & Springer, M. S. (2014). Evidence for a single loss of mineralized teeth in the common avian ancestor. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6215), 1254390. doi:10.1126/science.1254390
- National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov
- Nelson, G. J. (1967). Gill Arches of Teleostean Fishes of the Family Clupeidae. *Copeia*, 1967(2), 389. doi:10.2307/1442129
- Nelson, G. J. (1968a). Gill arches of teleostean fishes of the division Osteoglossomorpha. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*, 47(312), 261–277. doi:10.1111/j.1096-3642.1968.tb00511.x
- Nelson, G. J. (1968b). Gill-arch structure in Acanthodes. In *Current Problems in Lower Vertebrate Phylogeny. Proceeding of the Fourth Nobel Symposium* (ed T. Ørvig), pp 129– 143. Stockholm: Almqvist and Wiksell; London and New York, Interscience.
- Nelson, G. J. (1969) Gill arches and the phylogeny of fishes: with notes on the classification of vertebrates. *Bulletin of the AMNH*; v. 141, p. 477-552.
- Nelson, G. J. (1970) Pharyngeal denticles (placoid scales) of sharks, with notes on the dermal skeleton of vertebrates. *American Museum novitates*; no. 2415, p. 24-26.
- Nelson, G. J. (2009). Epibranchial organs in lower teleostean fishes*. *Journal of Zoology*, 153(1), 71–89. doi:10.1111/j.1469-7998.1967.tb05031.x
- Pennacchio, L. A., Bickmore, W., Dean, A., Nobrega, M. A., & Bejerano, G. (2013). Enhancers: five essential questions. *Nature reviews. Genetics*, 14(4), 288–295. doi:10.1038/nrg3458

Prud'homme, B., Gompel, N., Rokas, A., Kassner, V. A., Williams, T. M., Yeh, S. D., True, J. R., & Carroll, S. B. (2006). Repeated morphological evolution through cis-regulatory changes in a pleiotropic gene. *Nature*, 440(7087), 1050–1053. doi:10.1038/nature04597

Prud'homme, B., Gompel, N., & Carroll, S. B. (2007). Emerging principles of regulatory evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 Suppl 1(Suppl 1), 8605–8612. doi:10.1073/pnas.0700488104

Reif, W. E. (1982). Evolution of Dermal Skeleton and Dentition in Vertebrates. En Hecht, Max K.; Wallace, Bruce; Prance, Ghillean T. *Evolutionary Biology*. pp 287-368. Springer, Boston, MA. doi:10.1007/978-1-4615-6968-8_7

Rücklin, M., Donoghue, P.C.J., Johanson, Z., Trinajstić, K., Marone, F. & Stampanoni, M. (2012). Development of teeth and jaws in the earliest jawed vertebrates. *Nature* 491(7426), 748– 51. doi:10.1038/nature11555

Sanford, C.P. & Lauder, G.V. (1990). Kinematics of the Tongue-Bite Apparatus in Osteoglossomorph Fishes. *Journal of Experimental Biology* 154, 137– 162.

Schmid, L., & Sánchez-Villagra, M. R. (2010). Potential genetic bases of morphological evolution in the triassic fish *Saurichthys*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314B (7), 519–526. doi:10.1002/jez.b.21372

Shapiro, M. D., Marks, M. E., Peichel, C. L., Blackman, B. K., Nereng, K. S., Jónsson, B. Schluter, D. & Kingsley, D. M. (2004). Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature*, 428(6984), 717–723. doi:10.1038/nature02415

Singh, P., Ahi, E.P. & Sturmbauer, C. (2021). Gene coexpression networks reveal molecular interactions underlying cichlid jaw modularity. *BMC Ecol Evo* 21, 62 doi:10.1186/s12862-021-01787-9

Sire, J.-Y., Marin, S., & Allizard, F. (1998). Comparison of teeth and dermal denticles (odontodes) in the teleost *Denticeps clupeoides* (Clupeomorpha). *Journal of Morphology*, 237(3), 237–255. doi:10.1002/(sici)1097-4687(199809)237:3<237::aid-jmor3>3.0.co;2-w

Sire, J. & Girondot, M. (2010) UniDPlot: A software to detect weak similarities between two DNA sequences. *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis*, 2(5), 69-74. doi:10.5897/JBSA.9000028

Smith, M. M. (1977). The Microstructure of the Dentition and Dermal Ornament of Three Dipnoans from the Devonian of Western Australia: A Contribution Towards Dipnoan Interrelations, and Morphogenesis, Growth and Adaptation of the Skeletal Tissues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(979), 29–72. doi:10.1098/rstb.1977.0122

Smith, M. M. (1979). Scanning electron microscopy of odontodes in the scales of a coelacanth embryo, *Latimeria chalumnae* smith. *Archives of Oral Biology*, 24(2), 179–183. doi:10.1016/0003-9969(79)90067-0

Smith M.M. y Coates M.I. (2001) Evolution of the vertebrate dentition: phylogenetic patterns and developmental models. En Ahlberg, P.E. 2001. Major Events in Early Vertebrate Evolution. pp 203-240. CRC Press, Boca Raton, FL.

Smith, M. M. (2003). Vertebrate dentitions at the origin of jaws: when and how pattern evolved. *Evolution and Development*, 5(4), 394–413. doi:10.1046/j.1525-142x.2003.03047.x

Smith, M.M., Johanson, Z., Butts, T., Ericsson, R., Modrell, M., Tulenko, F.J., Davis, M.C., Fraser, G.J. (2015). Making teeth to order: conserved genes reveal an ancient molecular pattern in paddlefish (Actinopterygii). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282(1805), 20142700. doi:10.1098/rspb.2014.2700

Soukup, V., Epperlein, H.-H., Horáček, I., & Cerny, R. (2008). Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature*, 455(7214), 795–798. doi:10.1038/nature07304

Square, T., Jandzik, D., Romášek, M., Cerny, R., & Medeiros, D. M. (2017). The origin and diversification of the developmental mechanisms that pattern the vertebrate head skeleton. *Developmental Biology*, 427(2), 219–229. doi:10.1016/j.ydbio.2016.11.014

Stock, D. W., Ellies, D. L., Zhao, Z., Ekker, M., Ruddle, F. H., & Weiss, K. M. (1996). The evolution of the vertebrate *Dlx* gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 10858–10863. doi:10.1073/pnas.93.20.10858

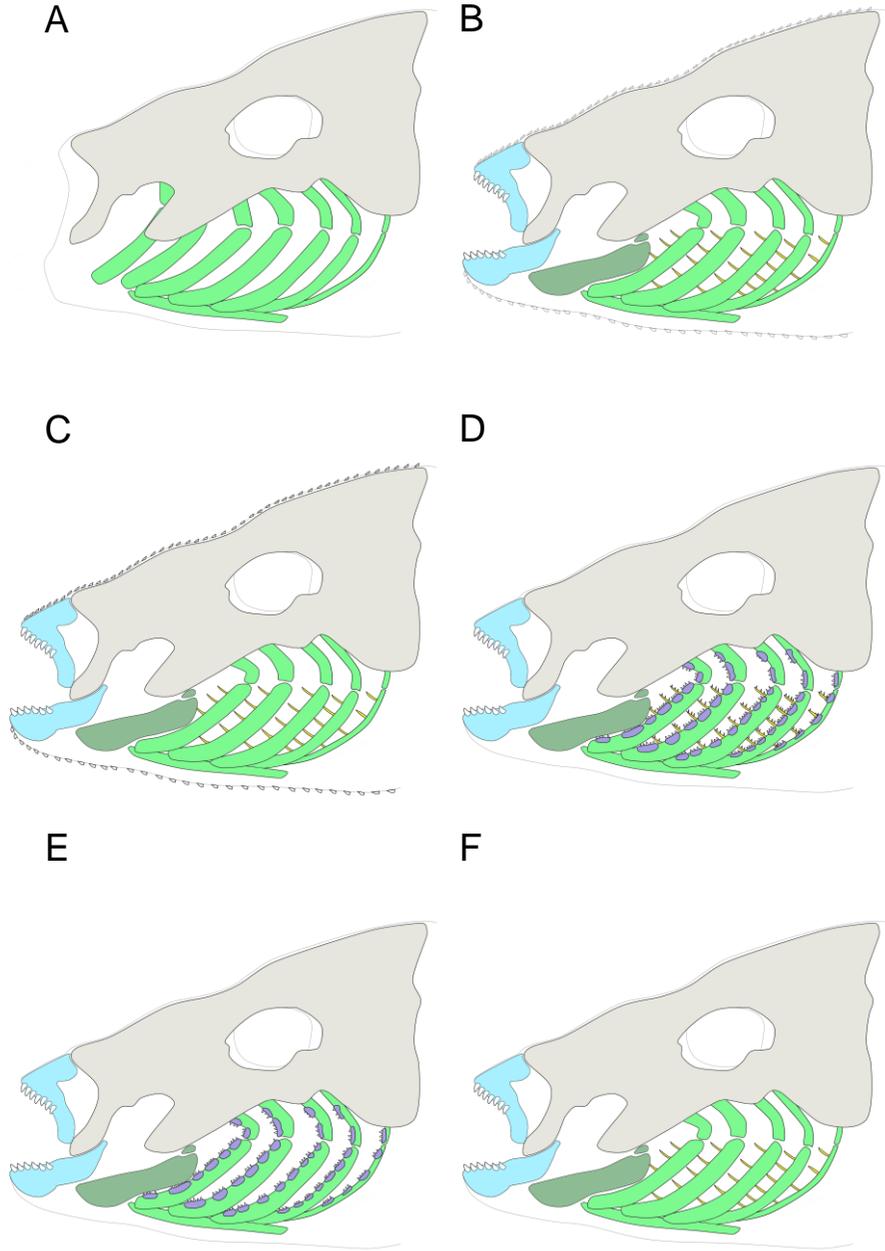
- Stock, D. W. (2001). The genetic basis of modularity in the development and evolution of the vertebrate dentition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1414), 1633–1653. doi:10.1098/rstb.2001.0917
- Stock, D. W. (2006). Developmental genetic mechanisms of evolutionary tooth loss in cypriniform fishes. *Development*, 133(16), 3127–3137. doi:10.1242/dev.02459
- Du, K., Stöck, M., Kneitz, S., Klopp, C., Woltering, J. M., Adolphi, M. C., Feron, R., Prokopov, D., Makunin, A., Kichigin, I., Schmidt, C., Fischer, P., Kuhl, H., Wuertz, S., Gessner, J., Kloas, W., Cabau, C., Iampietro, C., Parrinello, H., Tomlinson, C., ... Scharl, M. (2020). The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization. *Nature ecology & evolution*, 4(6), 841–852. doi:10.1038/s41559-020-1166-x
- Streelman, J. T., Webb, J. F., Albertson, R. C., & Kocher, T. D. (2003). The cusp of evolution and development: a model of cichlid tooth shape diversity. *Evolution & development*, 5(6), 600–608. doi:10.1046/j.1525-142x.2003.03065.x
- Tapaltsyan, V., Charles, C., Hu, J., Mindell, D., Ahituv, N., Wilson, G. M., Black, B. L., Viriot, L., & Klein, O. D. (2016). Identification of novel Fgf enhancers and their role in dental evolution. *Evolution & development*, 18(1), 31–40. doi:10.1111/ede.12132
- Thesleff, I., Vaahtokari, A., & Partanen, A. M. (1995). Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *The International journal of developmental biology*, 39(1), 35–50.
- Thies, D. (1989). *Lepidotes gloriae*, sp. nov. (Actinopterygii: Semionotiformes) from the Late Jurassic of Cuba. *Journal of Vertebrate Paleontology* 9(1), 18– 40. doi: 10.1080/02724634.1989.10011736
- Thomas, B. L., & Sharpe, P. T. (1998). Patterning of the murine dentition by homeobox genes. *European Journal of Oral Sciences*, 106(S1), 48–54. doi:10.1111/j.1600-0722.1998.tb02153.x
- Thomas, B. L., Liu, J. K., Rubenstein, J. L., & Sharpe, P. T. (2000). Independent regulation of Dlx2 expression in the epithelium and mesenchyme of the first branchial arch. *Development (Cambridge, England)*, 127(2), 217–224.

- Vandewalle, P., Huysseune, A., Aerts, P., & Verraes, W. (1994). The Pharyngeal Apparatus in Teleost Feeding. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, 59–92. doi:10.1007/978-3-642-57906-6_4
- Vaškaninová, V., Chen, D., Tafforeau, P., Johanson, Z., Ekrt, B., Blom, H. & Ahlberg, P.E. (2020). Marginal dentition and multiple dermal jawbones as the ancestral condition of jawed vertebrates. *Science* 369(6500), 211– 216. doi: 10.1126/science.aaz9431
- Visel, A., Rubin, E. M., & Pennacchio, L. A. (2009). Genomic views of distant-acting enhancers. *Nature*, 461(7261), 199–205. doi:10.1038/nature08451
- Wagner, G.P. (2014). *Homology, Genes, and Evolutionary Innovation*. Princeton University Press.
- Wainwright, P. C., Smith, W. L., Price, S. A., Tang, K. L., Sparks, J. S., Ferry, L. A., Kuhn, K. L., Eytan, R. I. y Near, T. J. (2012). The Evolution of Pharyngognath: A Phylogenetic and Functional Appraisal of the Pharyngeal Jaw Key Innovation in Labroid Fishes and Beyond. *Systematic Biology*, 61(6), 1001–1027. doi:10.1093/sysbio/sys060
- Warth, P., Hilton, E.J., Naumann, B., Olsson, L. & Konstantinidis, P. (2017). Development of the skull and pectoral girdle in Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, and Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseriformes: Acipenseridae). *Journal of Morphology* 278(3), 418– 442. doi: 10.1002/jmor.20653
- Weirauch, M. T., & Hughes, T. R. (2010). Conserved expression without conserved regulatory sequence: the more things change, the more they stay the same. *Trends in Genetics*, 26(2), 66–74. doi:10.1016/j.tig.2009.12.002
- Witten, P. E.; Sire, J.-Y.; Huysseune, A. (2014). Old, new and new-old concepts about the evolution of teeth. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(4), 636–642. doi:10.1111/jai.12532
- Yates, A. D., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Marugán, J. C., Cummins, C., Davidson, C., Dodiya, K., Fatima, R., Gall, A., Giron, C. G., ... Flicek, P. (2020). Ensembl 2020. *Nucleic acids research*, 48(D1), D682–D688. doi:10.1093/nar/gkz966

Zhao, Z., Stock, D., Buchanan, A., & Weiss, K. (2000). Expression of Dlx genes during the development of the murine dentition. *Development genes and evolution*, 210(5), 270–275. doi:10.1007/s004270050314

Zhu, M., & Yu, X. (2009). Stem sarcopterygians have primitive polybasal fin articulation. *Biology Letters*, 5(3), 372–375. doi:10.1098/rsbl.2008.0784

MATERIAL COMPLEMENTARIO



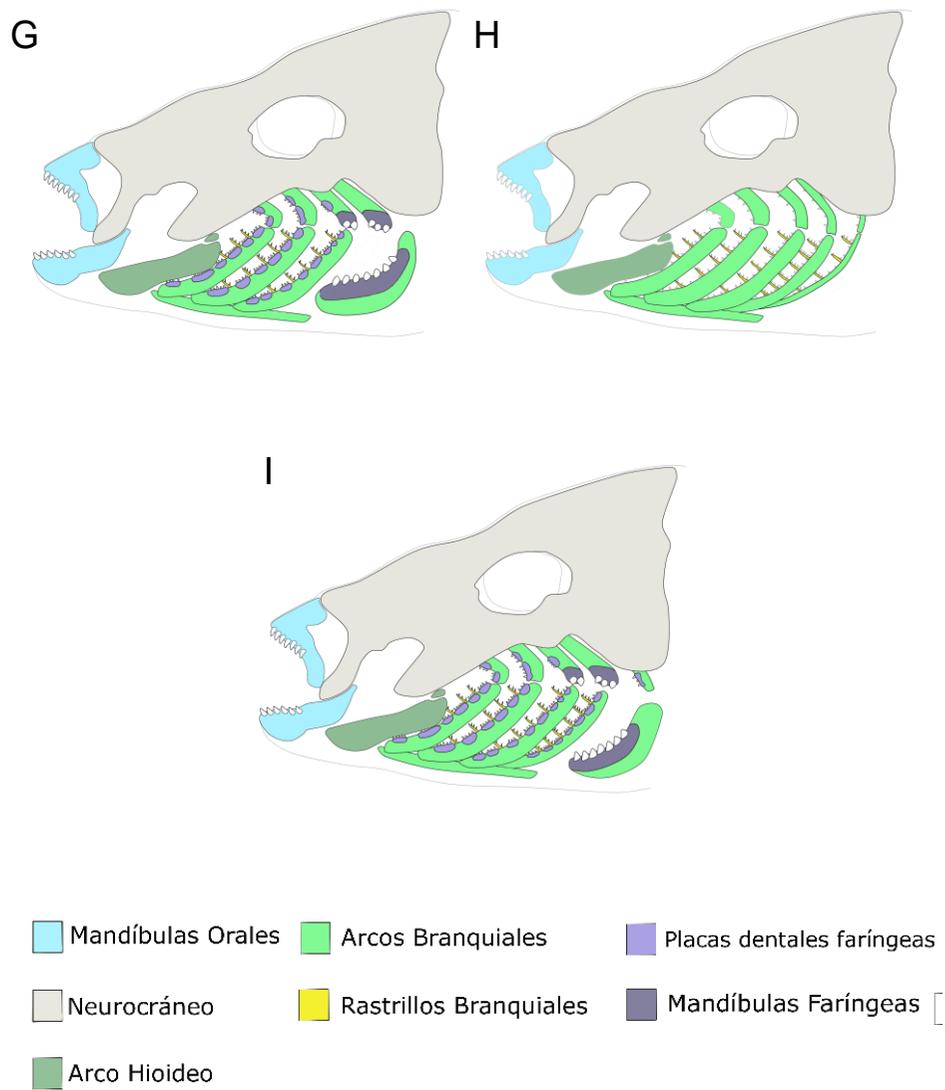


Figura Complementaria 1: Morfología por grupo. Esquemas representativos de la conformación de la dentición ancestral para cada grupo evaluado. Solo se representan los caracteres de mandíbulas y dientes orales, arco hioideo, arcos branquiales, placas dentales faríngeas sobre los arcos branquiales, rastrillos branquiales, y mandíbulas faríngeas con sus dientes respectivos. El esquema general se basa en la morfología de un cíclido, por lo que la

estructura del neurocráneo puede no ser representativa para todos los grupos. (A) Agnatha; (B) Gnathostomata; (C) Chondrichthyes; (D) Osteichthyes, Sarcopterygii, y Actinopterygii; (E) Actinistia y Tetrapoda; (F) Dipnomorpha; (G) Cladistia; (H) Acipenseriformes; (I) Holostei, Teleostei, Elopomorpha, Osteoglossomorpha, Otocephala y Neoteleostei.

Figura Complementaria 2: Ortólogos de *eve1* y *evx1*. Árbol filogenético de ortólogos de *eve1* y *evx1*, y el alineamiento del cual fue generado. Se destacan con un tono más oscuro los genes candidatos. En verde se marca una agrupación de genes *eve1*, incluyendo el gen candidato de *Latimeria chalumnae*, anidado completamente en el grupo. En amarillo se marcan agrupaciones de genes *evx*, incluyendo las posiciones de ambos candidatos de *Lepidosiren paradoxa*. El candidato 1 se encuentra en el borde del grupo *evx1* mayor, y el candidato 2 en el grupo menor, junto con algunos de los *evx1* de animales más basales.