



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas

**Análisis evolutivo de las proteínas y genes de la familia
*Furry***

Tesis presentada para optar al título
Licenciada en Ciencias Biológicas en la Universidad de Buenos Aires

Carolina Roa

Directora: Dra. María Cecilia Cirio
Codirector: Dr. Flavio Silva Junqueira de Souza
Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y
Neurociencias (IFIBYNE, UBA-CONICET)

Agosto 2024.

Resumen

Los genes de la familia *Furry* (*Fry*) codifican para proteínas muy conservadas evolutivamente y distribuidas en diversos grupos eucariotas, incluyendo levaduras, plantas, nematodos y vertebrados. Estas proteínas actúan como módulos de andamiaje para la formación de grandes complejos proteicos, regulando la unión y la actividad de otras proteínas, y cumplen funciones importantes en el desarrollo, incluyendo la división celular y la morfogénesis. Mientras que en invertebrados sólo se ha descripto un gen *Furry*, en algunas especies de vertebrados se han encontrado dos genes parálogos, denominados *Fry* y *Fry-like*, aunque su distribución filogenética y origen no han sido investigados.

En este trabajo, buscamos estudiar *Fry* y *Fry-like* de vertebrados desde una perspectiva evolutiva, con los objetivos de i) comprender el origen evolutivo de estos genes y ii) verificar si hubo divergencia en la expresión de estos parálogos en el desarrollo de vertebrados. Nuestra hipótesis era que los genes podrían haber surgido en los dos eventos de tetraploidización (denominados 1R y 2R) que ocurrieron durante el origen de los vertebrados y que, luego de la duplicación, las funciones de los genes podrían haber sido repartidas en un proceso de subfuncionalización.

A partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas *Furry* de cordados, hemicordados y equinodermos de bases de datos genómicas, se confeccionó un árbol filogenético estimado con el método de máxima verosimilitud. Además, se analizó la sintenia (orden de los genes) alrededor de cada parálogo y se rastrearon en cromosomas ancestrales reconstruidos utilizando coordenadas genómicas de vertebrados actuales. De este análisis, concluimos que todos los grupos de vertebrados poseen dos genes parálogos - *Fry* y *Fry-like* - que tuvieron su origen a partir de la primera duplicación genómica (1R) y que las copias resultantes de la segunda duplicación genómica (2R) se perdieron tempranamente. Empleando hibridación *in situ* para la detección de ARNm, se analizó la expresión de *fry* y *fry-like*, y sus respectivos homeólogos (L y S), en embriones y oocitos de la rana *Xenopus laevis*. Los análisis abarcaron diferentes eventos de desarrollo, incluyendo estadios de clivaje temprano, gastrulación, neurulación y organogénesis. La evidencia indica que los parálogos tienen patrones de expresión común en órganos y tejidos como los ojos, la región cefálica, el corazón, las vesículas óticas, la vesícula biliar y las somitas. Por otro lado, algunos tejidos muestran expresión predominante de uno de los parálogos. Así, sólo *fry* se expresa en el pronefros y notocorda, mientras que *fry-like* se expresa en el tubo neural de los embriones. Los resultados sugieren que, en algún momento luego de la duplicación genómica que originó los genes *Fry* y *Fry-like*, hubo una partición de las funciones del gen ancestral entre los genes duplicados posiblemente por cambios en sus secuencias regulatorias causando una divergencia en el patrón de expresión entre estos genes parálogos.

Evolutionary analysis of the proteins and genes of the *Furry* family

Abstract

The genes of the *Furry* (*Fry*) family encode highly conserved proteins that are evolutionarily distributed across various eukaryotic groups, including yeasts, plants, nematodes, and vertebrates. These proteins function as scaffolding modules for the formation of large protein complexes, regulating the binding and activity of other proteins, and play important roles in development, including cell division and morphogenesis. While only one *Furry* gene has been described in invertebrates, two paralogous genes, named *Fry* and *Fry-like*, have been found in some vertebrate species, although their phylogenetic distribution and origin have not been investigated.

In this work, we aim to study *Fry* and *Fry-like* in vertebrates from an evolutionary perspective, with the objectives of i) understanding the evolutionary origin of these genes and ii) verifying whether there has been divergence in the expression of these paralogs during vertebrate development. Our hypothesis was that the genes might have arisen during the two tetraploidization events (known as 1R and 2R) that occurred during the origin of vertebrates and that, following duplication, the functions of the genes might have been partitioned in a process of subfunctionalization.

Using the amino acid sequences of *Furry* proteins from chordates, hemichordates, and echinoderms from genomic databases, we constructed a phylogenetic tree estimated by the maximum likelihood method. Additionally, we analyzed the synteny (gene order) around each paralog and traced them in reconstructed ancestral chromosomes using genomic coordinates of present-day vertebrates. From this analysis, we concluded that all vertebrate groups possess two paralogous genes - *Fry* and *Fry-like* - which originated from the first genomic duplication (1R) and that the copies resulting from the second genomic duplication (2R) were lost early on. Employing *in situ* hybridization to detect mRNAs, we analyzed the expression of *fry* and *fry-like*, and their respective homeologs (L and S), in embryos and oocytes of the frog *Xenopus laevis*. The analyses covered different developmental events, including early cleavage stages, gastrulation, neurulation, and organogenesis. The evidence indicates that the paralogs have common expression patterns in organs and tissues such as the eyes, head region, heart, otic vesicles, gall bladder, and somites. On the other hand, some tissues show predominant expression of one of the paralogs. Thus, only *fry* is expressed in the pronephros and notochord, while *fry-like* is expressed in the neural tube of the embryos. The results suggest that, at some point after the genomic duplication that gave rise to *Fry* and *Fry-like* genes, there was a partitioning of the functions of the ancestral gene between the duplicated genes, possibly due to changes in their regulatory sequences causing a divergence in the expression pattern between these paralogous.

Agradecimientos

En primer lugar quiero remarcar la importancia de la Universidad Pública, Gratuita y de Calidad. Agradeceder a la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por las becas que me fueron otorgadas, sin las cuales no sé si hubiese podido terminar la carrera, o por lo menos no en tan corto tiempo.

A los jurados por aceptar y tomarse el tiempo de leer mi tesis.

A mi directora Ceci, por aceptarme en el labo desde la primera vez que nos vimos, siempre haciéndome sentir bienvenida y enseñarme todo con mucha paciencia. Gracias por acompañarme en la última etapa de la carrera y por tomarte el tiempo, tanto en el trabajo de mesada como en cada una de las correcciones y proceso de escritura de la tesis. Por ser la mejor directora y persona que pude haber encontrado, no tengo dudas.

A Flavio por explicarme las veces que sean necesarias cosas que no me quedaban claras. Por contagiarme las ganas de aprender sobre la historia evolutiva de los vertebrados.

Gracias a Iván por pasar gran parte del tiempo conmigo en la mesada. Por turnarnos en los lavados durante las *in situ* y también por enseñarme hasta las cosas más básicas. Me llevo un buen recuerdo de nuestras tardes en el labo, aunque a veces no nos salían del todo bien los experimentos, las risas no faltaron.

A mis amiguis Carem, Agus, Mica, Vicky y Rafa, por sufrir con gracia esta carrera hermosa y larga que elegimos. No creo que hubiese podido sobrevivir todos estos años sin que ustedes escuchen mis infinitas quejas y penas. Los quiero mucho, a mi manera.

A todos mis compañeros de trabajo en la Biblioteca. Gracias por la buena onda, por interesarse en mi proceso de tesis y hacerme más llevadera mi última etapa de la carrera.

A Luqui por acompañarme incondicionalmente, estar siempre y ayudarme en todo lo que necesito. Gracias por entender mi poco tiempo para hacer otra cosa que no sea estudiar y aún así quedarte a mi lado. Por escuchar mis presentaciones, mis males y alegrarte por cada pequeño logro, te amo.

A Osvaldo y Eli, por hacerme sentir parte de la familia y alentarme siempre.

A Homero, mi fiel compañero durante todo este proceso.

Por último y más importante, a mi familia, mis hermanas y especialmente mi madre. Gracias por confiar en mí y apoyarme en todo. Por prender las velitas cuando rendía y no preguntarme cómo me fue porque “*Siempre me va bien*”. Sin eso y un millón de cosas más no hubiese podido ni imaginar empezar una carrera universitaria.

Índice

| | |
|--|----|
| Resumen | 1 |
| Abstract | 2 |
| Agradecimientos | 3 |
| Índice | 4 |
| Índice de Tablas y Figuras | 5 |
| 1. Introducción | 6 |
| 1.1. Importancia de los genes de la familia <i>Furry</i> | 6 |
| 1.2. Hipótesis del 2R y surgimiento de genes parálogos | 8 |
| 1.3. Diploidización de genomas duplicados | 10 |
| 1.4. <i>X. laevis</i> como modelo para el estudio de la expresión de <i>fry</i> y <i>fry-like</i> | 11 |
| 2. Hipótesis y Objetivos | 14 |
| 3. Materiales y Métodos | 15 |
| 3.1. Declaración de ética | 15 |
| 3.2. Obtención de embriones de <i>X. laevis</i> | 15 |
| 3.3. Obtención de oocitos de <i>X. laevis</i> | 15 |
| 3.4. Síntesis de las sondas de ARN para hibridación <i>in situ</i> (HIS) | 16 |
| 3.5. Hibridación <i>in situ</i> (HIS) | 17 |
| 3.6. Histología | 18 |
| 3.7. Soluciones para HIS | 19 |
| 3.8. Búsqueda de las secuencias de las proteínas Fry y Fry-like | 20 |
| 3.9. Estimación de la filogenia de proteínas Fry y Fry-like | 22 |
| 3.10. Sintenia de genes Fry y Fry-like | 23 |
| 4. Resultados | 24 |
| 4.1. Análisis evolutivo de las proteínas Furry en vertebrados | 24 |
| 4.2. Sintenia de los genes Fry y Fry-like en vertebrados | 29 |
| 4.3. Estudio de la expresión de <i>fry</i> y <i>fry-like</i> en <i>X. laevis</i> | 33 |
| 4.4. Origen de la poliploidía en <i>X. laevis</i> y detección de los homeólogos <i>fry-like.S</i> y <i>fry-like.L</i> | 39 |
| 5. Discusión | 41 |
| 5.1. Origen de los parálogos Fry y Fry-like en vertebrados | 41 |
| 5.2. Expresión de Fry y Fry-like durante el desarrollo embrionario de vertebrados | 45 |
| 6. Conclusiones Finales | 50 |
| Bibliografía | 51 |

Índice de Tablas y Figuras

Tablas

| | |
|----------------|----|
| ❖ Tabla 1..... | 16 |
| ❖ Tabla 2..... | 17 |
| ❖ Tabla 3..... | 22 |
| ❖ Tabla 4..... | 25 |
| ❖ Tabla 5..... | 32 |

Figuras

| | |
|------------------|----|
| ❖ Figura 1..... | 6 |
| ❖ Figura 2..... | 10 |
| ❖ Figura 3..... | 12 |
| ❖ Figura 4..... | 13 |
| ❖ Figura 5..... | 28 |
| ❖ Figura 6..... | 30 |
| ❖ Figura 7..... | 31 |
| ❖ Figura 8..... | 35 |
| ❖ Figura 9..... | 36 |
| ❖ Figura 10..... | 38 |
| ❖ Figura 11..... | 40 |
| ❖ Figura 12..... | 43 |
| ❖ Figura 13..... | 44 |
| ❖ Figura 14..... | 47 |

Nota al lector

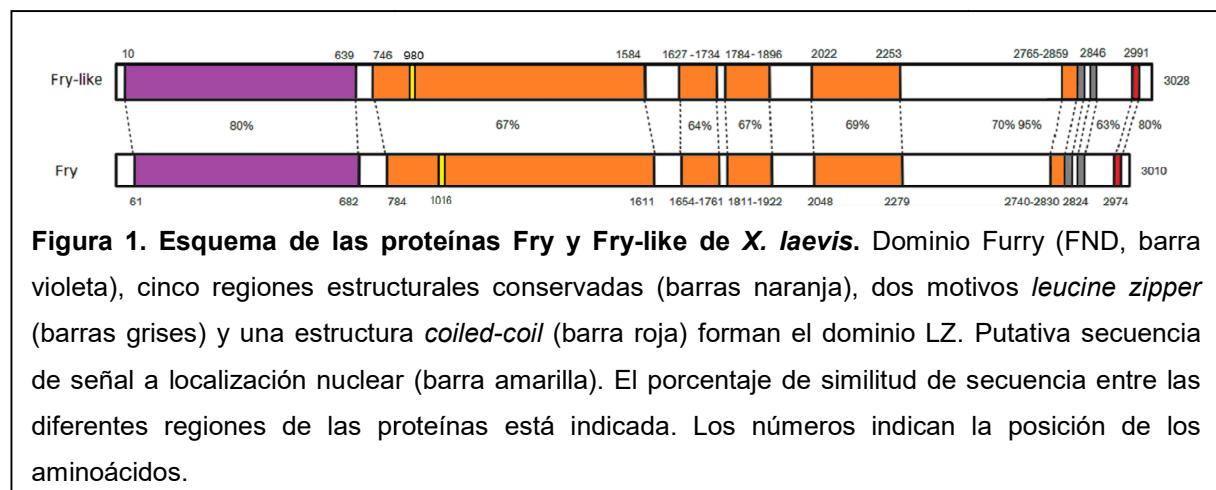
Se utilizó como convención la nomenclatura de ratón al referirse a los genes, ARNm y proteínas de vertebrados en general. Por ejemplo: genes: *Fry*; ARNm: *Fry* y Proteína: *Fry*.

Se utilizó la nomenclatura propia de cada especie al referirse a ella en particular. Por ejemplo *Xenopus laevis*: genes: *fry*; ARNm: *fry* y Proteína: *Fry*.

1. Introducción

1.1. Importancia de los genes de la familia *Furry*

El gen *FRY microtubule binding protein (Fry)* codifica para una proteína evolutivamente muy conservada llamada Furry (Fry). Se describió originalmente en *D. melanogaster* (Cong et al., 2001) y existen ortólogos en diversas especies eucariotas, incluyendo levaduras, plantas, nematodos y vertebrados. El genoma de vertebrados posee también el gen parálogo *FRY like transcriptional coactivator (Fry-like)*. Ambos genes codifican para proteínas de gran tamaño con más de 3000 aminoácidos. Las proteínas Fry-like y Fry comparten un 60% de identidad en la secuencia a nivel de los aminoácidos y tienen estructuras similares en humanos (74% con sustituciones conservativas) (Nagai & Mizuno, 2014). Estructuralmente, el dominio de mayor conservación, denominado dominio Furry (FND), se ubica en la región N-terminal y posee repeticiones del tipo HEAT/Armadillo. Estas estructuras súperhelicoidales sirven como plataformas versátiles para la formación de grande complejos multiprotéicos y están presentes en una amplia variedad de proteínas eucariotas (Tewari et al., 2010; Yoshimura & Hirano, 2016). En el centro de estas proteínas se encuentran 5-6 regiones conservadas sin dominios funcionales reconocibles que permitan predecir sus funciones y en el extremo C-terminal dos motivos cierre de leucinas (*leucine zipper*) y una estructura *coiled-coil* formando el dominio LZ solo presente en vertebrados (**Figura 1**) (Nagai & Mizuno, 2014).



Fry fue descripto inicialmente en *D. melanogaster* como un gen esencial. Moscas mosaico para la mutación en *fry* presentaban un fenotipo de múltiples pelos y pelos ramificados (de allí el nombre de *furry* = peludo) en las células epiteliales del ala de la mosca (Cong et al., 2001). A partir de este descubrimiento, distintos trabajos en invertebrados y levaduras reportaron la importancia de *fry* y sus ortólogos en procesos celulares esenciales

como polaridad, división y morfogénesis celular. En estos organismos, muchas de las funciones de Fry están asociadas a su función como scaffold participando en la interacción y activación de la quinasa de serina/treonina 38 o *nuclear Dbf2-related 1*, *Stk38/Ndr1* (Cong et al., 2001; Du & Novick, 2002; Fang & Adler, 2002; He et al., 2005, p. 200; Hirata et al., 2002; Horne-Badovinac et al., 2012; Kanai et al., 2005; Nelson et al., 2003). Resulta interesante que en *D. melanogaster* y en *C. elegans*, los ortólogos de Fry (*fry* y *Sax-2*, respectivamente) participan en el desarrollo y morfogénesis de dendritas sensoriales y neuronas (Emoto et al., 2004; Gallegos & Bargmann, 2004; Han et al., 2012; Norkett et al., 2020; Zallen et al., 2000), sin embargo los mecanismos moleculares no han sido develados y la función de Fry en el sistema nervioso de vertebrados no ha sido investigada.

En vertebrados, las proteínas Fry y Fry-like comenzaron siendo estudiadas en células en cultivo. En células HeLa, FRY junto a NDR1, desempeñan un papel crucial en la integridad estructural de los centrosomas mitóticos y el alineamiento de los cromosomas mitóticos (Chiba et al., 2009). Así mismo, Fry promueve la acetilación de los microtúbulos del huso mitótico interaccionando directamente con estos y promoviendo la actividad de quinasas y deacetilasas con función en la organización del huso mitótico bipolar (Ikeda et al., 2012; Nagai et al., 2013). Evidencias de Fry en interacción con microtúbulos en células en cultivo y en *D. melanogaster* revelarían funciones evolutivamente conservadas en mitosis y morfogénesis (Chiba et al., 2009; Fang et al., 2010; He et al., 2005; Ikeda et al., 2012; Nagai et al., 2013). El gen FRY-LIKE (también llamado AF4p12), en particular su extremo C-terminal, fue identificado fusionado al gen *mixed lineage leukemia* (MLL) en células humanas de leucemia linfoblástica aguda (Hayette et al., 2005; Sait et al., 2007). Este hallazgo junto a la evidencia de que FRY-LIKE es parte del complejo activo formado por el dominio intracelular de NOTCH1 (Yatim et al., 2012), sugieren que FRY-LIKE podría actuar como activador transcripcional.

Recientemente, estudios en organismos modelo de vertebrados han contribuido a develar funciones de Fry en el desarrollo normal y patológico. Fry se ha identificado como un gen asociado a la carcinogénesis mamaria y al desarrollo y morfogénesis de la glándula durante la preñez (Liu et al., 2019; Ren et al., 2013). En el desarrollo embrionario temprano de la rana *X. laevis*, Fry contribuye a la formación del eje axial y el desarrollo antero-dorsal induciendo la expresión de genes del cordamesodermo por medio de la represión transcripcional de microARNs (Goto et al., 2010). Nuestra investigación muestra que en *X. laevis* Fry regula la formación del organizador dorsal de la gástrula y la migración y morfología celular durante los movimientos gastrulatorios contribuyendo al establecimiento del plan corporal. Además, presentamos evidencias de que Fry y la quinasa NDR1 interaccionan en estos procesos de morfogénesis, mostrando una asociación funcional evolutivamente conservada (Cervino et al., 2021). Existen evidencias de que, en ratones,

Fry-like es importante en la organogénesis del riñón mientras que en la rana lo es Fry. En *X. laevis* nuestro grupo estableció que el ARNm de *fry* está presente en el riñón pronéfrico en formación y su función es necesaria para el desarrollo de este riñón común a todos los vertebrados (Espiritu et al., 2018). Ratones Fry-like^{-/-} sufren alta letalidad embrionaria y aquellos sobrevivientes presentan nefropatía crónica evidenciando también la importancia de esta proteína en el desarrollo y funcionamiento del riñón metanéfrico (Byun et al., 2018).

Estudios genéticos en humanos, identificaron mutaciones en ambos genes, FRY y FRY-LIKE, asociadas a trastornos cognitivos recesivos, discapacidad intelectual, retraso en el desarrollo, defectos cardíacos y dismorfismo cráneofaciales (Najmabadi et al., 2011; Pan et al., 2024; Paulraj et al., 2019; Riazuddin et al., 2017; The Deciphering Developmental Disorders Study, 2015). A partir de esta información genómica sobre variantes patogénicas de FRY y FRY-LIKE y mediante el uso de distintos organismos modelo, es posible comprender la etiología de estos trastornos y conocer las funciones de estas proteínas en el desarrollo embrionario normal.

1. 2. Hipótesis del 2R y surgimiento de genes parálogos

En 1970, el investigador japonés Susumu Ohno propuso que las duplicaciones génicas y genómicas jugaban un rol muy importante en la evolución de los seres vivos (Ohno, 1970). Entre las observaciones que apoyaban esa idea estaban el descubrimiento de genes duplicados que codificaban proteínas parecidas, como isoenzimas, y la observación de que el cariotipo y el tamaño del genoma nuclear podían variar mucho entre grupos taxonómicos (Ohno, 1970). Según Ohno, la poliploidia fue un paso determinante en la evolución de los vertebrados, ya que el surgimiento de las isoenzimas contribuyó en gran medida a la evolución de organismos cada vez más complejos, pero no sabía con certeza el momento en el cual habrían ocurrido estas duplicaciones, especulando que las mismas tendrían que haber sido previas al surgimiento de los vertebrados o en peces y anfibios, ancestros de los mamíferos (Furlong & Holland, 2002). Muchas décadas más tarde, la idea de duplicaciones genómicas en el origen de los vertebrados ganó fuerza al compararse el número de genes homólogos en genomas de invertebrados y vertebrados. Por ejemplo, se observan cuatro clusters de genes Hox en el genoma humano en comparación con un único cluster en el anfioxo (Holland et al., 1994; Ruddle, 1997). Estas observaciones dieron origen a la teoría 2R, que propone que un ancestro de los vertebrados pasó por dos duplicaciones genómicas, denominadas 1R y 2R.

Existen dos mecanismos básicos de duplicación del genoma. Por un lado la autopoliploidía, en donde el individuo tetraploide es el resultado de la unión de dos gametas diploides, y por otro lado la allotetraploidía, en donde el apareamiento de dos especies

emparentadas da por resultado un individuo cuyos cromosomas no se aparean durante la meiosis, formando en un inicio dos conjuntos bivalentes independientes de cromosomas homólogos (Furlong & Holland, 2002; Ohno, 1970; Otto, 2007).

Después de una poliploidización y la generación de una población de individuos tetraploides, el genoma resultante comienza un proceso de rediploidización (vuelta a un estado diploide), siendo que la velocidad en que ese proceso ocurre depende del mecanismo subyacente de dicha duplicación. Después de una autotetraploidización, el genoma resultante posee un conjunto de cuatro cromosomas idénticos capaces de hibridarse entre sí. Los genes presentes en los cuatro cromosomas tienen la misma probabilidad de conservación ya que son equivalentes y como consecuencia, el proceso de diploidización se prolonga a lo largo del tiempo (Redmond et al., 2023; Robertson et al., 2017; Simakov et al., 2020). Lo contrario ocurre con los genomas duplicados por medio de la allotetraploidización. En este caso, un individuo posee dos genomas parecidos pero no idénticos, en donde cada uno cuenta con muchas diferencias en secuencias y sus propias características epigenéticas e interacciones cromosómicas, por lo cual indefectiblemente uno de los dos tendrá mayores probabilidades de retención que el otro y la velocidad de rediploidización es más rápida (Simakov et al., 2020).

El genoma del ancestro vertebrado estaría conformado por 17 cromosomas. La mayoría de los cromosomas de la lamprea marina (*Petromyzon marinus*) descienden directamente de los cromosomas ancestrales, mientras que en los vertebrados con mandíbula actuales cada cromosoma ancestral se encuentra redistribuido, por lo general, en tres o cuatro cromosomas actuales (Putnam et al., 2008; Sacerdot et al., 2018; Simakov et al., 2020; Yu et al., 2024). Esta cuádruple sintenia apoya la teoría del 2R.

Según los análisis genómicos más recientes (Simakov et al., 2020; Nakatani et al., 2021; Yu et al., 2024; Marletaz et al., 2024), la primera duplicación de todo el genoma, denominada 1R, es compartida por todos los vertebrados (**Figura 2**) y ocurrió por una autotetraploidización. Luego de la divergencia de los vertebrados sin mandíbula (ciclóstomos) y los vertebrados con mandíbula (gnatostomados), ocurrieron una serie de fusiones y reordenamientos cromosómicos seguidos de la segunda duplicación de todo el genoma, específica para el linaje de los gnatostomados, denominada 2R (**Figura 2**). Esta segunda ronda de duplicación se produjo por allotetraploidización resultante del apareamiento de los progenitores ya extintos (Simakov et al., 2020; Yu et al., 2024), cuyos genomas ya se encontraban completamente rediploidizados (Marletaz et al., 2024). Por su parte, el linaje de los ciclóstomos atravesó una duplicación adicional no encontrada en los gnatostomados, denominada CR (**Figura 2**) (Marletaz et al., 2024; Yu et al., 2024).

Estos eventos de duplicación generaron una serie de pares de genes, denominados parálogos, que a menudo muestran patrones de expresión superpuestos, pero distintos, en

los vertebrados modernos. La conservación de los mismos en el genoma se cree que se debe a que adquirieron nuevas funciones, nuevos patrones de expresión o porque sus productos génicos están en equilibrio de dosificación (Birchler et al., 2001; Birchler & Yang, 2022; Force et al., 1999; Kuzmin et al., 2021; Ohno, 1970; Qian et al., 2010).

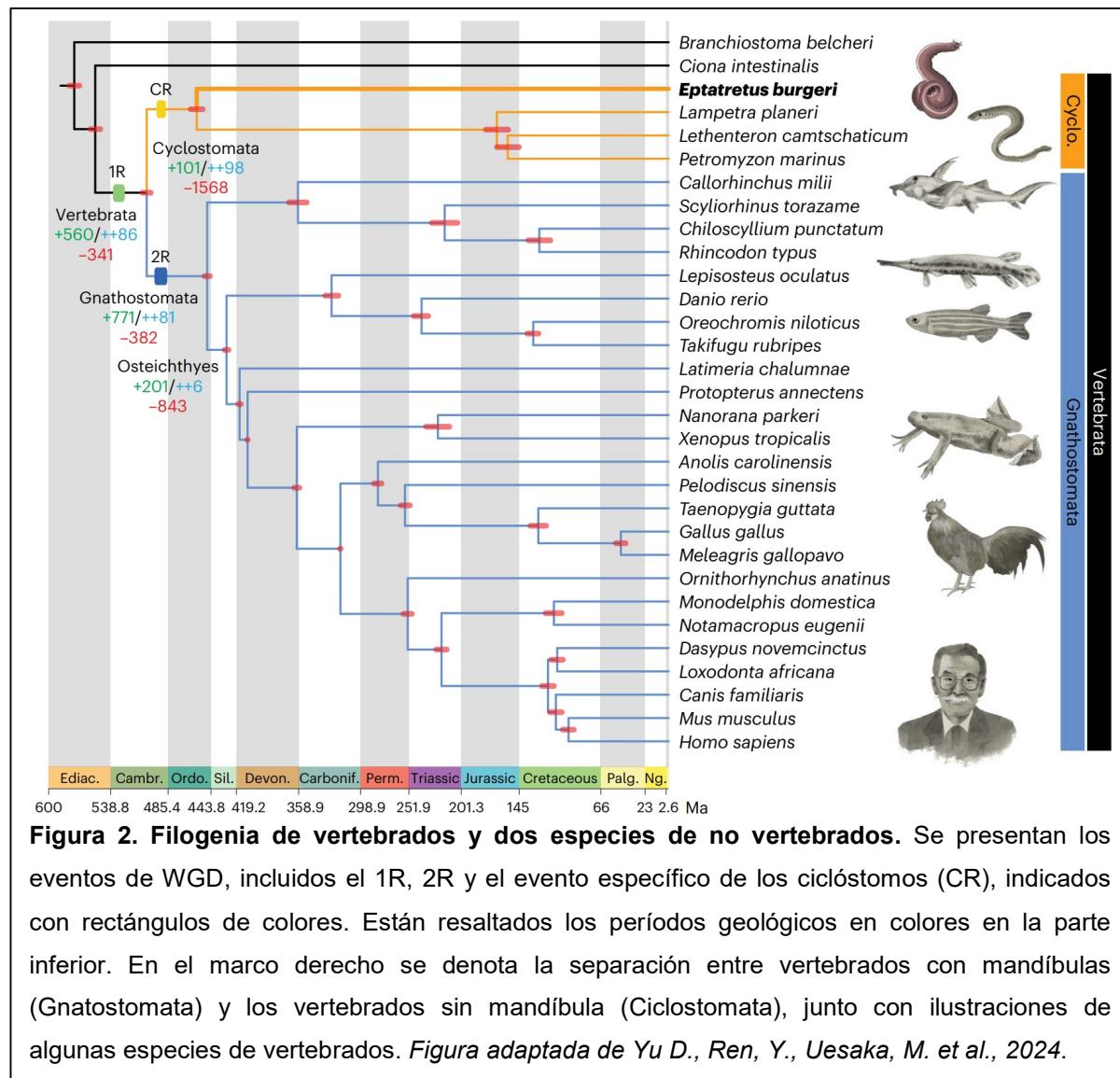


Figura 2. Filogenia de vertebrados y dos especies de no vertebrados. Se presentan los eventos de WGD, incluidos el 1R, 2R y el evento específico de los ciclostomos (CR), indicados con rectángulos de colores. Están resaltados los períodos geológicos en colores en la parte inferior. En el marco derecho se denota la separación entre vertebrados con mandíbulas (Gnathostomata) y los vertebrados sin mandíbula (Ciclostomata), junto con ilustraciones de algunas especies de vertebrados. *Figura adaptada de Yu D., Ren, Y., Uesaka, M. et al., 2024.*

1. 3. Diploidización de genomas duplicados

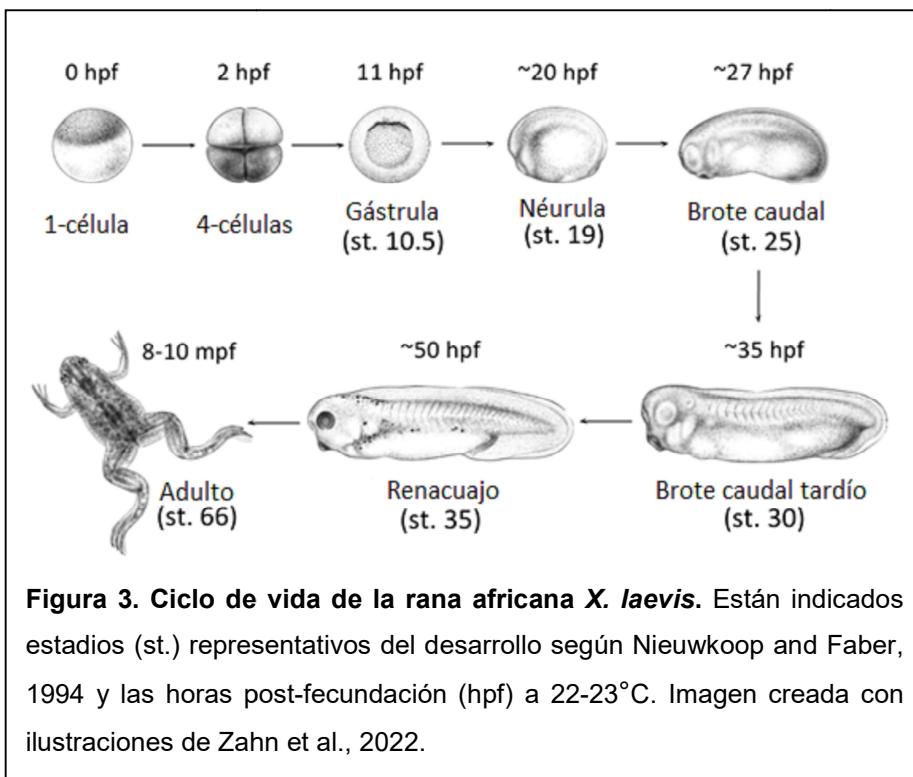
Como se mencionó en el apartado anterior, la duplicación del genoma completo (*Whole Genome Duplication*, WGD) o en tandem (*Tandem Genome Duplication*, TGD), da por resultado el surgimiento de un conjunto de genes denominados parálogos, también llamados ohnólogos en honor a Ohno. Inmediatamente después de una WGD, el genoma de la especie poliploide sufre modificaciones que lo llevan nuevamente a la diploidía. Estos procesos ocurren a lo largo de millones de años de evolución (Ohno, 1970; Otto, 2007; Redmond et al., 2023; Robertson et al., 2017).

Luego de una duplicación génica, es posible que ocurra la pérdida de una de las copias, así como también la retención de ambas copias, a través de diversos mecanismos. Frecuentemente ocurre que, debido a la redundancia de tener dos genes que ejercen las mismas funciones, se acumulan mutaciones deletéreas en una de las copias causando su pérdida, lo que se denomina no-funcionalización (Force et al., 1999). Por otro lado, uno de los genes parálogos puede acumular mutaciones que generen una función nueva o más especializada para una de las copias, un proceso denominado neofuncionalización. También es posible que ambas copias incorporen mutaciones degenerativas que interfieran con determinadas funciones por separado, ocasionando la pérdida diferencial de funciones en cada parálogo. En este caso, se vuelve necesaria la retención de ambas copias parcialmente degeneradas que reúnen el total de las funciones del gen ancestral, lo que se denomina subfuncionalización (Force et al., 1999). Por último, en la hipofuncionalización, ambas copias preservan el total de las funciones ancestrales pero sus niveles de expresión disminuyen, por lo que es necesaria la retención de ambas para alcanzar el umbral necesario y así desempeñar dichas funciones (Qian et al., 2010). Es importante mencionar que las mutaciones a las que se hace referencia pueden ocurrir también en las secuencias regulatorias de los genes, ocasionando las mismas consecuencias a través de los procesos enumerados anteriormente (Force et al., 1999).

Más allá de las mutaciones, otro factor que actúa sobre los genes duplicados es el equilibrio de dosificación. Hay genes que presentan una mayor chance de retención que otros, estos suelen ser genes que forman parte de redes de transducción de señales, factores de transcripción o proteínas de la cromatina (Birchler et al., 2001).

1. 4. *X. laevis* como modelo para el estudio de la expresión de *fry* y *fry-like*

La rana africana *X. laevis* es una especie de anfibio muy utilizada en la investigación de la biología del desarrollo de vertebrados y más recientemente como modelo de enfermedades y síndromes genéticos en humanos (Blum & Ott, 2018). Sus huevos son de gran tamaño (1 mm de diámetro) y presentan desarrollo externo facilitando su manipulación. El desarrollo rápido de los embriones, manipulable en un rango amplio de temperaturas (14-23°C), lo convierte en un organismo perfecto para el estudio de la expresión génica y organogénesis (**Figura 3**). Además, el genoma comparte un alto grado de similitud con el humano y ~80% de los genes asociados con enfermedades humanas se encuentran conservados en esta especie.



Si bien la poliploidía es poco frecuente en amniotas (Orr, 1990), es frecuente en peces, plantas y anfibios (Otto, 2007). La rana *X. laevis* es una especie poliploide dentro del grupo *Xenopus* en el cual hay especies desde diploide hasta dodecaploide (Kobel & Du Pasquier, 1986). *X. laevis* posee dos juegos de cromosomas homeólogos, originarios de dos especies parentales distintas por lo que se la define como allotetraploide. Esta especie surgió a partir del apareamiento entre dos progenitores diploides ($2n=18$) de dos especies distintas, las cuales se estima que divergieron hace ~ 34 millones de años. Hace ~ 17 - 18 millones de años, este híbrido infértil duplicó todo su genoma, lo que permitió el restablecer el apareamiento meiótico y la herencia disómica, dando lugar a la especie tetraploide actual ($2n=36$) (Figura 4a) (Session et al., 2016). Estos subgenomas no sufren recombinación, sino que coexisten en el mismo núcleo y evolucionan de forma separada. Se ha establecido que el subgenoma L (*longer*) es el más estable y el subgenoma S (*shorter*) es el que acumula más delecciones, recombinaciones intracromosómicas, pérdida de genes, cambios en la expresión de los genes, etc. (Session et al., 2016; Simakov et al., 2020). *X. laevis* cuenta con un genoma duplicado recientemente con respecto al resto de los vertebrados (Session et al., 2016), por lo que es un modelo ideal para estudiar el impacto de una duplicación genómica (Chain & Evans, 2006; Hellsten et al., 2010; Uno et al., 2013). Esta característica poliploide lo convierte un excelente organismo modelo para el estudio de procesos tempranos de diploidización luego de un WGD, particularmente teniendo en cuenta que su tetraploidia se debe a un evento de allotetraploidización como lo es la 2R en vertebrados con mandíbulas (Simakov et al., 2020; Yu et al., 2024).

Ambos genes de la familia *Furry* están presentes en el genoma de *X. laevis* por lo que coexisten dos copias del gen *fry* y dos copias del gen *fry-like* (**Figura 4b**). No se había realizado un análisis comparativo de los patrones de expresión de estos genes parálogos en el desarrollo embrionario de vertebrados, más allá de unos pocos estadios en *X. laevis* (Espíritu et al., 2018).

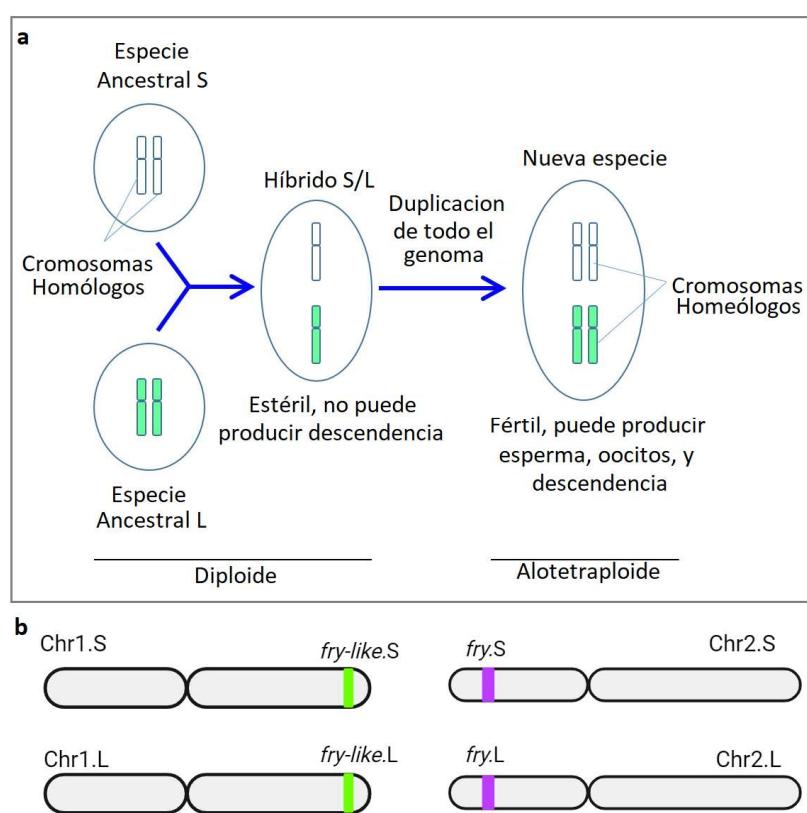


Figura 4. (a) Origen del antepasado *Xenopus*. Dos especies ancestrales distintas con nueve pares de cromosomas, S y L, se aparean para producir una descendencia híbrida S/L con 18 cromosomas que no se aparean. Esta descendencia estéril sufre una duplicación del genoma completo para producir una nueva especie fértil con 18 pares de cromosomas que es ancestral de todas las especies de *Xenopus* (Esquema tomado y adaptado de Masanori Taira. Derechos de autor: Masanori Taira 2016). (b) Esquema de los cromosomas 1 y 2 de *X. laevis* para los genomas S y L. Se esquematiza la ubicación de los genes *fry* y *fry-like* en los cromosomas 2 y 1, respectivamente.

2. Hipótesis y Objetivos

Los genes *Furry* codifican proteínas conservadas evolutivamente en animales y otros grupos eucariotas. En vertebrados parece haber al menos dos genes parálogos – *Fry* y *Fry-like* – pero la distribución y evolución de esa familia génica no ha sido estudiada en detalle. Tampoco hay estudios comparativos sistemáticos que busquen entender el grado de divergencia o semejanza en el patrón de expresión de estos genes en vertebrados. En ese contexto, el presente trabajo tiene como ***objetivo general*** comprender el origen evolutivo de los genes *Fry* y *Fry-like* y la divergencia en la expresión de estos parálogos en el desarrollo embrionario de vertebrados. El proyecto tiene las siguientes hipótesis y objetivos específicos:

Hipótesis 1: Los genes *Fry* y *Fry-like* surgieron en el inicio de la evolución de los vertebrados, como consecuencia de las tetraploidizaciones que ocurrieron en un ancestro del grupo.

Objetivo Específico 1.1: Emplear herramientas bioinformáticas para obtener y comparar las secuencias de las proteínas *Fry* y *Fry-like* de cordados, hemicordados y equinodermos.

Objetivo Específico 1.2: Realizar una reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre *Fry* y *Fry-like* en los distintos grupos taxonómicos.

Objetivo Específico 1.3: Estudiar el contexto genómico de ambos genes para establecer relaciones de sintenia.

Hipótesis 2: En vertebrados, *Fry* y *Fry-like* presentan expresión superpuesta en algunos órganos y tejidos y en otros han divergido.

Objetivo Específico 2.1: Analizar el patrón de expresión de los genes *fry* y *fry-like*, por medio de la detección de sus transcriptos utilizando la técnica de hibridación *in situ*, en distintos estadios del desarrollo embrionario de la rana *X. laevis*.

Objetivo Específico 2.2: Comparar la distribución espacial de los transcriptos de ambos homeólogos de *fry* (homeólogos S y L) y de *fry-like* (homeólogos S y L) por hibridación *in situ*.

3. Materiales y Métodos

3. 1. Declaración de ética

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los principios de cuidado de animales de laboratorio (NIH Publicación N° 86-23, revisado 1996, <http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm>) y siguiendo el protocolo aprobado por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Protocolo N°64).

3. 2. Obtención de embriones de *X. laevis*

Se obtuvieron embriones de *X. laevis* a partir de amplexo natural de ranas adultas mantenidas en un cuarto con condiciones controladas de temperatura (18-21°C) y fotoperíodo constante (ciclo 12:12 h luz - oscuridad). Para inducir el amplexo, se realizaron inyecciones intracelómicas de la hormona gonadotrofina coriónica humana, hCG (Pregnyl 500 UI, MSD). Las hembras fueron preinducidas con 50 U.I hCG de 3 a 15 días previos a la inducción para favorecer la maduración oocitaria y se indujo la oviposición mediante la inyección de 450 - 800 U.I hCG la tarde previa al amplexo. El comportamiento reproductivo de los machos se indujo con 100 U.I hCG la tarde previa al amplexo. Las parejas fueron aisladas en tanques de reproducción durante el amplexo. Aproximadamente 15 h luego de la inducción, la hembra comienza a poner huevos que son inmediatamente fecundados por el macho (fecundación externa). Se recolectaron los embriones en el agua de puesta cada 1 - 1.5 h. Con el fin de facilitar la manipulación, los embriones fueron tratados con una solución de 3% L-cisteína (pH 8.0) (Sigma) preparada en 0.1X Marc's Modified Ringer's (MMR) (1 M NaCl, 50 mM HEPES, 20 mM, 20 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7.4) para remover las envolturas de gelatina secretadas por el oviducto de las hembras. Los embriones fueron mantenidos en 0.1X MMR en incubadoras a 14 - 20°C hasta el estadio de desarrollo deseado. Se estableció el estadio de los embriones de acuerdo con la Tabla de desarrollo normal de *Xenopus* (Nieuwkoop & Faber, 1994) y la base de datos de *Xenopus*, Xenbase (xenbase.org).

3. 3. Obtención de oocitos de *X. laevis*

Se obtuvieron oocitos de *X. laevis* en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Daniel Calvo (IFIByNE-UBA-CONICET). El procedimiento quirúrgico y la collagenización de los oocitos fueron llevados a cabo por el Dr. Manuel Lopez siguiendo protocolos descritos

previamente (Beltrán González et al., 2014; Wozniak et al., 2018). Brevemente, las ranas fueron anestesiadas en tricaina metano sulfonato (MS 222) (1,5 mg/mL) durante 30 minutos para la remoción quirúrgica de los ovarios. Los lóbulos de los ovarios fueron incubados en una solución de colagenasa (400 U/mL) durante 4 h en agitación y los oocitos aislados fueron mantenidos en solución de Barth (88 mM NaCl, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 1 mM KCl, 0.82 mM MgSO₄; 2.4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES; pH 7.4) a 18°C hasta ser utilizados. Se estableció el estadio de crecimiento de los oocitos de acuerdo con (Dumont, 1972).

3. 4. Síntesis de las sondas de ARN para hibridación *in situ* (HIS)

Protocolo de linealización.

En un tubo eppendorf de 0.5 ml se agregaron 2.5 µg del plásmido de interés (amplificado previamente mediante transformación bacteriana) (**Tabla 1**), 5 µl de buffer de digestión 10X (Invitrogen), 1 µl de la enzima de restricción (ER), se completó con H₂O_{dd} autoclavada hasta 50 µl y la reacción se incubó durante ~4 h a 37 °C. Se verificó que el fragmento haya sido correctamente linealizado por medio de electroforesis en gel de agarosa (1% en TAE 1X) teñido con *syber safe* (Invitrogen). Se corrió 1 µl del plásmido digerido junto a un marcador de peso molecular (Fago λ, DS BIO) y el plásmido sin linealizar en buffer de siembra 6X (Biodynamics, B060-1). Luego, el plásmido linealizado se purificó de la reacción de restricción con el kit de purificación de DNA *Clean & Concentrator -5* (Zymo Research).

Plásmidos y sondas empleadas para HIS.

| Sonda | Plásmido | Región | Nucleótidos (código de referencia) | ER | AP |
|------------------------------|-------------|----------------|------------------------------------|--------------|----|
| <i>fry-like.S</i> | pCR2.1 | 3'-3'UTR | 8525-9524 (XM_041579469.1) | <i>BamHI</i> | T7 |
| <i>fry-like.L</i> | pCR2.1 | 3'-3'UTR | 9416-10415 (XM_018229725) | <i>BamHI</i> | T7 |
| <i>fry-like</i> ¹ | pCR2.1 | 3'-3'UTR | 9829-10220 (XM_018229725.2) | <i>SacI</i> | T7 |
| <i>fry</i> ¹ | pCMV.Sport6 | 3' Codificador | 8498-9189 (XM_018244669) | <i>Smal</i> | T7 |

Tabla 1. Sondas de *fry* y *fry-like* empleadas para hibridación *in situ* en embriones de *X. laevis*. Para cada sonda se indica: 1) el plásmido en el cual fue clonado el fragmento de ADNc; 2) la región del ARNm con el que hibrida la sonda; 3) los nucleótidos y el código de referencia de la secuencia del ARNm (NCBI); 4) la enzima de restricción (ER) utilizada para la linealización y 5) la ARN polimerasa (AP) utilizada para la síntesis. ¹Espiritu et al., 2018.

Síntesis de las sondas (Tabla 2).

En un tubo eppendorf se agregaron 1.5-2 µg del plásmido linealizado, 1 µl DIG (dioxigenina) ARN labeling Mix (Roche), 1 µl buffer de transcripción 10X (Invitrogen), 0.5 µl inhibidor de RNasa Ribolock (Thermo Scientific), 1 µl ARN polimerasa (Invitrogen) y se completó con H₂O_{dd} hasta 10 µl. Se incubó la reacción a 37 °C por 2 h. Se agregó 1 µl de DNase (Thermo Scientific) libre de RNasa y se incubó por 30 min a 37 °C. Se tomó 1 µl para analizar por electroforesis (corrida 10 min a 90 volts) y evidenciar la presencia de la sonda. Por último, se purificó la sonda mediante precipitación agregando a la reacción de síntesis 2 µl de EDTA 0.5 M, 10 µl de LiCl 4 M, 100 µl de H₂O_{dd} autoclavada y 300 µl de EtOH 100% y se mantuvo overnight (ON) a -20 °C. Luego se centrifugó por 15 min a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet en EtOH 70%, se realizó una última centrifugación por 5 min a máxima velocidad y se volvió a descartar el sobrenadante. Posteriormente al secado, el pellet se resuspendió en 25 µl de H₂O_{dd} libre de RNasas y 25 µl de buffer de hibridación y se guardó a -20 °C (stock de sonda).

| mRNA Sonda \ | <i>fry.S</i> | <i>fry.L</i> | <i>fry-like.S</i> | <i>fry-like.L</i> |
|------------------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|
| <i>fry-like.L</i> 1kb | 24,6% | 25,3% | 84,2% | 100% |
| <i>fry-like.S</i> 1kb | 25,5% | 26,6% | 98,2% | 84,3% |
| <i>fry-like</i> 0.4 kb | 11,4% | 12% | 78,7% | 100% |
| <i>fry</i> | 94,8% | 100% | 22% | 21,7% |

Tabla 2. Porcentaje de identidad que presentan las cuatro sondas utilizadas en los ensayos de hibridación *in situ* con los ARN mensajeros (ARNm) de *fry* y *fry-like*.

3. 5. Hibridación *in situ* (HIS)

Se realizaron HIS en embriones enteros (*in toto*) siguiendo el protocolo descrito en (Gawantka et al., 1998). Todos los lavados e incubaciones de la HIS se realizaron en tubos eppendorf con 0.5 ml de solución excepto la fijación que se realizó en 1 ml. Cada tubo contenido 15-20 embriones. Los embriones fueron fijados en MEMFA (1X sales MEM; 4% formaldehído) (10X sales MEM: 0.2 M MOPS (pH 7.4), 4 mM EGTA, 1 mM MgSO) a 4°C ON, deshidratados progresivamente en una serie de metanol (MeOH) y mantenidos en MeOH a -20°C ON. Luego de una hidratación progresiva en Buffer Fosfato Salino (PBS), los embriones se transfirieron a una solución de PTw (1X PBS, 0,1% Tween-20). Los embriones fueron permeabilizados mediante tratamiento con Proteinasa K (0.5 ug/ml, Sigma) y fijados en formaldehído 4% en PTw por 20 min. Luego de prehibridar los embriones en Buffer de

Hibridación por al menos 1.5 h a 65°C, esta se reemplazó por la Solución de Hibridación (15-20 μ l de stock de sonda en 1.5 ml de Buffer de Hibridación) y se incubó a 65°C en agitación leve ON. Posteriormente se realizaron lavados exhaustivos de la sonda con las Soluciones de Lavado (solución 1: 2 x 30 min; solución 2: 2 x 15 min; solución 3: 4 x 20 min) a 65°C en agitación. Luego de dos incubaciones en solución MAB, se realizó el bloqueo de antígenos inespecíficos en la Solución de Bloqueo por al menos 1 h a temperatura ambiente. Los embriones se incubaron a 4°C en agitación ON en una solución 1:5.000 del anticuerpo *anti-DIG alkaline phosphatase Fab fragment* (Roche) preparado en Solución de Bloqueo. Se realizaron lavados en PTw (~10) por al menos 3 h para remover el exceso de anticuerpos. Con el fin de revelar la presencia de la sonda, los embriones se incubaron en Buffer de Tinción con los sustratos de la fosfatasa alcalina:*NBT* (*nitro blue tetrazolium*, Sigma) y *BCIP* (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*, Sigma). En presencia de estos sustratos, la fosfatasa alcalina cataliza una reacción que da lugar a un precipitado de color violeta. La reacción colorimétrica se detuvo al observarse el precipitado violeta en los embriones. Luego de lavados con PTw, los embriones se fijaron en solución Bouin's modificada (4% formaldehído, 5% ácido acético) ON a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, se realizaron varios lavados con 70% EtOH:H₂O para remover la solución de Bouin's y eliminar la tinción inespecífica. Se procedió a la despigmentación de los embriones utilizando una solución de blanqueo (5% peróxido de oxígeno 100 volúmenes, 5% formamida, 2.5X SSC) y exposición directa a luz intensa por ~1 h en agitación.

3. 6. Histología

Posterior al procesamiento para HIS, los embriones se deshidrataron secuencialmente en una serie de etanol (EtOH) (70% EtOH 10 min, 90% EtOH 10 min, 100% EtOH 2x 10 min) y se aclararon en xilol durante 15 min. Luego de un pasaje por xilol-parafina (50:50) por 20 min a 60°C y dos pasajes por parafina:histoplast (Biopac) (50:50) de 20 min a 65°C, los embriones se orientaron bajo lupa en tacos de parafina. Se realizaron cortes histológicos de 16 μ m de espesor con un micrótomo (Mikoba CP 350) que fueron montados en portaobjetos. Por último, los cortes se desparafinaron en xilol y se montaron con medio de montaje anhidro (DPX, Sigma). Las imágenes de los cortes histológicos fueron tomadas con una cámara digital (SP-350; Olympus) acoplada a un microscopio de campo claro (CX31: Olympus) con un objetivo 100X y con una cámara digital (QImaging Micropublisher 3.3) acoplada a un microscopio Nikon (Eclipse E200) con objetivos 40X y 200X. Las imágenes de embriones fijados enteros se obtuvieron con la cámara QImaging Micropublisher 3.3 acoplada a una lupa Leica L2. Se utilizó 12.5X de magnificación para estadios de oocitos

ovipuestos (st. VI) y estadios embrionarios (st. 1 - st. 35) y 20X y 32X para magnificaciones de embriones en estadios de brote caudal (St. 25 a St. 35).

3. 7. Soluciones para HIS

SSC 20X (100 ml)

17.53 g NaCl (3 M)

8.82 g Na₃citrato*2H₂O_{dd} (300 mM)

pH 7 con HCl 1 M

Completar con H₂O_{dd} autoclavada

Buffer de Hibridación (100 ml)

48 ml Formamida (50%)

25 ml 20X SSC (5X)

5 ml 100 mM EDTA (5 mM)

1 ml 10% Tween 20 (0,1%)

3.33 ml 3% CHAPS (0,1%)

15.7 ml H₂O_{dd}

2 ml RNA torula (Sigma) 50 mg/ml en Formamida (1 mg/ml)

0.1 ml Heparina (50 mg/ml)

Solución de lavado 1 (100 ml)

50 ml Formamida (50%)

10 ml 20X SSC (2X)

10 ml 3% CHAPS (0,3%)

Completar con H₂O_{dd} autoclavada

Solución de lavado 2 (100 ml)

10 ml 20X SSC (2X)

10 ml 3% CHAPS (0,3%)

Completar con H₂O_{dd} autoclavada

Solución de lavado 3 (200 ml)

2 ml 20X SSC (0,2X)

20 ml 3% CHAPS (0,3%)

Completar con H₂O_{dd} autoclavada

Buffer de Tinción (10 ml)

1 ml 1M Tris-HCl, pH 9,5 (100 mM)

1 ml 1 M NaCl (100 mM)

500 μ l 1M MgCl₂ (50 mM)

100 μ l 10% Tween 20 (0.1%)

Completar con H₂O_{dd}

Para la reacción colorimétrica agregar por ml de Buffer de Tinción: 6.75 μ l stock/ml NBT (stock: 50 mg/ml preparado en 70% di-metil-formamida) y 3.5 μ l stock/ml BCIP (stock: 50 mg/ml preparado en H₂O_{dd}).

MAB (500 ml)

5.80 g Ácido Maleico (100 mM)

4.38 g NaCl (150 mM) pH 7,5 con NaOH

Completar con H₂O_{dd}

Blocking Reagent 10% (100 ml MAB)

10 g *Blocking Reagent* (Roche)

Disolver *Blocking Reagent* en 100 ml de MAB por autoclavado.

Solución de Bloqueo (10 ml MAB)

2 ml 10% *Blocking Reagent* (2%)

500 μ l suero de cabra (5%) (Merck)

7.5 ml MAB

3. 8. Búsqueda de las secuencias de las proteínas Fry y Fry-like

Las secuencias de las proteínas Fry y Fry-like se buscaron en las bases de datos de secuencias genómicas Ensembl (www.ensembl.org) Ensembl Metazoa (<https://metazoa.ensembl.org/>), GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y SIMRbase (<https://simrbase.stowers.org>), utilizando las secuencias de *X. laevis* como referencia y el programa BLAST implementado en cada una de las bases de datos. Se buscaron y analizaron las secuencias de proteínas Furry de especies de vertebrados que ocupan posiciones filogenéticamente relevantes. Así, utilizamos secuencias de mamíferos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Mustela putorius furo*, *Monodelphis domestica*), aves (*Gallus gallus*, *Parus major*), reptiles (*Crocodylus porosus*, *Chelonoidis abingdonii*, *Chrysemys picta*), anfibios (*Xenopus laevis*, *Bufo bufo*, *Leptobrachium leishanense*, *Engystomops pustulosus*), un pez pulmonado (*Polypterus annectens*), un celacanto (*Latimeria chalumnae*),

peces de aleta rayada (*Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Lepisosteus oculatus*), peces cartilaginosos (*Carcharodon carcharias*, *Callorhinchus milii*), y dos especies de peces sin mandíbula (ciclóstomas; *Eptatretus burgeri* y *Petromyzon marinus*). Como grupo externo utilizamos varias secuencias de *Furry* recuperadas de genomas de deuterostomados: dos erizos de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*, *Lytechinus variegatus*), una estrella de mar (*Patiria miniata*), dos cefalocordados (*Branchiostoma floridae* y *B. lanceolatum*), un hemicordado (*Saccoglossus kowalevskii*) y un tunicado (*Styela clava*).

En las bases de datos Ensembl y GenBank, las secuencias de genes *Furry* de ciclóstomas no fueron encontradas enteras, sino partidas en varias secuencias distintas que tuvieron que ser ensamblados manualmente. En el caso de las secuencias del mixine *E. burgeri*, fueron realizadas búsquedas con el programa TBLASTN en Ensembl para recuperar exones no reconocidos por las secuencias anotadas y así obtener proteínas lo más completas posible.

En la **Tabla 4** (Ver Resultados) se presenta el código de referencia de las secuencias aminoacídicas utilizadas de cada especie, tanto de Fry como Fry-like y la base de datos de la cual fue obtenida. Mientras que la **Tabla 3** resume en una lista las especies utilizadas en el análisis.

| Taxonomía | Nombre común | Nombre científico |
|-----------------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| Echinodermata – Asteroidea | Estrella de mar | <i>Patiria miniata</i> |
| Echinodermata – Echinoidea | Erizo de mar | <i>Lytechinus variegatus</i> |
| Echinodermata – Echinoidea | Erizo de mar | <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> |
| Hemichordata | Gusano bellota | <i>Saccoglossus kowalevskii</i> |
| Cephalochordata | Anfioxo | <i>Branchiostoma lanceolatum</i> |
| Cephalochordata | Anfioxo | <i>Branchiostoma floridae</i> |
| Tunicata | Ascidia | <i>Styela clava</i> |
| Cyclostomata - Myxiniformes | Pez bruja (Hagfish) | <i>Eptatretus burgeri</i> |
| Cyclostomata - Petromyzontiformes | Lamprea | <i>Petromyzon marinus</i> |
| Chondrichthyes – Holocephala | Tiburón elefante | <i>Callorhinchus milii</i> |
| Chondrichthyes - Elasmobranchii | Tiburón blanco | <i>Carcharodon carcharias</i> |
| Actinopterygii - Lepisosteiformes | Pejelagarto | <i>Lepisosteus oculatus</i> |
| Actinopterygii – Teleostei | Medaka | <i>Oryzias latipes</i> |
| Actinopterygii – Teleostei | Zebrafish | <i>Danio rerio</i> |
| Sarcopterygii – Actinistia | Celacanto | <i>Latimeria chalumnae</i> |
| Sarcopterygii – Dipnii | Pez pulmonado | <i>Protopterus annectens</i> |
| Amphibia – Anura | Rana | <i>Xenopus laevis</i> |

| | | |
|---------------------------|-----------------|----------------------------------|
| Amphibia – Anura | Rana | <i>Leptobrachium leishanense</i> |
| Amphibia – Anura | Rana | <i>Engystomops pustulosus</i> |
| Amphibia – Anura | Sapo | <i>Bufo bufo</i> |
| Marsupialia – Didelphidae | Zarigüeya | <i>Monodelphis domestica</i> |
| Eutheria – Mustelidae | Hurón | <i>Mustela putorius furo</i> |
| Eutheria – Rodentia | Ratón | <i>Mus musculus</i> |
| Eutheria – Primates | Humano | <i>Homo sapiens</i> |
| Reptilia – Testudines | Tortuga | <i>Chrysemys picta</i> |
| Reptilia – Testudines | Tortuga | <i>Chelonoidis abingdonii</i> |
| Reptilia – Crocodilia | Cocodrilo | <i>Crocodylus porosus</i> |
| Aves – Galliformes | Gallina | <i>Gallus gallus</i> |
| Aves – Passeriformes | Carbonero común | <i>Parus major</i> |

Tabla 3. Especies elegidas para la confección del árbol filogenético ordenadas según grupo taxonómico, nombre común y nombre científico.

Las secuencias de proteínas encontradas fueron analizadas con el programa de alineamiento global Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). El análisis consistió principalmente en alinear la secuencia de cada especie contra las secuencias de *X. laevis* como referencias y observar el grado de semejanza. El alineamiento permitió evaluar que las secuencias aminoacídicas estaban completas para buscar nuevas secuencias en caso de que hubiera regiones faltantes.

3. 9. Estimación de la filogenia de proteínas Fry y Fry-like

Una vez seleccionadas las secuencias de interés, se utilizó el paquete de programas NGPhylogeny (<https://ngphylogeny.fr>; Lemoine et al., 2019) para estimar las relaciones filogenéticas entre las proteínas. Las secuencias de Fry y Fry-like fueron alineadas con Clustal Omega y las regiones que se alineaban de manera ambigua o que no se alineaban fueron eliminadas con el programa Gblocks (Talavera & Castresana, 2007). Los parámetros utilizados de Gblocks fueron los estándares, excepto que se permitió que el alineamiento tuviera gaps en la mitad de las secuencias. La estimación de la filogenia fue realizada por el método de Maximum Likelihood implementado en el programa PhyML 3.0 (Guindon, 2010). Los parámetros fueron los estándares, utilizando el modelo LG para estimar las distancias entre las secuencias de aminoácidos (Le et al., 2008). El grado de soporte estadístico para el árbol filogenético fue inferido por el método de Bootstrap (100 réplicas; (Felsenstein, 1985)).

3. 10. Sintenia de genes *Fry* y *Fry-like*

Se profundizó el análisis de los genes *Fry* y *Fry-like* de algunas especies claves de vertebrados a modo de estimar el grado de conservación del entorno genómico de cada gen. Para esto, se comparó manualmente la presencia de genes vecinos y el orden de estos en torno a *Fry* y *Fry-like* utilizando las bases de datos Ensembl.

Además, se realizó el rastreo de los genes *Fry* y *Fry-like* en cromosomas del vertebrado ancestral reconstruidos en la publicación de Simakov et al., 2020; en el genoma de tres especies de vertebrados actuales: la rana *Xenopus tropicalis*, la gallina *Gallus gallus*, y el pez gar *Lepisosteus oculatus*.

4. Resultados

4. 1. Análisis evolutivo de las proteínas Furry en vertebrados

En la literatura científica, se ha reportado la existencia de dos genes *Furry* –*Fry* y *Fry-like*– en los genomas de algunas especies de vertebrados, específicamente humano, ratón y la rana *X. laevis* (Byun et al., 2018; Cervino et al., 2021; Chiba et al., 2009; Espiritu et al., 2018; Hayette et al., 2005; Ikeda et al., 2012; Nagai et al., 2013; Overbeek et al., 2001; Pan et al., 2024; Paulraj et al., 2019; Ren et al., 2013; Sait et al., 2007). Sin embargo, la distribución general de los genes *Furry* en los diversos grupos de vertebrados, así como la relación entre estos genes y las poliploidizaciones que ocurrieron en la evolución de los vertebrados, nunca ha sido estudiada.

Para entender el origen evolutivo de los genes *Furry* en vertebrados, se decidió comenzar por realizar un análisis filogenético de las proteínas Furry utilizando el método de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*). Como primer paso, se obtuvieron las secuencias aminoacídicas de Fry y Fry-like de *X. laevis*, las cuales fueron usadas para buscar secuencias homólogas en los genomas de representantes de todos los grupos de vertebrados y sus parientes deuterostomados mediante el programa BLASTP en bases de datos genómicas como GenBank, Ensembl, Ensembl Metazoa y otros (ver Materiales y Métodos, **Tablas 3 y 4**). De manera general, se encontraron dos genes *Furry* (a veces más) en los genomas de vertebrados, mientras que uno sólo fue recuperado del genoma de deuterostomados no-vertebrados como los anfioxos (*B. floridae* y *B. lanceolatum*), el tunicado *S. clava*, el hemicordado *S. kowalevskii* (gusano bellota) y varias especies de equinodermos (**Tablas 3 y 4**). Dos secuencias de Furry fueron encontradas en dos especies de vertebrados sin mandíbula: la lamprea marina (*P. marinus*) y el mixine (pez bruja) (*E. burgeri*). En agnatos, estas secuencias de ARNm y las secuencias aminoacídicas de las proteínas obtenidas no se encontraron completas sino que eran de un tamaño menor, fraccionadas y con segmentos faltantes, por lo cual se reconstruyeron en base a datos de Ensembl y SIMRbase.

| Nombre científico | Fry | Fry-like | Base de datos |
|-------------------------|---|-------------------------|----------------------|
| <i>P. miniata</i> | XP_038055333.1 | - | Ensembl Metazoa |
| <i>L. variegatus</i> | XP_041471022.1 | - | Ensembl Metazoa |
| <i>S. purpuratus</i> | XP_030836893.1 | - | GenBank |
| <i>S. kowalevskii</i> | XP_006814707.1 | - | GenBank |
| <i>B. lanceolatum</i> | BL00131_evm24 | - | Ensembl Metazoa |
| <i>B. floridæ</i> | XP_035681353.1 | - | GenBank |
| <i>S. clava</i> | XP_039267750.1 | - | GenBank |
| <i>E. burgeri</i> | ENSEBUP00000007555 ENSEBUP00000001546 | ENSEBUP00000004738 | Ensembl |
| <i>P. marinus</i> | XP_032832922.1 (Chr 61) XP_032836115.1 | XP_032811061.1 (Chr 16) | GenBank |
| <i>C. mili</i> | XP_007889474.1 | XP_007890919.1 | GenBank |
| <i>C. carcharias</i> | XP_041055010.1 | XP_041054401.1 | GenBank |
| <i>L. oculatus</i> | ENSLOCT00000009925.1 | ENSLOCT00000017404.1 | Ensembl |
| <i>O. latipes</i> | ENSORLT00000004897.2 | ENSORLT00000036468.1 | Ensembl |
| | ENSORLT00000004444.2 | | |
| <i>D. rerio</i> | ENSDART00000155902.3 | NP_001153139.1 | Ensembl / GenBank |
| | ENSDART00000142881.3 | | |
| <i>L. chalumnae</i> | XP_014349570.1 | XP_014345450.1 | GenBank |
| <i>P. annectens</i> | XP_043929163.1 | XP_043911662.1 | GenBank |
| <i>X. laevis L</i> | NP_001104227 | XP_041444742 | GenBank |
| <i>X. laevis S</i> | XP_041440436 | XP_041435393 | |
| <i>L. leishanense</i> | ENSLLET00000040086.1 | ENSLLET00000013050.1 | Ensembl |
| <i>E. pustulosus</i> | KAG8584934.1 | KAG8591835.1 | GenBank |
| <i>B. bufo</i> | XP_040282080.1 | XP_040274823.1 | GenBank |
| <i>M. domestica</i> | XP_001367528.1 | XP_007496540.1 | GenBank |
| <i>M. putorius furo</i> | XP_044925516.1 | XP_012918135.1 | GenBank |
| <i>M. musculus</i> | XP_006504995.1 | NP_082470.2 | GenBank |
| <i>H. sapiens</i> | XP_006719812.1 | NP_055845.1 | GenBank |
| <i>C. picta</i> | XP_042698748.1 | XP_023957178.1 | GenBank |
| <i>C. abingdonii</i> | ENSCABT00000012097.1 | ENSCABT00000010474.1 | Ensembl |
| <i>C. porosus</i> | XP_019385644.1 | XP_019408305.1 | GenBank |
| <i>G. gallus</i> | XP_025002603.1 | XP_040527549.1 | GenBank |
| <i>P. major</i> | ENSPMJT00000030438.1 | ENSPMJT00000027219.1 | Ensembl |

Tabla 4. Listado de las secuencias utilizadas para llevar a cabo el análisis evolutivo de los genes *Furry*. Se presentan los códigos de referencia de las secuencias de proteínas utilizadas junto con la base de datos en las cuales fueron obtenidas. Los no vertebrados sólo contienen una copia del gen *Furry* y su código de acceso se informa en la columna de Fry por defecto. En el caso de los ciclóstomos (*P. marinus* y *E. burgeri*), se informan más de un código de acceso para Fry por la unión de fragmentos de las proteínas que se encuentran anotadas de esa forma. Los teleósteos *O. latipes* y *D. rerio* presentan 3 genes *Furry*, el código de acceso de arriba es para Frya y el de abajo para Fryb.

Una vez obtenidas todas las secuencias, se realizó un alineamiento utilizando el programa Clustal Omega (Madeira et al., 2022), con el fin de observar diferencias entre las secuencias de las distintas especies y entre los parálogos y verificar que las secuencias estuvieran completas. Si bien no se observaron zonas de grandes delecciones o inserciones, en los casos en que se encontraron interrupciones en la secuencia, se procedió a la búsqueda de la región faltante mediante un BLAST contra el genoma completo de tal especie utilizando la secuencia de *X. laevis* como guía.

Para la confección del árbol filogenético se utilizó el paquete de programas NGPhylogeny (<https://NGPhylogeny.fr/>) el cual permite, mediante la elección de diversos ítems, configurar el análisis de las secuencias a utilizar. Se seleccionó la opción “A la Carte” que posibilita personalizar las herramientas, los parámetros y el flujo de trabajo. Las secuencias fueron alineadas mediante el uso de Clustal Omega, las regiones de alineamiento ambiguo y secuencias faltantes o gaps fueron eliminadas mediante el programa Gblocks, el cual se configuró para permitir solo la conservación de la mitad de las mismas. La inferencia de la filogenia se llevó a cabo por el método de Máxima Verosimilitud a través del programa PhyML 3.0 (Guindon, 2010) y el modelo de sustituciones LG (Le et al., 2008) y la robustez del árbol obtenido se puso a prueba a través de la utilización del método de Bootstrap (Felsenstein, 1989). Se planteó la construcción de 100 árboles filogenéticos los cuales difieren en cambios y arreglos realizados al azar a nivel de las secuencias proteicas con el fin de ver si estos perturban la topología obtenida. En el árbol filogenético, el número de bootstrap mostrado en los nodos informa la cantidad de réplicas en las cuales esa rama del árbol permaneció con la misma topología.

En la **Figura 5** se observa el árbol filogenético obtenido. De manera general, los valores de bootstrap son altos (arriba de 95%) lo que indica un alto grado de confianza en la topología obtenida. Como esperado, las secuencias de Furry de los grupos de deuterostomados no-vertebrados (equinodermos y cordados no-vertebrados) se ubican en la base, formando una rama externa (*outgroup*) en relación a los vertebrados. Esto es así ya que se decidió utilizar la rama perteneciente a los equinodermos como raíz del árbol consenso. Es interesante que la secuencia de Furry de la ascidia *S. clava* aparece como la

más cercana a los vertebrados, lo que concuerda con estudios que indican que los tunicados son el grupo hermano más cercanos a los vertebrados (Delsuc et al., 2006).

Entre los vertebrados con mandíbula (Gnathostomata), se observa una clara división en dos subgrupos que agrupan a las proteínas *Fry* por un lado y a las proteínas *Fry-like* por el otro. Eso indica que estos parálogos surgieron al inicio de la evolución de los vertebrados, antes de la divergencia entre peces cartilaginosos (Chondrichthyes) y peces óseos (Osteichthyes). Así, el origen de los genes *Fry* y *Fry-like* coincide con las dos duplicaciones genómicas que ocurrieron temprano en la historia evolutiva de los vertebrados. En los peces teleósteos, *D. rerio* y *O. latipes*, que poseen tres genes *Furry*, se observa que los parálogos de *Fry* se encuentran duplicados (*Frya* y *Fryb*), mientras que *Fry-like* es de copia única. Como esperado, los homeólogos de *Fry* y *Fry-like* de *X. laevis* (S y L) son muy cercanos en el árbol (**Figura 5**).

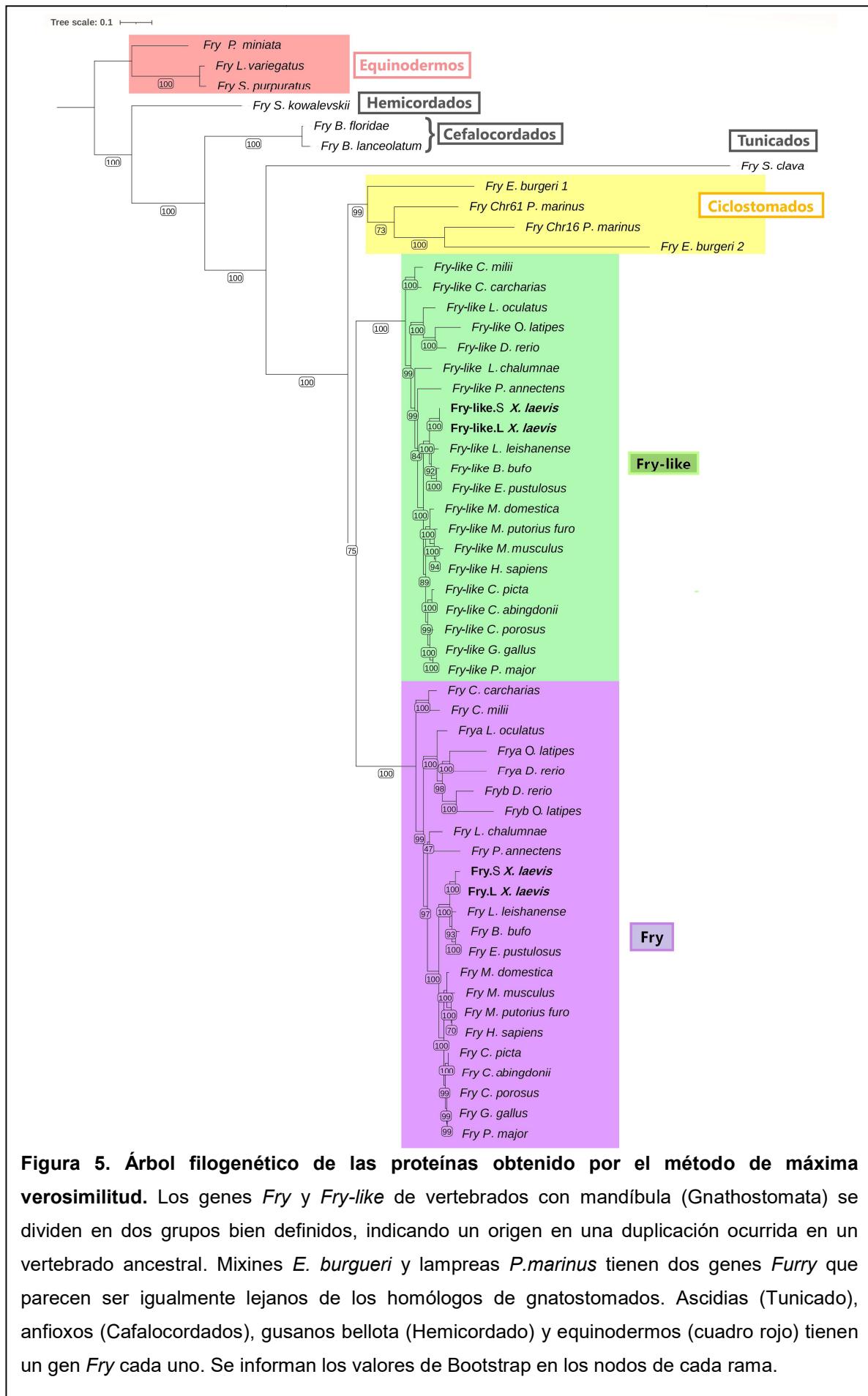


Figura 5. Árbol filogenético de las proteínas obtenido por el método de máxima verosimilitud. Los genes *Fry* y *Fry-like* de vertebrados con mandíbula (Gnathostomata) se dividen en dos grupos bien definidos, indicando un origen en una duplicación ocurrida en un vertebrado ancestral. Mixines *E. burgueri* y lampreas *P. marinus* tienen dos genes *Furry* que parecen ser igualmente lejanos de los homólogos de gnatostomados. Ascidias (Tunicado), anfioxos (Cefalocordados), gusanos bellota (Hemicordado) y equinodermos (cuadro rojo) tienen un gen *Fry* cada uno. Se informan los valores de Bootstrap en los nodos de cada rama.

Las secuencias de Furry de ciclostomados (Cyclostomata) aparecen todas juntas en una rama con 99% de bootstrap (**Figura 5**). La topología parece indicar además que, en los ciclostomados, hubo una duplicación de los genes *Furry* antes de la divergencia entre las lampreas y mixines. Estudios recientes con los genomas completos de ciclostomados muestran que la primera duplicación genómica en los vertebrados (1R) ocurrió antes de la divergencia entre ciclostomados y demás vertebrados, mientras que la segunda duplicación (2R) ocurrió después (Marletaz et al., 2024; Yu et al., 2024). Como la rama de los ciclostomados aparece en la base de las secuencias de *Fry* y *Fry-like* de vertebrados con mandíbula, eso indicaría, en principio, que la duplicación que originó *Fry* y *Fry-like* fue la 2R (**Figura 5**). Datos de sintenia parecen contradecir esa observación y apuntan a 1R como la duplicación de origen de *Fry* y *Fry-like* (ver abajo).

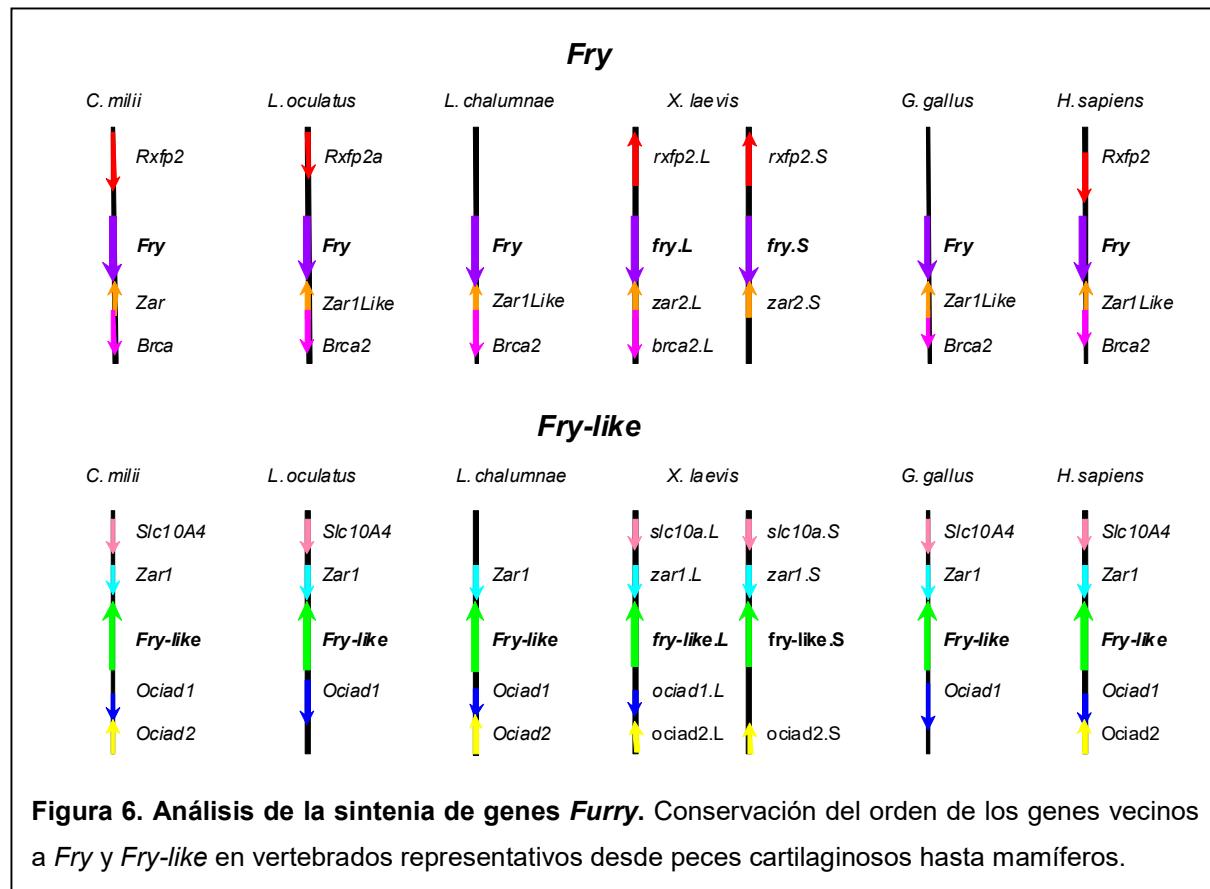
4. 2. Sintenia de los genes *Fry* y *Fry-like* en vertebrados

El orden de los genes (sintenia) alrededor de *Fry* y *Fry-like* fue comparado manualmente en algunas especies clave de vertebrados con el objetivo de determinar el grado de conservación del vecindario genómico y confirmar los resultados del árbol filogenético de la **Figura 5**. En general, es posible reconocer las relaciones filogenéticas entre taxones por la presencia de sintenia conservada. Sin embargo, la falta de sintenia conservada no indica necesariamente su relación filogenéticamente distante (Makiuchi et al., 2008). Estos análisis complementan la filogenia de las proteínas y pueden permitir trazar con más precisión el origen común de los genes en el genoma de un ancestro no-vertebrado.

A partir del genoma de *X. laevis* (xenbase.org), se identificaron los genes vecinos de *fry* y *fry-like*. Luego, se los comparó con los genes presentes alrededor de *Fry* y *Fry-like* en las especies *H. sapiens* (mamífero), *G. gallus* (ave), *L. chalumnae* (celacanto), *L. oculatus* (pez de aleta rayada no-teleosteo) y *C. milii* (pez cartilaginoso) en la base de datos Ensembl. En el caso de no encontrar los genes anotados por nombre, se realizó una búsqueda con BLASTP de la secuencia encontrada contra el genoma de *X. laevis* con el fin de identificar si se trataba del gen de interés.

Se observó una conservación de la sintenia de los genes vecinos a *Fry* y *Fry-like*, no solo en la presencia de los genes sino en el orden de los mismos y dirección de la transcripción en la mayoría de las especies (**Figura 6**). En todas las especies, los genes *Rxfp2* y *Brca2* están cerca de *Fry*, mientras que *Slc10a4* y *Oacid1/2* están cerca de *Fry-like*, lo que concuerda con la topología del árbol filogenético. Por otro lado, se evidencia la presencia de los parálogos de los genes *Zar* (*Zygote-arrest*; *Zar1/2*) inmediatamente al lado de los genes *Fry* y *Fry-like* de todos los vertebrados analizados (**Figura 6**). Eso sugiere que

los genes ancestros de *Furry* y *Zar* se encontraban ligados previo a la duplicación genómica que dio origen a los parálogos actuales.



Por otra parte, se realizó el rastreo de la ubicación de *Fry* y *Fry-like* en cromosomas ancestrales reconstruidos por Simakov et al., (2020). En ese trabajo, los autores comparan la composición génica de los cromosomas del anfioxo *B. floridae* con los genomas de especies de varios vertebrados, entre ellos la rana *Xenopus tropicalis* (*X. tropicalis*), un parente cercano a *X. laevis*. Así, fueron capaces de reconstruir 17 grupos de ligamiento (cromosomas) ancestrales de los cordados, a los que llamaron CLG (*chordate linkage groups*). Los autores muestran la distribución de fragmentos de los CLG en los cromosomas de *L. oculatus*, *G. gallus*, *X. tropicalis* y *H. sapiens*. Los cromosomas de los vertebrados generalmente comprenden uno o más bloques grandes que son: (1) descendientes de un CLG individual o (2) mezclas de dos o tres CLG formados por fusión y posterior reordenamiento. La mayoría de los CLG se encuentran distribuidos en cuatro copias en los vertebrados actuales y otros en tres, lo que apoya la hipótesis de tetraploidización ancestral (1R y 2R) si se admite la pérdida secundaria de cromosomas. En Simakov et al., (2020) también identifican los segmentos derivados de las dos duplicaciones génomicas de la siguiente manera: la primera duplicación (1R) originó para cada cromosoma dos copias, 1 y 2, mientras que la segunda duplicación (2R) originó los cromosomas 1α y 1β por un lado y

2α y 2β por el otro. Por otra parte, estudios comparativos del genoma de dos especies de mixines (*E. burgeri* y *E. atami*) indican que 1R ocurrió antes de la divergencia entre ciclóstomos y vertebrados sin mandíbula, mientras que 2R ocurrió después de la divergencia entre estos dos grupos (Marletaz et al., 2024; Yu et al., 2024).

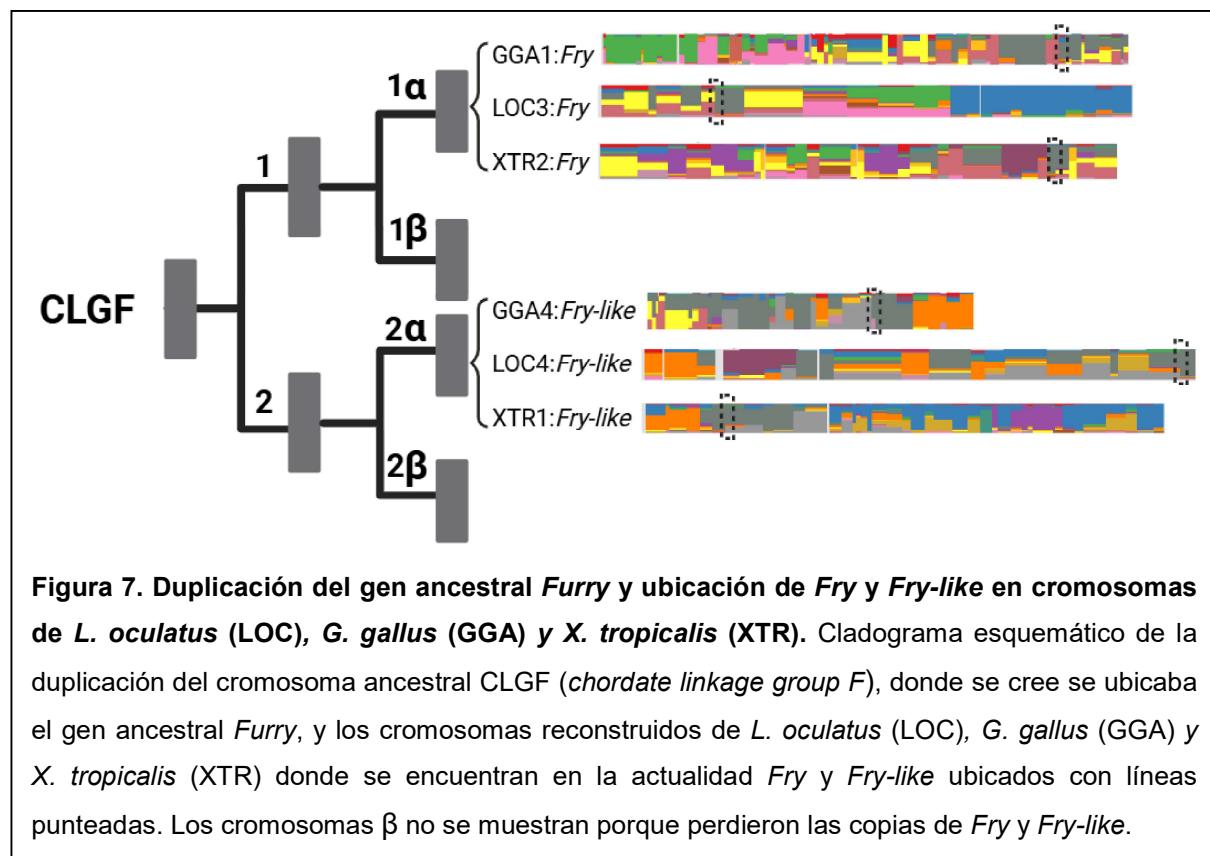


Figura 7. Duplicación del gen ancestral *Furry* y ubicación de *Fry* y *Fry-like* en cromosomas de *L. oculatus* (LOC), *G. gallus* (GGA) y *X. tropicalis* (XTR). Cladograma esquemático de la duplicación del cromosoma ancestral CLGF (*chordate linkage group F*), donde se cree se ubicaba el gen ancestral *Furry*, y los cromosomas reconstruidos de *L. oculatus* (LOC), *G. gallus* (GGA) y *X. tropicalis* (XTR) donde se encuentran en la actualidad *Fry* y *Fry-like* ubicados con líneas punteadas. Los cromosomas β no se muestran porque perdieron las copias de *Fry* y *Fry-like*.

Sabiendo las coordenadas genómicas de *Fry* y *Fry-like* obtenidas en Ensembl, y ubicándolas en los cromosomas reconstruidos de *L. oculatus*, *G. gallus* y *X. tropicalis*, se determinó que el gen ancestral pertenecería al cromosoma F (CLGF). Esto se observa en la **Figura 7**, donde se muestra el cromosoma correspondiente de cada especie y las ubicaciones aproximadas de los genes encerrada en líneas punteadas coinciden con el color gris asignado al CLGF. Por otro lado, en la misma figura se presenta un cladograma que representa la duplicación del CLGF surgiendo las dos primeras copias (1 y 2) que luego sufren una segunda duplicación originando 1 α , 1 β , 2 α y 2 β .

| | 1 α | 1 β | 2 α | 2 β |
|----------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| CLGF | GGA1, LOC3/17, XTR2 | GGA4b, LOC7, XTR8 | GGA4a, LOC4, XTR1 | GGA13, LOC6, XTR3 |
| <i>G. gallus</i> | GGA1:Fry | -- | GGA4:Fry-like | -- |
| <i>L. oculatus</i> | LOC3:Fry | -- | LOC4:Fry-like | -- |
| <i>X. tropicalis</i> | XTR2:Fry | -- | XTR1:Fry-like | -- |

Tabla 5. Ubicación del cromosoma ancestral CLGF en los cromosomas actuales de *L. oculatus* (LOC), *G. gallus* (GGA) y *X. tropicalis* (XTR). Los números 1-2 y α - β hacen referencia a las copias resultantes luego de la primera y segunda duplicación génica, respectivamente. Por debajo se especifica el número del cromosoma en donde se encuentran ubicados los genes *Fry* y *Fry-like* que coinciden con las copias 1 α y 2 α .

El CLGF se encuentra distribuido en *L. oculatus* y la rana en cuatro de sus cromosomas y en la gallina en tres, luego de su duplicación, fusión y posterior reordenamiento. En la **Tabla 5** se muestran los cromosomas de estas especies en donde se encuentran los fragmentos actuales del CLGF y la ubicación de los genes *Furry*. En las tres especies, los genes *Furry* se encuentran en cromosomas derivados de 1 α y 2 α (**Figura 7** y **Tabla 5**). Eso implica que *Fry* y *Fry-like* surgieron en la primera duplicación genómica (1R), que ocurrió en un ancestro de todos los vertebrados como resultado de una autotetraploidización (Nakatani et al., 2021; Simakov et al., 2020).

Los resultados de sintenia contrastan con el árbol filogenético de la **Figura 5**. En el árbol, las ramas de *Fry* y *Fry-like* de vertebrados gnatostomados surgen después de la divergencia de ciclóstomos, lo que apunta a 2R como la duplicación genómica que dio origen a estos parálogos, mientras que la sintenia y mapeo apuntan a 1R. La razón de esa discrepancia puede estar relacionada con que la divergencia entre los linajes de ciclóstomos y gnatostomados ocurrió muy rápidamente después de 1R, lo que puede haber hecho que la divergencia entre los parálogos haya ocurrido después de la divergencia de los linajes. De hecho, 1R fue un evento de autotetraploidización (Nakatani et al., 2021; Simakov et al., 2020) y la rediploidización después de una autotetraploidización, cuando los cromosomas duplicados son inicialmente idénticos en secuencia, es muy lenta (Furlong & Holland, 2002; Redmond et al., 2023; Robertson et al., 2017).

4. 3. Estudio de la expresión de *fry* y *fry-like* en *X. laevis*

Para realizar un análisis comparativo de la distribución espacial y temporal de los transcriptos *fry* y *fry-like* en embriones de *X. laevis* se empleó la técnica de hibridación *in situ* (HIS). La sonda empleada para *fry* tiene una longitud de 692 pb e hibrida con la región 3'codificante del ARNm (Espiritu et al., 2018) (**Tabla 1**). Por similitud de secuencias es de esperarse que esta sonda detecte los transcriptos de los subgenomas S y L (**Tabla 2**). La sonda de 400 pb para detectar *fry-like* (*fry-like* 0.4kb) hibrida con la región 3'codificante del ARNm y la región 3'UTR (**Tabla 1**). Por similitud de secuencias se espera que esta sonda únicamente detecte los transcriptos L (**Tabla 2**). El patrón de expresión de los genes se evaluó en oocitos y embriones en estadios representativos de distintas etapas del desarrollo embrionario (st. 3 – st. 35).

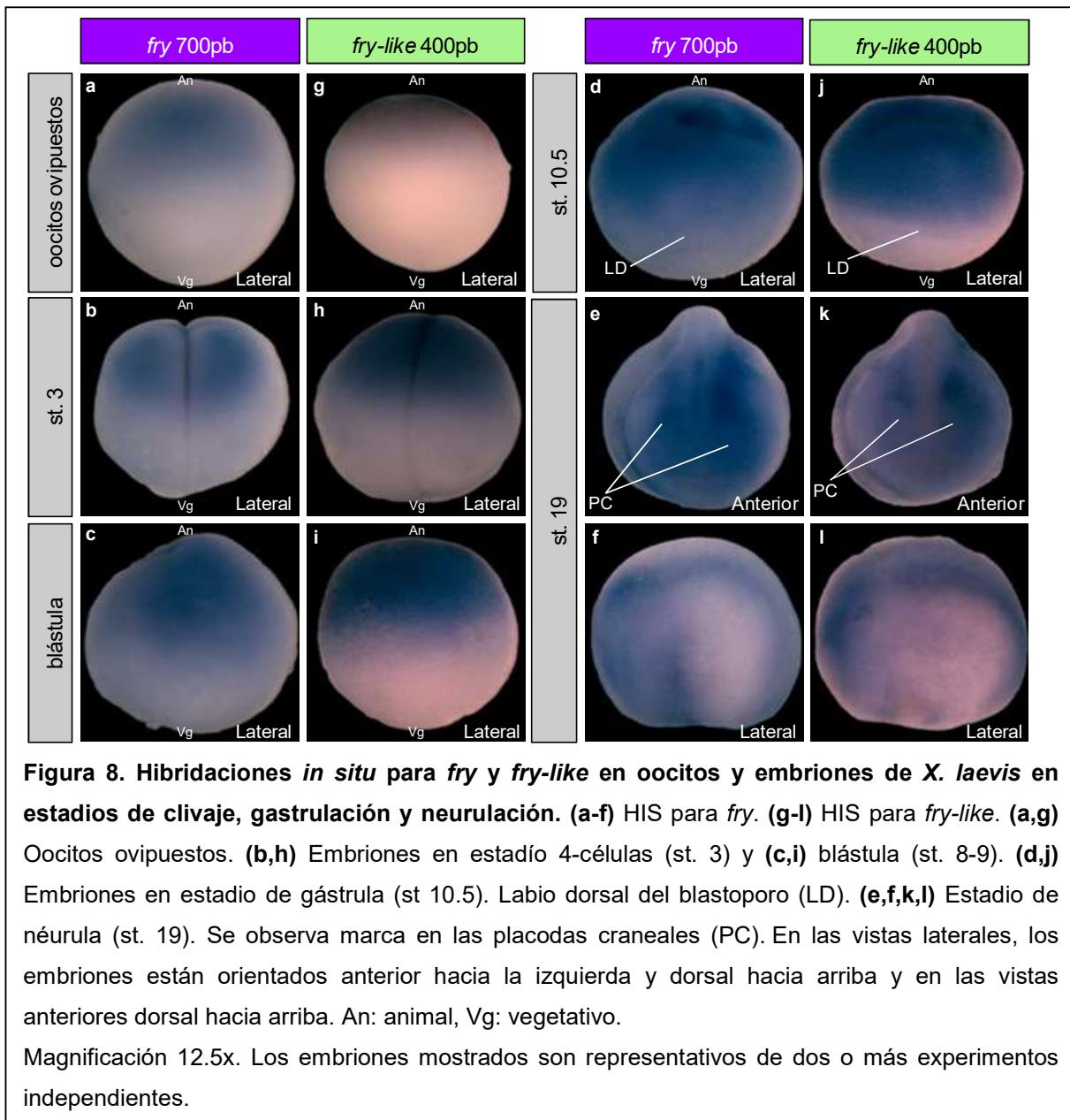
Se utilizaron oocitos ovipuestos en st. VI, ya que se sabe que incluso antes de ser fecundados los mismos presentan ARNm maternos localizados en regiones específicas (Sindelka et al., 2018). Estos oocitos están divididos en dos polos o hemisferios determinados durante la oogénesis. El polo animal que presenta pigmentación oscura, donde se ubican la mayoría de los organelas y la vesícula germinal (núcleo del oocito) y el polo vegetativo sin pigmento, donde se acumula la mayoría del material nutriente (vitelo) del embrión. Además, presentan gradientes de determinantes maternos distribuidos en el eje animal-vegetativo que especifican la formación de las capas germinales antes de la activación del genoma embrionario en st. 8. En oocitos ovipuestos en st. VI, se detectó la presencia de los ARNm de *fry* y *fry-like* en el polo animal (**Figura 8a, i**). Mediante análisis de transcriptómica y proteómica, se ha establecido que ARNm enriquecidos en esta región codifican en su mayoría para factores de transcripción, traducción y reguladores de la localización de proteínas (Sindelka et al., 2018). Es interesante que, mediante el análisis de la ontología génica, los transcriptos de *X. laevis* enriquecidos en el polo animal se encontraron en categorías asociadas con la localización de proteínas y la transducción de señales de GTPasa (Claußen et al., 2015), siendo estas dos de las funciones principales descritas para Fry (Nagai & Mizuno, 2014).

Al inicio del desarrollo embrionario, en el estadio de clivaje 4-células (st. 3) (**Figura 3**), la localización de ARNm y proteínas maternas en las distintas blastómeras, determina el posicionamiento de las futuras estructuras del embrión. En este estadio, ambos ARNm *fry* y *fry-like* muestran un patrón de localización animal expandiéndose hacia la región marginal o ecuatorial del embrión (**Figura 8b,i**).

En estadio de blástula (st. 8-9) se activa el genoma del embrión y muchos ARNm y proteínas maternas son degradadas, este proceso es denominado transición de blástula media (Gilbert & Barresi, 2020). En este estadio, los ARNm de *fry* y *fry-like* continúan teniendo localización animal y marginal (**Figura 8c,j**).

En las gástrulas (st. 10.5-12) (**Figura 3**), por movimientos gastrulatorios, las células comienzan a migrar y ocupan su destino final en el embrión en desarrollo quedando establecidas las futuras capas germinales: endodermo, ectodermo y mesodermo (Gilbert & Barresi, 2020). Observamos que la localización de los transcriptos de *fry* y *fry-like* comienza a extenderse desde el polo animal hacia el labio dorsal del blastoporo, es decir, la región meridional del embrión (**Figura 8d,k**). Las células en estas regiones contribuirán a tejidos del ectodermo y mesodermo.

En la neurulación (st. 13-19) (**Figura 3**); comienza a observarse el desarrollo del tubo neural y hacia el final de esta etapa, el embrión comienza a adoptar una forma más alargada. En embriones en estadio st. 19, detectamos ambos transcriptos en la regióncefálica y dorsal del embrión (**Figura 8e,f,l,m**).



El estadio de brote caudal se inicia en st. 25-26 y finaliza en st. 32-33 del desarrollo (**Figura 3**). En este estadio, el embrión continúa alargándose y marca un importante periodo en el desarrollo caracterizado por el rápido crecimiento y diferenciación de varios tejidos como los somitos y órganos como el corazón y el riñón pronéfrico (Nieuwkoop & Faber, 1994). Además, se distinguen estructuras como la notocorda, los ojos y la glándula de cemento (**Figura 9**). En el st. 25 la localización de transcritos de *fry* se detectó en estructuras como en la región cefálica, la vesícula óptica, la vesícula biliar y la notocorda (**Figura 9a-a''**). Por otro lado, en este estadio no se detectó la presencia de transcritos de *fry-like* en la notocorda y la marcación en la vesícula biliar se observó con mayor intensidad que para *fry* (**Figura 9a-a'',b-b''**). En los st. 29-30, ya son visibles las vesículas ópticas y en el riñón pronéfrico se distinguen distintas estructuras (ej. nefrostomas, túbulo proximal). Los

transcriptos de *fry* y *fry-like* permanecen en la regióncefálica, el corazón, el ojo, la vesícula ótica y la vesícula biliar, cuya marca continúa siendo más intensa en *fry-like*. Es interesante que a diferencia de *fry-like*, *fry* es detectado en la notocorda y el riñón pronéfrico (**Figura 9 c-c'',d-d''**), mientras que *fry-like* está claramente presente en el tubo neural y no *fry*.

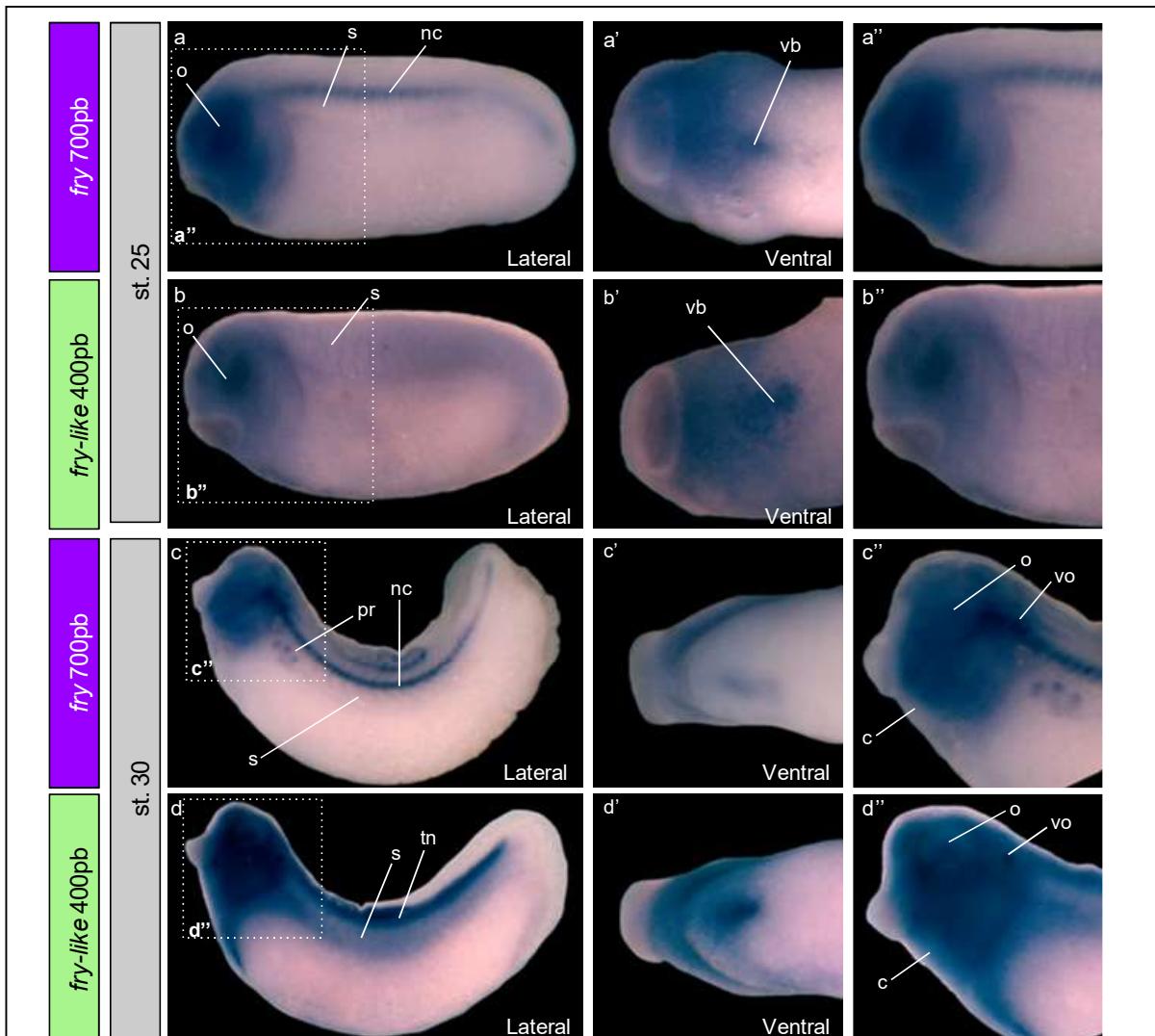


Figura 9. Hibridaciones *in situ* para *fry* y *fry-like* en embriones de *X. laevis* en estadios de brote caudal. (a-a'',c-c'') HIS para *fry*. (b-b'',d-d'') HIS para *fry-like*. (a-a'',b-b'') Estadio brote caudal temprano St. 25. (a) Vista lateral (a') Vista ventral magnificada del embrión en (a). (a'') Magnificación de (a). (b) Vista lateral (b') Vista ventral magnificada del embrión en (b). (b'') Magnificación de (b). (c-c'',d-d'') Estadio brote caudal tardío St. 30. (c) Vista lateral (c') Vista ventral magnificada del embrión en (c). (c'') Magnificación de (c). (d) Vista lateral (d') Vista ventral magnificada del embrión en (d). (d'') Magnificación de (d). Notocorda (nc), tubo neural (tn), somitos (s), ojo (o), vesícula biliar (vb), vesícula ótica (vo), y pronefros (pr).

Magnificación: 12.5x (a-d), 20x (a'-d') y 32x (a''-d''). Los embriones mostrados son representativos de dos o más experimentos independientes.

El estadio de renacuajo comienza a continuación del estadio de brote caudal alrededor de st. 35 (**Figura 3**). En este estadio es cuando el corazón adquiere su forma característica de S y se distingue el ventrículo de la aurícula, el riñón pronéfrico se une con el divertículo hepático y el embrión muestra la mayor transición comportamental al deshacerse de la membrana vitelina y convertirse en larvas nadadoras (Nieuwkoop & Faber, 1994). En los embriones *in toto*, se observa la presencia de ambos transcriptos en el corazón, los ojos, la vesícula ótica, la vesícula biliar y la región cefálica en general. En este estadio, la vesícula biliar continúa con marcación más intensa de *fry-like* en comparación con *fry*. En la notocorda y en el pronefros solo se observa marca para *fry* (**Figura 10a-a'', e-e''**), a pesar de esto, *fry-like* se expresaría en la notocorda en este estadio de desarrollo (ver **Figura 11g,n**). Luego del procedimiento para HIS, los embriones en st. 35 fueron incluidos en parafina y procesados para cortes histológicos. En los cortes se observó una expresión uniforme de *fry* y *fry-like* en el corazón (**Figura 10b,b',f,f'**). Para *fry*, se encontró marcación en la notocorda, en el glomus y en los túbulos proximales del pronefros, mientras que en los cortes de *fry-like* no se detectó marca en la notocorda y muy poca marcación en los túbulos proximales del pronefros (**Figura 10c-c'', g-g''**). A diferencia de *fry*, *fry-like* es detectado en el tubo neural (**Figura 10e**). En concordancia con las imágenes de HIS de embriones *in toto*, la vesícula biliar presenta una marca más fuerte en cortes histológicos de *fry-like* y más tenue en *fry* (**Figura 10d-d', h-h'**).

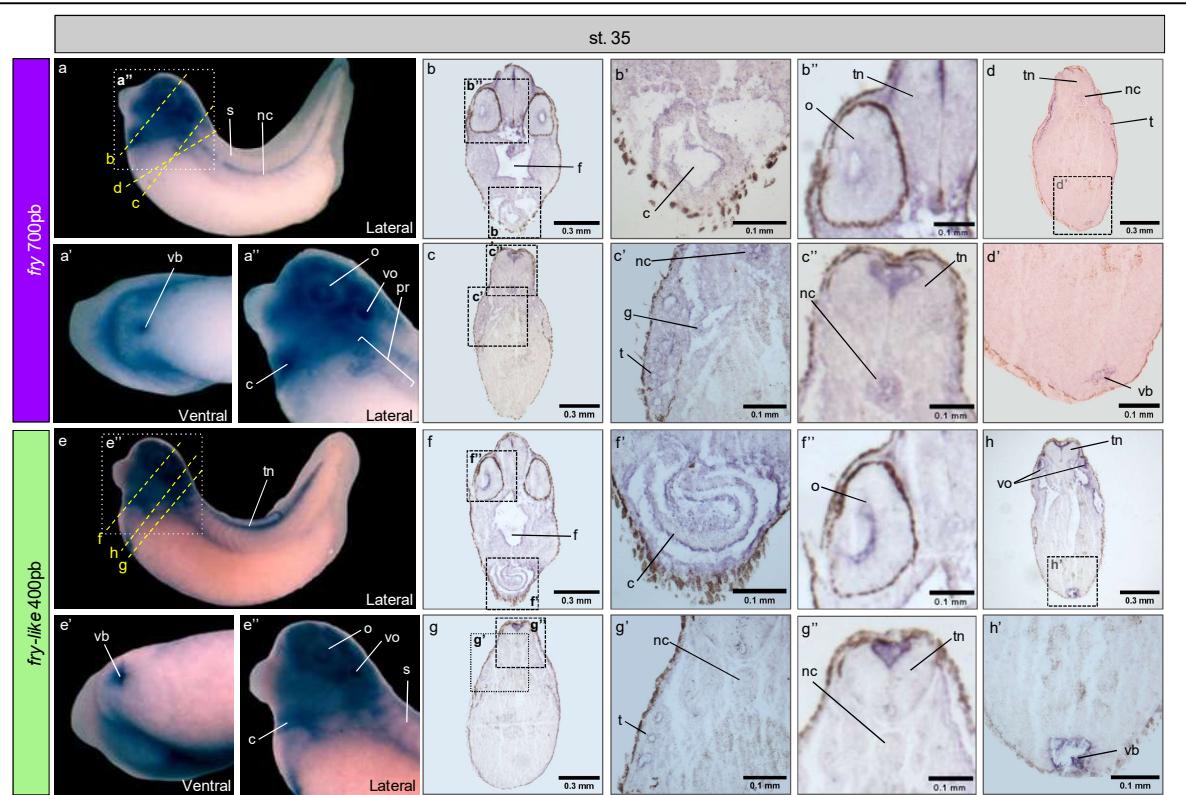


Figura 10. Hibridación *in situ* para *fry* y *fry-like* en renacuajos de *X. laevis*. (a-d') HIS para *fry*. (a) Vista lateral (a') Vista ventral. (a'') Magnificación del recuadro en (a). (b,c,d) Cortes histológicos, dorsal hacia arriba. Las líneas punteadas en (a) indican la posición aproximada del corte. (b') Magnificación de (b), expresión de *fry* en el corazón. (b'') Magnificación de (b), expresión de *fry* en el ojo. (c') Magnificación de (c), expresión de *fry* en el glomus y el tubulo proximal. (c'') Magnificación de (c), expresión de *fry* en el tubo neural. (d') Magnificación de (d), expresión de *fry* en la vesícula biliar. (e-h') HIS para *fry-like*. (e') Vista ventral. (e'') Magnificación de (e). (f,g,h) Cortes histológicos. Las líneas punteadas en (e) indican la posición aproximada del corte. (f') Magnificación de (f), expresión de *fry-like* en el corazón. (f'') Magnificación de (f), expresión de *fry-like* en el ojo. (g') Magnificación de (g), expresión de *fry-like* en el tubulo proximal. (g'') Magnificación de (g), expresión de *fry-like* en el tubo neural. Expresión en la vesícula biliar. (h') Magnificación de (h), expresión en la vesícula biliar. Notocorda (nc), ojos (o), vesículas óticas (vo), vesícula biliar (vb), corazón (c), somitos (s), pronefros (pr), tubo neural (tn), ojo (o), faringe (f), tubulo proximal (t), glomus (g), vesícula biliar (vb).

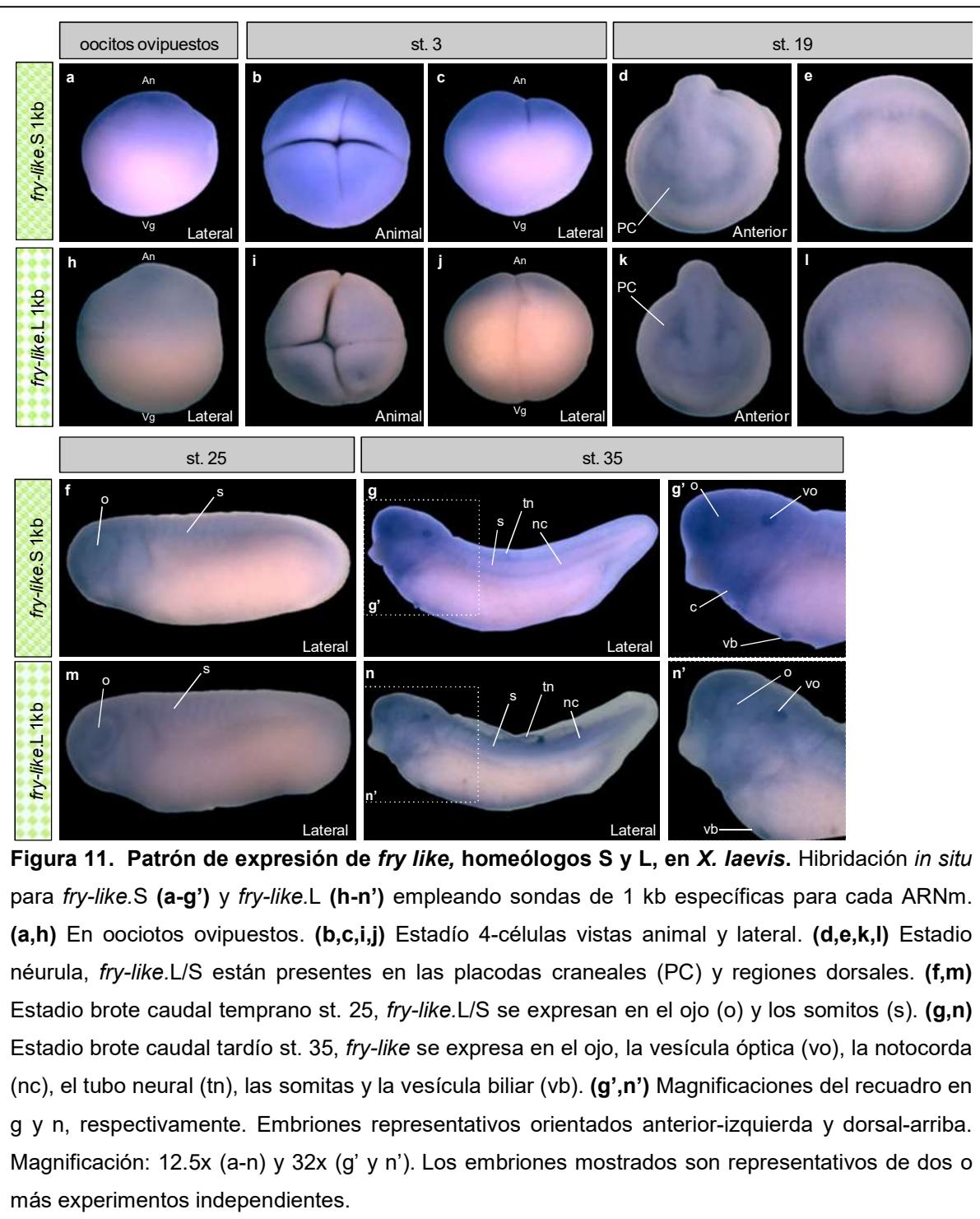
Magnificación 12.5x (a,e), 20x (a',e'), 32x (a'',e''), 40x (b, c, f, g, h), 100x (d y d'), 200x (b', c', f', g', h'). Los embriones mostrados son representativos de tres o más experimentos independientes.

4. 4. Origen de la poliploidía en *X. laevis* y detección de los homeólogos *fry-like.S* y *fry-like.L*

Como se mencionó anteriormente, la rana *X. laevis* es una especie allotetraploide que surgió hace ~17 millones de años debido al apareamiento de dos especies emparentadas que habrían divergido hace ~34 millones de años (Session et al., 2016). La allotetraploidía caracteriza este genoma, ya que cuenta con dos subgenomas denominados L (*longer*) el S (*shorter*). La naturaleza tetraploide de *Xenopus*, le permite conservar los parálogos *fry* y *fry-like*, que a su vez cuentan con sus respectivos homeólogos, es decir pares de genes que dentro de la misma especie se originaron por un evento de hibridación entre especies (Kuzmin et al., 2021).

Dadas estas características, el genoma de *X. laevis* es ideal para estudiar el resultado de un evento de duplicación genómica reciente. Con el objetivo de determinar si existe un patrón de expresión diferencial para *fry* y *fry-like* entre el subgenoma S y L, realizamos HIS con sondas que reconocen específicamente uno u otro ARNm (**Tabla 1**), empleando oocitos ovipuestos y embriones en distintos estadios del desarrollo.

Lamentablemente, en las HIS para *fry.S* y *fry.L* con sondas que reconocían cada homeólogo no se obtuvo marcación específica (resultados no mostrados). Por otro lado, se observó un enriquecimiento tanto de *fry-like.S* como de *fry-like.L* en el polo animal de oocitos ovipuestos en st. VI (**Figura 11a,b**). En el estadio de 4 células, la expresión de *fry-like* se mantiene en el polo animal del embrión, se distribuye de manera homogénea en las cuatro blastómeras y tampoco se observan diferencias en los patrones de expresión en este estadio (**Figura 11b,c,i,j**). En néurulas, la distribución espacial de los transcriptos *fry-like.S* y *fry-like.L* se desplaza hacia la región dorsal y anterior del embrión (**Figura 11d,e,k,l**). La expresión de *fry-like.S/L* en st. 25 se observa en los somitos, la vesícula óptica y la regióncefálica en general (**Figura 11f,m**). Por último, en st. 35 se detectaron transcriptos de *fry-like.S/L* en la vesícula óptica, el corazón, la vesícula óptica, la vesícula biliar, los somitos, la regióncefálica y la notocorda. Esta última, a diferencia del resto se observa con mayor intensidad en *fry-like.S* (**Figura 11g,g',n,n'**). Además se detectó la presencia del ARNm de ambos homeólogos en el tubo neural, aunque la marca para *fry-like.S* es más débil que para *fry-like.L* (**Figura 11g,n**). Estos experimentos muestran un patrón de expresión similar por ambos homeólogos del gen *fry-like* en los distintos estadios de embriones de *X. laevis*.



5. Discusión

5. 1. Origen de los parálogos *Fry* y *Fry-like* en vertebrados

El origen evolutivo de los vertebrados estuvo marcado por una serie de duplicaciones de todo el genoma que generaron un aumento de la complejidad genética de ese grupo y, posiblemente, contribuyeron a la complejidad estructural y funcional de los vertebrados. Estas duplicaciones del genoma originaron un conjunto de genes parálogos específicos de vertebrados, que tienden a poseer dos, tres o cuatro genes ortólogos a genes de copia única presentes en protostomados y deuterostomados invertebrados (Dehal & Boore, 2005; Furlong & Holland, 2002). Según análisis comparativos de sintenia entre vertebrados e invertebrados, se infiere que la primera duplicación de todo el genoma (1R) ocurrió en el ancestro común a todos los vertebrados por medio de la autotetraploidización a principios del Cámbrico, mientras que la segunda duplicación (2R) ocurrió en el linaje de los vertebrados con mandíbula, a través de la allotetraploidización, previo a la divergencia de los peces cartilaginosos y peces óseos, en el Cámbrico tardío (Marletaz et al., 2024; Simakov et al., 2020). A su vez, el linaje de los peces sin mandíbula (ciclóstomos) tuvo su segunda duplicación específica del linaje también por medio de la autotetraploidización (Yu et al., 2024).

Mientras que en invertebrados como la mosca de la fruta, nemátodos, y levaduras se han reportado la existencia de un solo gen *Furry* (Cong et al., 2001; Gallegos & Bargmann, 2004; Hirata et al., 2002), los genomas de vertebrados poseen al menos dos genes de la familia *Furry* – *Fry* y *Fry-like* –. La existencia de dos o más parálogos de genes *Furry* en vertebrados sugiere un origen en las duplicaciones genómicas ancestrales. Sin embargo, aun no se había estudiado la relación y presencia de estos parálogos en la mayoría de vertebrados, ni tampoco su origen evolutivo, es decir, a partir de cuál de las dos duplicaciones genómicas surgieron.

Con esto en mente, se llevó a cabo un análisis filogenético de las proteínas *Furry* con el método de máxima verosimilitud utilizando las secuencias aminoacídicas de especies de todos los grupos de vertebrados y, además, equinodermos, hemicordados, cefalocordados y tunicados, encontradas en bases de datos para la confección de un árbol filogenético. También se analizó la sintenia alrededor de los genes en un reducido grupo de vertebrados con el fin de confirmar los resultados obtenidos a partir del análisis filogenético.

La topología obtenida en el árbol filogenético concuerda con las relaciones filogenéticas entre las especies de vertebrados e invertebrados seleccionadas (**Figura 5**). En general, los valores de bootstrap son altos, lo que indica la robustez del árbol obtenido. Según este análisis, los parálogos *Fry* y *Fry-like* habrían sido el resultado de la segunda

duplicación genómica (2R), específica del linaje de los peces con mandíbula, dejando de lado a los agnatos los cuales poseen también dos copias del gen *Furry* que habrían surgido debido a una duplicación específica en su linaje (CR). Por otro lado, el análisis de la sintenia y el rastreo de los genes en los cromosomas ancestrales reconstruidos (Sacerdot et al., 2018; Simakov et al., 2020), reveló que los parálogos *Fry* y *Fry-like* del pez lepisósteo *L. oculatus*, la rana *X. tropicalis* y la gallina *G. gallus* se ubican todos en regiones cromosómicas derivadas de la primera duplicación genómica común a los vertebrados (1R). Esto se evidencia claramente en el cladograma de la **Figura 7** y en la **Tabla 5**. Las copias rastreadas de *Fry* y *Fry-like* provienen de la 1R, denominadas 1-2, mientras que de la segunda duplicación solo se conservaron las copias 1 α y 2 α , perdiéndose las copias 1 β y 2 β originarias de la 2R.

Así, tenemos dos resultados aparentemente contradictorios: mientras que el análisis filogenético apunta a que *Fry* y *Fry-like* surgieron en 2R, el análisis de sintenia y mapeo de segmentos cromosómicos ancestrales apunta a 1R. Como se mencionó anteriormente, se piensa que la 1R ocurrió en el ancestro vertebrado a través de una autotetraploidización (Nakatani et al., 2021; Simakov et al., 2020). Este tipo de tetraploidizaciones se caracterizan por atravesar una rediploidización lenta, debido a la posibilidad del apareamiento entre cuatro cromosomas homólogos (Furlong & Holland, 2002; Otto, 2007). De hecho, la reploidización completa puede tardar decenas de millones de años o más, como visto en salmonidos (Robertson et al., 2017) y en peces no-teleósteos del grupo Acipenseriformes (Redmond et al., 2023). En cambio, la 2R se debió a una alotetraploidización, resultado de la hibridación de dos individuos parcialmente rediploidizados (Nakatani et al., 2021; Simakov et al., 2020).

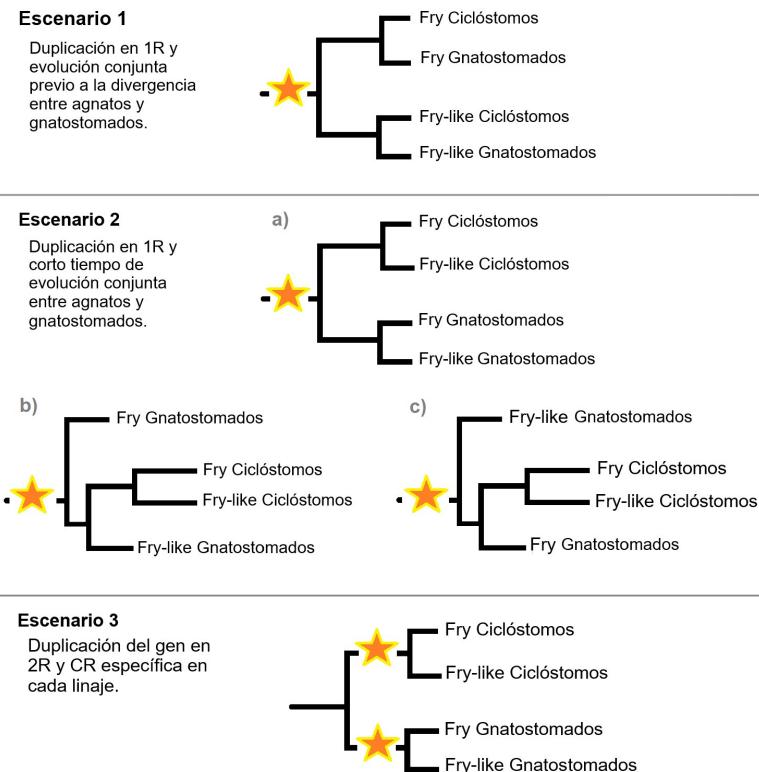


Figura 12. Topologías filogenéticas esperadas de *Furry* según la duplicación del gen ancestral con respecto a las WGD en vertebrados. Escenario 1: Topología esperada bajo la hipótesis de la duplicación del gen ancestral a partir de la 1R común a todos los vertebrados. Escenario 2: a) Topología obtenida a partir del análisis filogenético en el 75% de los árboles. b) Topología obtenida dentro del 25% de los árboles a partir del análisis filogenético. c) Topología obtenida dentro del 25% de los árboles a partir del análisis filogenético. Escenario 3: Topología esperada en el caso en donde la duplicación del gen ancestral fuera es el resultado de las duplicaciones específicas de los linajes de Ciclostomos y Gnatostomados, eventos independientes.

Si los parálogos *Fry* y *Fry-like* se hubieran originado en 1R, se esperaría que, en el árbol filogenético, las secuencias de los ciclostomos estuvieran dentro de las ramas de *Fry* y *Fry-like* de gnatostomos (**Figura 12, Escenario 1**). Esto no se observa en ninguno de los 100 árboles simulados por bootstrap, ya que las ramas de *Fry* (violeta), *Fry-like* (verde) y ciclostómicos (amarillo) se presentan separados con esa topología en el 100% de los árboles, como en el consenso de la **Figura 5**. En un 25% de los árboles, los parálogos de los vertebrados con mandíbulas no resultaron como grupos hermanos, sino que se emparentaron con las secuencias de los ciclostomos (**Figura 12 y datos no mostrados, Escenario 2b-c**). El árbol filogenético consenso, por otro lado, sugiere que los parálogos de *Furry* en ciclostomos y gnatostomos surgieron a partir de duplicaciones específicas en cada linaje (**Figura 12, Escenario 3**).

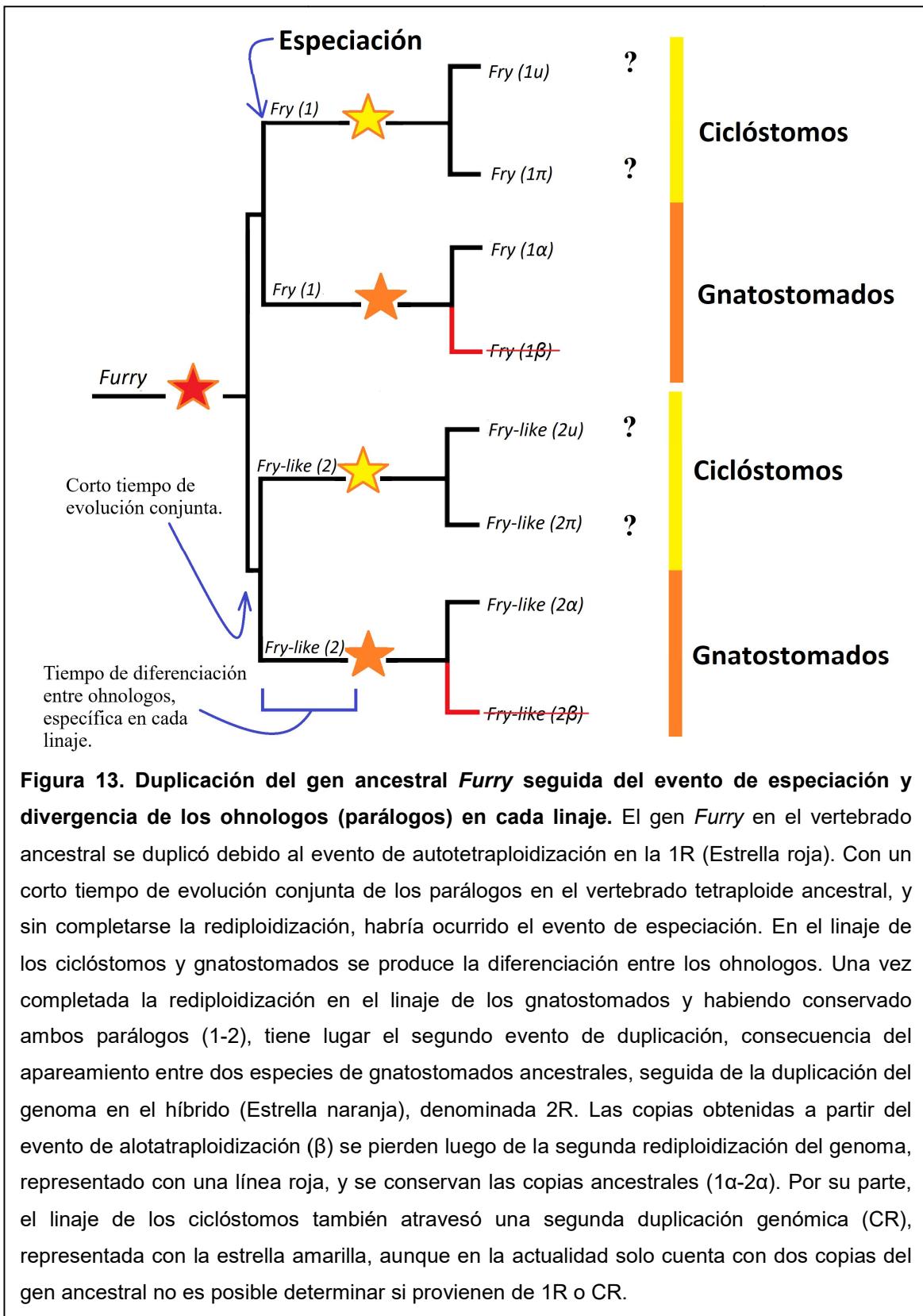


Figura 13. Duplicación del gen ancestral *Furry* seguida del evento de especiación y divergencia de los ohnologos (parálogos) en cada linaje. El gen *Furry* en el vertebrado ancestral se duplicó debido al evento de autotetraploidización en la 1R (Estrella roja). Con un corto tiempo de evolución conjunta de los parálogos en el vertebrado tetraploide ancestral, y sin completarse la rediploidización, habría ocurrido el evento de especiación. En el linaje de los ciclostomos y gnatostomados se produce la diferenciación entre los ohnologos. Una vez completada la rediploidización en el linaje de los gnatostomados y habiendo conservado ambos parálogos (1-2), tiene lugar el segundo evento de duplicación, consecuencia del apareamiento entre dos especies de gnatostomados ancestrales, seguida de la duplicación del genoma en el híbrido (Estrella naranja), denominada 2R. Las copias obtenidas a partir del evento de allotraploidización (β) se pierden luego de la segunda rediploidización del genoma, representado con una línea roja, y se conservan las copias ancestrales (1α - 2α). Por su parte, el linaje de los ciclostomos también atravesó una segunda duplicación genómica (CR), representada con la estrella amarilla, aunque en la actualidad solo cuenta con dos copias del gen ancestral no es posible determinar si provienen de 1R o CR.

¿Cómo conciliar estos escenarios contradictorios? Una posible explicación sería que luego de 1R el tiempo de evolución conjunta de la rama común de los vertebrados fue muy corta antes de la divergencia entre los linajes de ciclostomos y gnatostomados. Así, *Fry* y *Fry-like*

like acumularon mutaciones lentamente y sufrieron una resolución tardía (**Figura 13**), lo que genera una topología filogenética errónea que parece indicar que se trata de parálogos que surgieron a partir de duplicaciones específicas en cada linaje (**Figura 12, Escenario 3**).

Contradicciones entre la topología esperada en árboles filogenéticos de genes parálogos y el momento de duplicaciones genómicas son comunes en la literatura. En caso del pez espátula y el esturión, luego de la duplicación genómica en el ancestro común, se dio una rediploidización lenta que comenzó en el ancestro tetraploide y se extendió hasta luego de la divergencia de los linajes. Esto generó que para la mayoría de los genes la resolución de la diploidía fuera específica del linaje (semejante al **Escenario 3 de la Figura 12**), mientras que para una minoría se haya resuelto antes de la especiación (semejante al **Escenario 1 de la Figura 12**), dando indicios erróneos de eventos de duplicación independientes, conclusiones sujetas a los genes bajo estudio (Redmond et al., 2023). Algo semejante se observó en la evolución del genoma de los salmones (Robertson et al., 2017).

A su vez, el genoma de los agnatos se caracteriza por atravesar una serie de pérdidas programadas de fragmentos a lo largo del desarrollo (Nakai et al., 1991, 1995; Nakai & Kohno, 1987; Smith et al., 2009, 2012, 2018), lo que podría incorporar aún más distancia entre las secuencias. Si bien se encontraron dos copias para *Furry* en el genoma de la lamprea y el mixine, no es posible en este caso, afirmar si se trata de la retención de ambas copias obtenidas a partir de la duplicación del gen ancestral en la 1R, con la posterior pérdida de las segundas copias luego de la WGD específica de los ciclostomos (como ocurrió en los gnatostomados) o la retención de una de las copias del gen ancestral luego de la 1R y su posterior duplicación en CR. Además, la robustez de las secuencias por apoyo estadístico en el árbol consenso no fue del 100%, lo que sugiere una ambigüedad en el linaje. Es por ello que en la **Figura 13** se muestran con un signo de interrogación los cuatro genes, ya que no se estudió en profundidad el linaje de los vertebrados sin mandíbulas para dilucidar este interrogante.

5. 2. Expresión de *Fry* y *Fry-like* durante el desarrollo embrionario de vertebrados

Fry microtubule binding protein y *Fry-like transcriptional coactivator* pertenecen a la familia de genes *Furry*, presentes en plantas, levaduras y animales, desde invertebrados como *Drosophila* y nemátodos, hasta mamíferos. Estos genes codifican para proteínas de más de 3000 aminoácidos que funcionan como módulos de interacción de proteínas. En las células, las proteínas de andamiaje o *scaffold* conectan y regulan interacciones entre distintos componentes de vías de señalización promoviendo o inhibiendo, coordinando

así actividades celulares. Los fenotipos de pérdida de función de Fry descriptos inicialmente en invertebrados y levaduras la asocian a procesos celulares esenciales como: polaridad celular, división celular, morfogénesis (Du & Novick, 2002; Emoto et al., 2004; Goto et al., 2010; Hirata et al., 2002; Ikeda et al., 2012; Kanai et al., 2005; Kume et al., 2007). Luego, estudios empleando organismos modelo de vertebrados e invertebrados (rata, ratón, rana y mosca), demostraron la importancia de esta proteína en el desarrollo de distintos órganos y tejidos (Cervino et al., 2021; Emoto et al., 2004; Espiritu et al., 2018; Gallegos & Bargmann, 2004; Goto et al., 2010; Horne-Badovinac et al., 2012; Liu et al., 2019; Ren et al., 2013). Por otro lado, se conoce muy poco sobre los efectos de la pérdida de función del parálogo presente únicamente en vertebrados, Fry-like (Byun et al., 2018; The Deciphering Developmental Disorders Study, 2015).

En el contexto de una WGD, los genes parálogos recientemente duplicados cumplen las mismas funciones y poseen las mismas regiones regulatorias. En aquellos casos en que el producto génico regula mecanismos celulares en forma dosis-dependiente es de esperar que el aumento en la dosis tenga un impacto negativo, tal podría ser el caso de las proteínas de andamiaje Fry y Fry-like. En el proceso de rediploidización, los genes modulan su expresión ya sea repartiendo las funciones ancestrales, perdiendo una copia o disminuyendo los niveles de expresión (Force et al., 1999). A partir de esto, podemos especular que *fry* y *fry-like* se encuentran en equilibrio de dosificación (hipofuncionalización) en aquellos tejidos donde comparten expresión. Por otro lado, en aquellos tejidos donde solo uno de los genes se expresa puede deberse a una “división” de las funciones provenientes del gen ancestral (subfuncionalización) o a la adquisición de una nueva función por uno de ellos (neofuncionalización).

Si bien previamente hemos mostrado de manera general, la localización de los ARNm de *fry* en *X. laevis* (Cervino et al., 2021; Espiritu et al., 2018) y solo en algunos estadios embrionarios la de *fry-like* (Espiritu et al., 2018), nos propusimos realizar un análisis comparativo de la distribución espacial y temporal de los ARNm para investigar el grado de divergencia en el patrón de expresión de estos genes y contribuir a la comprensión de los efectos que resultan de su pérdida de función en el desarrollo de órganos y tejidos de vertebrados.

Del análisis de las hibridaciones *in situ* se concluye que ambos genes tienen expresión materna ya que son detectados en oocitos maduros (St. VI) y en estadios embrionarios previos a la transición de blástula media, cuando se activa el genoma embrionario (**Figura 8a,b,g,h**). Estos resultados son coincidentes con experimentos de ARN-Seq que registran la presencia de ambos transcriptos en oocitos en desarrollo y en estadios embrionarios de clivaje (Session et al., 2016) (www.xenabse.org). Es interesante mencionar se ha descripto que la mayoría de los genes de expresión materna participan en la especificación de las

capas germinales (mesodermo, ectodermo, endodermo) y el establecimiento de los eje embrionarios (dorsal-ventral, anterior-posterior, derecha-izquierda) (Houston, 2012) ambos eventos claves para el normal desarrollo del embrión. En particular para *Fry-like*, la función en estos eventos tempranos no ha sido dilucidada.

Respecto de la distribución espacial, se observa un enriquecimiento de ambos transcriptos en el hemisferio animal, una distribución polarizada que se mantiene en estadios embrionarios de clivaje, blástula y gástrula (**Figura 8 b-d,h-j**). Es posible especular que la localización asimétrica es el resultado de una retención/exclusión regulada a nivel molecular o bien de difusión pasiva de los transcriptos hacia zonas del oocito con menor cantidad de plaquetas vitelinas en el polo animal (Kloc et al., 2001). Esta región del oocito contribuye principalmente a los tejidos ectodérmicos y mesodérmicos del embrión.

A partir de estadios embrionarios de brote caudal (**Figura 9**) se observan diferencias en el patrón de expresión entre *fry* y *fry-like*. En la **Figura 14** se muestra un esquema del patrón de expresión de cada gen en estadio de renacuajo, enfatizando las semajanzas y diferencias observadas. Se evidencia la presencia de ambos transcriptos en estructuras en desarrollo como el corazón, las somitas, las ojos, las vesículas óticas, la vesícula biliar y la regióncefálica en general. Así mismo, se detectó exclusivamente el ARNm de *fry-like* en el tubo neural, y utilizando la sonda *fry-like* 0,4 kb que reconoce solo el transcripto L, no se encontró expresión marcada de *fry-like* en la notocorda, mientras que para *fry-like*.S y *fry* si (**Figuras 9 y 10**).

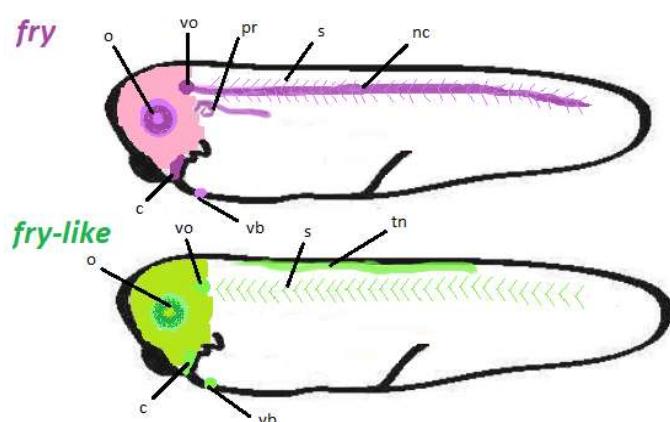


Figura 14. Esquema de expresión de *fry* y *fry-like* en embriones de *X. laevis* en estadio de renacuajo. *fry* (violeta) y *fry-like* (verde) muestran expresión conjunta en la vesícula biliar (vb), los ojos (o), las somitas (s), el corazón (c) y la regióncefálica. Por su parte, *fry* se expresa en el glomus y túbulo pronéfrico (pr) y en la notocorda (nc) mientras que *fry-like* muestra expresión en el tubo neural (tn).

En el riñón en desarrollo, se observa marcación con la sonda de *fry* en el pronefros, específicamente en el glomus, los nefrostomas y el túbulo pronéfrico (**Figura 9c,c'** y **Figura**

10a,a’’). Sin embargo, en cortes histológicos notamos una marca tenue de *fry-like* en el túbulo pronéfrico, sin evidencia de expresión en el glomus (**Figura 10g’**). En concordancia, un estudio previo demuestra que *fry* es necesario en el desarrollo del riñón con un rol temprano en la formación de este órgano ya que su depleción causa la pérdida del primordio de células progenitoras renales (Espiritu et al., 2018). Por otro lado, estudios en ratones muestran expresión de *Fry-like* en tejidos tubulares renales en metanefros de adultos (metanefros), hígado, pulmón y bazo. Los ratones mutantes homocigotas para *Fry-like*, tienen un alto porcentaje de letalidad neonatal y los sobrevivientes mueren antes de cumplir el año a causa de hidronefrosis, sugiriendo que la proteína *Fry-like* sería necesaria también en desarrollo normal y mantenimiento de la función renal (Byun et al., 2018). Además, se ha reportado un caso de anomalía renal (riñón en herradura) en humanos con una variante patogénica de *FRY-LIKE* (Pan et al., 2024). A partir del conjunto de evidencias, se podría hipotetizar que ambas proteínas se complementan en el tiempo. *Fry* actuaría inicialmente en la especificación del primordio renal durante el desarrollo del primer riñón embrionario, mientras que *Fry-like* tendría funciones más tardías, ya sea en el desarrollo del metanefros o en el mantenimiento de la función renal. Estudios funcionales podrían revelar detalles sobre la importancia de cada proteína en la formación de los tres tipos de riñón.

Estudios genéticos en poblaciones humanas han revelado mutaciones patogénicas en los genes *FRY* o *FRY-LIKE* causantes de diversas anomalías congénitas. En humanos, el gen *FRY* ha sido clasificado como un gen asociado a discapacidad intelectual o ARID por sus siglas en inglés, *Autosomal Recessive Intellectual Disability*. Entre las características más frecuentes de los pacientes se destacan desórdenes del espectro autista, ausencia de habla, pérdida de audición, estrabismo e hipertelorismo (Paulraj et al., 2019; Riazuddin et al., 2017; Najmabadi et al., 2011). Por su parte, se han reportado pacientes que presentan mutaciones *de novo* que resultan en la pérdida de función prevista de *FRY-LIKE* (Pan et al., 2024; The Deciphering Developmental Disorders Study, 2015). Los individuos con estas variantes presentan además de discapacidad intelectual y rasgos dismórficos, características clínicas como trastornos del espectro autista, trastorno por déficit de hiperactividad (TDHA), tonicidad muscular débil, convulsiones y epilepsia (Pan et al., 2024). Es interesante que los rasgos dismórficos, la disminución en el tamaño corporal y defectos cardíacos observados en pacientes fueron recapitulados en embriones de zebrafish con pérdida de función de *fry-like* (The Deciphering Developmental Disorders Study, 2015). El ortólogo de *Fry* en especies de invertebrados, como *D. melanogaster* y *C. elegans*, ejerce un importante rol en el armado del mosaico dendrítico, el desarrollo de neuritas y morfología de neuronas (Emoto et al., 2004; Gallegos & Bargmann, 2004; Han et al., 2012; Norkett et al., 2020; Zallen et al., 2000). Mutantes de *fry/sax-2* o *trc/NDR/sax-1* muestran formación de neuritas ectópicas y ramificación excesiva de los campos dendríticos, lo que interfiere en la

correcta interacción entre neuronas. Aunque este aspecto no se ha estudiado aún en vertebrados, podría estar relacionado con los fenotipos observados en humanos a raíz de variantes de *FRY* y *FRY-LIKE*.

Muchos de estos fenotipos en humanos, correspondientes a mutaciones en *FRY* o *FRY-LIKE*, se correlacionan con los sitios de expresión de estos genes durante el desarrollo embrionario de *X. laevis* que describimos en este trabajo (**Figura 14**). Los ojos, el corazón, los somitos, las vesículas óticas y la región cefálica se ven afectados en estos pacientes, presentando afecciones diversas que parecerían no estar relacionadas. La característica polisindrómica sugiere que estas proteínas tienen funciones en múltiples órganos regulando diversos procesos celulares. En conjunto, el estudio de la expresión y los casos reportados de pérdida de función en diferentes vertebrados evidencian la conservación evolutiva y la importancia de los genes *Furry*. El empleo de organismos modelo para investigar las funciones de estas proteínas en los distintos órganos donde se expresan contribuirá a comprender los efectos patogénicos asociados a la pérdida de función de estos genes en humanos.

X. laevis es una especie aloteraploide que cuenta con dos subgenomas (Session et al., 2016). Muchos de sus genes se han conservado como dos copias homeólogas, que en la mayoría de casos sufren activación asimétrica y así conservan los niveles de expresión embrionaria de especies diploides (Phelps et al., 2023). Se han encontrado casos en donde la expresión de los homeólogos ha divergido debido a la incorporación de mutaciones en elementos regulatorios (Ochi et al., 2017). Además se sabe que el subgenoma L es más estable que el subgenoma S (Session et al., 2016), por lo cual podría ocurrir que los homeólogos difieran en su expresión. Como resultado del estudio de la expresión de *fry-like.L* y *fry-like.S* en algunos estadios embrionarios de *Xenopus* no se encontraron diferencias en el patrón de expresión en los tejidos, salvo en los niveles de expresión en la notocorda que se ve claramente marcada para la copia S y no así para la copia L (**Figura 11**). Sería necesario realizar estudios que muestren si existen diferencias en las funciones que cumplen los homeólogos o bien si continúan cumpliendo las mismas funciones y encuentren en equilibrio de dosificación, es decir que la expresión de ambos genes haya disminuido de forma tal que equipare la dosis del gen homólogo en otras especies.

6. Conclusiones Finales

En este trabajo se presentaron evidencias que señalan que los genes parálogos *Fry* y *Fry-like*, presentes en los vertebrados, surgieron a partir de la primera duplicación completa del genoma (1R), atravesada por el ancestro vertebrado en el inicio de la evolución del linaje. Las copias resultantes de la 2R específica de gnatostomados se perdieron secundariamente. Por su parte, el linaje de los ciclóstomos también posee dos copias del gen *Furry*, aunque no se determinó si las mismas fueron retenidas a partir de la 1R o de la CR.

A partir del estudio de la expresión, se demostró que *fry* y *fry-like* tienen expresión materna. Los parálogos comparten algunos tejidos de expresión mientras que en otros han divergido. Se especula que los mismos experimentaron procesos como subfuncionalización, hipofuncionalización o neofuncionalización. Los homeólogos *fry-like*.S/L se expresan en los mismos tejidos, aunque se encontró que en la notocorda y el tubo neural los niveles de expresión difieren entre ellos.

Bibliografía

- Anisimova, M., & Gascuel, O. (2006).** Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.*, 55. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>
- Beltrán González, A. N., Gasulla, J., & Calvo, D. J. (2014).** An intracellular redox sensor for reactive oxygen species at the M3-M4 linker of GABAA $\rho 1$ receptors. *British Journal of Pharmacology*, 171(9), 2291-2299. <https://doi.org/10.1111/bph.12581>
- Birchler, J. A., Bhadra, U., Bhadra, M. P., & Auger, D. L. (2001).** Dosage-dependent gene regulation in multicellular eukaryotes: Implications for dosage compensation, aneuploid syndromes, and quantitative traits. *Developmental Biology*, 234(2), 275-288. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0262>
- Birchler, J. A., & Yang, H. (2022).** The multiple fates of gene duplications: Deletion, hypofunctionalization, subfunctionalization, neofunctionalization, dosage balance constraints, and neutral variation. *The Plant Cell*, 34(7), 2466-2474. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac076>
- Blum, M., & Ott, T. (2018).** Xenopus: An Undervalued Model Organism to Study and Model Human Genetic Disease. *Cells, Tissues, Organs*, 205(5-6), 303-313. <https://doi.org/10.1159/000490898>
- Byun, Y.-S., Kim, E.-K., Araki, K., Yamamura, K., Lee, K., Yoon, W.-K., Won, Y.-S., Kim, H.-C., Choi, K.-C., & Nam, K.-H. (2018).** Fryl deficiency is associated with defective kidney development and function in mice. *Experimental Biology and Medicine*, 243(5), 408-417. <https://doi.org/10.1177/1535370218758249>
- Cervino, A. S., Moretti, B., Stuckenholz, C., Grecco, H. E., Davidson, L. A., & Cirio, M. C. (2021).** *Furry is required for cell movements during gastrulation and functionally interacts with NDR1* | *Scientific Reports*. <https://www.nature.com/articles/s41598-021-86153-x>
- Chain, F. J. J., & Evans, B. J. (2006, abril 28).** *Multiple Mechanisms Promote the Retained Expression of Gene Duplicates in the Tetraploid Frog Xenopus laevis* | *PLOS Genetics*. <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.0020056>
- Chiba, S., Ikeda, M., Katsunuma, K., Ohashi, K., & Mizuno, K. (2009).** MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. *Current Biology: CB*, 19(8), 675-681. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.054>

Claußen, M., Lingner, T., Pommerenke, C., Opitz, L., Salinas, G., & Pieler, T. (2015). Global analysis of asymmetric RNA enrichment in oocytes reveals low conservation between closely related *Xenopus* species. *Molecular Biology of the Cell*, 26(21), 3777-3787. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0115>

Cong, J., Geng, W., He, B., Liu, J., Charlton, J., & Adler, P. N. (2001). The fury gene of *Drosophila* is important for maintaining the integrity of cellular extensions during morphogenesis. *Development* (Cambridge, England), 128(14), 2793-2802. <https://doi.org/10.1242/dev.128.14.2793>

Dehal, P., & Boore, J. L. (2005). Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biology*, 3(10), e314. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030314>

Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrut, D., & Philippe, H. (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*, 439(7079), 965-968. <https://doi.org/10.1038/nature04336>

Du, L.-L., & Novick, P. (2002). Pag1p, a novel protein associated with protein kinase Cbk1p, is required for cell morphogenesis and proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 13(2), 503-514. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-07-0365>

Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*, 136(2), 153-179. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051360203>

Emoto, K., He, Y., Ye, B., Grueber, W. B., Adler, P. N., Jan, L. Y., & Jan, Y.-N. (2004). Control of dendritic branching and tiling by the Tricornered-kinase/Furry signaling pathway in *Drosophila* sensory neurons. *Cell*, 119(2), 245-256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.036>

Espiritu, E. B., Crunk, A. E., Bais, A., Hochbaum, D., Cervino, A. S., Phua, Y. L., Butterworth, M. B., Goto, T., Ho, J., Hukriede, N. A., & Cirio, M. C. (2018). The Lhx1-Ldb1 complex interacts with Furry to regulate microRNA expression during pronephric kidney development. *Scientific Reports*, 8(1), 16029. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34038-x>

Fang, X., Lu, Q., Emoto, K., & Adler, P. N. (2010). The *Drosophila* Fry protein interacts with Trc and is highly mobile in vivo. *BMC Developmental Biology*, 10, 40. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-40>

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>

- Felsenstein, J. (1989).** Mathematics vs. Evolution: Mathematical Evolutionary Theory. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4932), 941-942. <https://doi.org/10.1126/science.246.4932.941>
- 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. <https://doi.org/10.1093/genetics/151.4.1531>
- Furlong, R. F., & Holland, P. W. H. (2002).** Were vertebrates octoploid? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 357(1420), 531-544. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1035>
- Gallegos, M. E., & Bargmann, C. I. (2004).** Mechanosensory neurite termination and tiling depend on SAX-2 and the SAX-1 kinase. *Neuron*, 44(2), 239-249. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.021>
- Gawantka, V., Pollet, N., Delius, H., Vingron, M., Pfister, R., Nitsch, R., Blumenstock, C., & Niehrs, C. (1998).** Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function and provides a global view of embryonic patterning. *Mechanisms of Development*, 77(2), 95-141. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(98\)00115-4](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(98)00115-4)
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2020).** *Developmental Biology 12th edition* (9781605358222)—Textbooks.com. <https://www.textbooks.com/Developmental-Biology-12th-Edition/9781605358222/Michael-JF-Barresi-and-Scott-F-Gilbert.php>
- Goto, T., Fukui, A., Shibuya, H., Keller, R., & Asashima, M. (2010).** Xenopus furry contributes to release of microRNA gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19344-19349. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008954107>
- Guindon, S. (2010).** New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.*, 59. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Han, C., Wang, D., Soba, P., Zhu, S., Lin, X., Jan, L. Y., & Jan, Y.-N. (2012).** Integrins regulate repulsion-mediated dendritic patterning of drosophila sensory neurons by restricting dendrites in a 2D space. *Neuron*, 73(1), 64-78. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.036>
- Hayette, S., Cornillet-Lefebvre, P., Tigaud, I., Struski, S., & Forissier, S. (2005).** *AF4p12, a Human Homologue to the furry Gene of Drosophila, as a Novel MLL Fusion Partner* | Cancer Research | American Association for Cancer Research.

<https://aacrjournals.org/cancerres/article/65/15/6521/518469/AF4p12-a-Human-Homologue-to-the-furry-Gene-of>

He, Y., Fang, X., Emoto, K., Jan, Y.-N., & Adler, P. N. (2005). The tricornered Ser/Thr protein kinase is regulated by phosphorylation and interacts with furry during *Drosophila* wing hair development. *Molecular Biology of the Cell*, 16(2), 689-700. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-09-0828>

Hellsten, U., Harland, R. M., Gilchrist, M. J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., Putnam, N. H., Shu, S., Taher, L., Blitz, I. L., Blumberg, B., Dichmann, D. S., Dubchak, I., Amaya, E., Detter, J. C., Fletcher, R., Gerhard, D. S., Goodstein, D., ... Rokhsar, D. S. (2010). The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5978), 633-636. <https://doi.org/10.1126/science.1183670>

Hirata, D., Kishimoto, N., Suda, M., Sogabe, Y., Nakagawa, S., Yoshida, Y., Sakai, K., Mizunuma, M., Miyakawa, T., Ishiguro, J., & Toda, T. (2002). Fission yeast Mor2/Cps12, a protein similar to *Drosophila* Furry, is essential for cell morphogenesis and its mutation induces Wee1-dependent G(2) delay. *The EMBO Journal*, 21(18), 4863-4874. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf495>

Holland, P. W., Garcia-Fernández, J., Williams, N. A., & Sidow, A. (1994). Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Development (Cambridge, England). Supplement*, 125-133.

Horne-Badovinac, S., Hill, J., Gerlach, G., Menegas, W., & Bilder, D. (2012). A screen for round egg mutants in *Drosophila* identifies tricornered, furry, and misshapen as regulators of egg chamber elongation. *G3 (Bethesda, Md.)*, 2(3), 371-378. <https://doi.org/10.1534/g3.111.001677>

Houston, D. W. (2012). Cortical rotation and messenger RNA localization in *Xenopus* axis formation. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 1(3), 371-388. <https://doi.org/10.1002/wdev.29>

Ikeda, M., Chiba, S., Ohashi, K., & Mizuno, K. (2012). Furry protein promotes aurora A-mediated Polo-like kinase 1 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27670-27681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.378968>

Kanai, Kume, & Miyahara. (2005). *Fission yeast MO25 protein is localized at SPB and septum and is essential for cell morphogenesis*—PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16096637/>

- Kloc, M., Bilinski, S., Chan, A. P., Allen, L. H., Zearfoss, N. R., & Etkin, L. D. (2001).** RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *International Review of Cytology*, 203, 63-91. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(01\)03004-2](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(01)03004-2)
- Kobel, H. R., & Du Pasquier, L. (1986).** Genetics of polyploid *Xenopus*. *Trends in Genetics*, 2, 310-315. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(86\)90286-6](https://doi.org/10.1016/0168-9525(86)90286-6)
- Kume, K., Goshima, T., Miyahara, K., Toda, T., & Hirata, D. (2007).** A method for Pmo25-associated kinase assay in fission yeast: The activity is dependent on two gC kinases Nak1 and Sid1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(2), 615-617. <https://doi.org/10.1271/bbb.60574>
- Kuzmin, E., Taylor, J. S., & Boone, C. (2021).** Retention of duplicated genes in evolution. *Trends in Genetics*, 38(1), 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.06.016>
- Le, S. Q., Lartillot, N., & Gascuel, O. (2008).** Phylogenetic mixture models for proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1512), 3965-3976. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0180>
- Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S., & Gascuel, O. (2019).** NGPhylogeny.fr: New generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W260-W265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>
- Liu, Y., Chen, X., Gong, Z., Zhang, H., Fei, F., Tang, X., Wang, J., Xu, P., Zarbl, H., & Ren, X. (2019).** Fry Is Required for Mammary Gland Development During Pregnant Periods and Affects the Morphology and Growth of Breast Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, 9, 1279. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01279>
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022).** Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W276-W279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>
- Makiuchi, T., Annoura, T., Hashimoto, T., Murata, E., Aoki, T., & Nara, T. (2008).** Evolutionary analysis of synteny and gene fusion for pyrimidine biosynthetic enzymes in Euglenozoa: An extraordinary gap between kinetoplastids and diplomonads. *Protist*, 159(3), 459-470. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2008.02.002>

- Marletaz, Timoshevskaya, Timoshevskiy, Parey, & Simakov, O. (2024, enero 23). The hagfish genome and the evolution of vertebrates | Nature.** <https://www.nature.com/articles/s41586-024-07070-3>
- Nagai, T., Ikeda, M., Chiba, S., Kanno, S.-I., & Mizuno, K. (2013).** Furry promotes acetylation of microtubules in the mitotic spindle by inhibition of SIRT2 tubulin deacetylase. *Journal of cell science*, 126. <https://doi.org/10.1242/jcs.127209>
- Nagai, T., & Mizuno, K. (2014).** Multifaceted roles of Furry proteins in invertebrates and vertebrates. *Journal of Biochemistry*, 155(3), 137-146. <https://doi.org/10.1093/jb/mvu001>
- Najmabadi, Hu, & Garshabi. (2011).** Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders | *Nature*. <https://www.nature.com/articles/nature10423>
- Nakai, Y., & Kohno, S. (1987).** Elimination of the largest chromosome pair during differentiation into somatic cells in the Japanese hagfish, *Myxine garmani* (Cyclostomata, Agnatha). *Cytogenetic and Genome Research*, 45(2), 80-83. <https://doi.org/10.1159/000132434>
- Nakai, Y., Kubota, S., Goto, Y., Ishibashi, T., Davison, W., & Kohno, S. (1995).** Chromosome elimination in three Baltic, south Pacific and north-east Pacific hagfish species. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 3(5), 321-330. <https://doi.org/10.1007/BF00713071>
- Nakai, Y., Kubota, S., & Kohno, S. (1991).** Chromatin diminution and chromosome elimination in four Japanese hagfish species. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 56(3-4), 196-198. <https://doi.org/10.1159/000133087>
- Nakatani, Y., Shingate, P., Ravi, V., Pillai, N. E., Prasad, A., McLysaght, A., & Venkatesh, B. (2021).** Reconstruction of proto-vertebrate, proto-cyclostome and proto-gnathostome genomes provides new insights into early vertebrate evolution. *Nature Communications*, 12(1), 4489. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24573-z>
- Nelson, B., Kurischko, C., Horecka, J., Mody, M., Nair, P., Pratt, L., Zouzman, A., McBroom, L. D. B., Hughes, T. R., Boone, C., & Luca, F. C. (2003).** RAM: A conserved signaling network that regulates Ace2p transcriptional activity and polarized morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 14(9), 3782-3803. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-01-0018>
- Nieuwkoop, P. D., & Faber, J. (1994).** *Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin). A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of*

Metamorphosis. P. D. Nieuwkoop , J. Faber | The Quarterly Review of Biology: Vol 33, No 1.
<https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/402265>

Norkett, R., Del Castillo, U., Lu, W., & Gelfand, V. I. (2020). Ser/Thr kinase Trc controls neurite outgrowth in *Drosophila* by modulating microtubule-microtubule sliding. *eLife*, 9, e52009.
<https://doi.org/10.7554/eLife.52009>

Ochi, H., Suzuki, N., Kawaguchi, A., & Ogino, H. (2017). Asymmetrically reduced expression of *hand1* homeologs involving a single nucleotide substitution in a cis-regulatory element—*ScienceDirect*.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160616304419?via%3Dhub>

Ohno. (1970). *Evolution by Gene Duplication* | *SpringerLink*.
<https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-86659-3>

Orr, H. A. (1990). «Why Polyploidy is Rarer in Animals Than in Plants» Revisited. *The American Naturalist*, 136(6), 759-770. <https://doi.org/10.1086/285130>

Otto, S. P. (2007). The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*, 131(3), 452-462.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.022>

Overbeek, P. A., Gorlov, I. P., Sutherland, R. W., Houston, J. B., Harrison, W. R., Boettger-Tong, H. L., Bishop, C. E., & Agoulnik, A. I. (2001). A transgenic insertion causing cryptorchidism in mice. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 30(1), 26-35. <https://doi.org/10.1002/gene.1029>

Pan, Tao, & Lu. (2024). *De novo variants in FRYL are associated with developmental delay, intellectual disability, and dysmorphic features: The American Journal of Human Genetics*.
[https://www.cell.com/ajhg/abstract/S0002-9297\(24\)00039-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0002929724000399%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/ajhg/abstract/S0002-9297(24)00039-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0002929724000399%3Fshowall%3Dtrue)

Paulraj, Bosworth, & Longhurst. (2019). *A Novel Homozygous Deletion within the FRY Gene Associated with Nonsyndromic Developmental Delay | Cytogenetic and Genome Research | Karger Publishers.* <https://karger.com/cgr/article-abstract/159/1/19/62275/A-Novel-Homozygous-Deletion-within-the-FRY-Gene?redirectedFrom=fulltext>

Phelps, W. A., Hurton, M. D., Ayers, T. N., Carlson, A. E., Rosenbaum, J. C., & Lee, M. T. (2023). Hybridization led to a rewired pluripotency network in the allotetraploid *Xenopus laevis*. *eLife*, 12, e83952. <https://doi.org/10.7554/eLife.83952>

- Putnam, N., Butts, Ferrier, & Furlong. (2008).** *The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype* | *Nature*. <https://www.nature.com/articles/nature06967>
- Qian, W., Liao, B.-Y., Chang, A. Y.-F., & Zhang, J. (2010).** Maintenance of duplicate genes and their functional redundancy by reduced expression. *Trends in Genetics: TIG*, 26(10), 425-430. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.07.002>
- Redmond, A. K., Casey, D., Gundappa, M. K., Macqueen, D. J., & McLysaght, A. (2023).** Independent rediploidization masks shared whole genome duplication in the sturgeon-paddlefish ancestor. *Nature Communications*, 14(1), 2879. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38714-z>
- Ren, X., Graham, J. C., Jing, L., Mikheev, A. M., Gao, Y., Lew, J. P., Xie, H., Kim, A. S., Shang, X., Friedman, C., Vail, G., Fang, M. Z., Bromberg, Y., & Zarbl, H. (2013).** Mapping of Mcs30, a new mammary carcinoma susceptibility quantitative trait locus (QTL30) on rat chromosome 12: Identification of fry as a candidate Mcs gene. *PLoS One*, 8(9), e70930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070930>
- Riazuddin, S., Hussain, M., Razzaq, A., Iqbal, Z., Shahzad, M., Polla, D. L., Song, Y., van Beusekom, E., Khan, A. A., Tomas-Roca, L., Rashid, M., Zahoor, M. Y., Wissink-Lindhout, W. M., Basra, M. a. R., Ansar, M., Agha, Z., van Heeswijk, K., Rasheed, F., Van de Vorst, M., ... Riazuddin, S. (2017).** Exome sequencing of Pakistani consanguineous families identifies 30 novel candidate genes for recessive intellectual disability. *Molecular Psychiatry*, 22(11), 1604-1614. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.109>
- Robertson, F. M., Gundappa, M. K., Grammes, F., Hvidsten, T. R., Redmond, A. K., Lien, S., Martin, S. A. M., Holland, P. W. H., Sandve, S. R., & Macqueen, D. J. (2017).** Lineage-specific rediploidization is a mechanism to explain time-lags between genome duplication and evolutionary diversification. *Genome Biology*, 18(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1241-z>
- Ruddle, F. H. (1997).** Vertebrate Genome Evolution—The Decade Ahead. *Genomics*, 46(2), 171-173. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.5096>
- Sacerdot, Louis, Bon, Berthelot, & Crollius. (2018).** *Chromosome evolution at the origin of the ancestral vertebrate genome* | *Genome Biology* | *Full Text*. <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-018-1559-1>

- Sait, S. N. J., Claydon, M. A., Conroy, J. M., Nowak, N. J., Barcos, M., & Baer, M. R. (2007).** Translocation (4;11)(p12;q23) with rearrangement of FRYL and MLL in therapy-related acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 177(2), 143-146. <https://doi.org/10.1016/j.cancergenryo.2007.05.021>
- Session, A. M., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J. A., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A., Suzuki, A., Kondo, M., van Heeringen, S. J., Quigley, I., Heinz, S., Ogino, H., Ochi, H., Hellsten, U., Lyons, J. B., Simakov, O., Putnam, N., ... Rokhsar, D. S. (2016).** Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538(7625), 336-343. <https://doi.org/10.1038/nature19840>
- Simakov, O., Marletaz, Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2020).** Deeply conserved synteny resolves early events in vertebrate evolution | *Nature Ecology & Evolution*. <https://www.nature.com/articles/s41559-020-1156-z>
- Sindelka, R., Abaffy, P., Qu, Y., Tomankova, S., Sidova, M., Naraine, R., Kolar, M., Peuchen, E., Sun, L., Dovichi, N., & Kubista, M. (2018).** Asymmetric distribution of biomolecules of maternal origin in the *Xenopus laevis* egg and their impact on the developmental plan. *Scientific Reports*, 8(1), 8315. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26592-1>
- Smith, J. J., Antonacci, F., Eichler, E. E., & Amemiya, C. T. (2009).** Programmed loss of millions of base pairs from a vertebrate genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(27), 11212-11217. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902358106>
- Smith, J. J., Baker, C., Eichler, E. E., & Amemiya, C. T. (2012).** Genetic consequences of programmed genome rearrangement. *Current Biology: CB*, 22(16), 1524-1529. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.028>
- Smith, J. J., Timoshevskaya, N., Ye, C., Holt, C., Keinath, M. C., Parker, H. J., Cook, M. E., Hess, J. E., Narum, S. R., Lamanna, F., Kaessmann, H., Timoshevskiy, V. A., Waterbury, C. K. M., Saraceno, C., Wiedemann, L. M., Robb, S. M. C., Baker, C., Eichler, E. E., Hockman, D., ... Amemiya, C. T. (2018).** The sea lamprey germline genome provides insights into programmed genome rearrangement and vertebrate evolution. *Nature Genetics*, 50(2), 270-277. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0036-1>

Talavera, G., & Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56(4), 564-577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>

Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K. A., & Coates, J. C. (2010). Armadillo-repeat protein functions: Questions for little creatures. *Trends in Cell Biology*, 20(8), 470-481. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.05.003>

The Deciphering Developmental Disorders Study. (2015). Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders | *Nature*. <https://www.nature.com/articles/nature14135>

Uno, Y., Nishida, C., Takagi, C., Ueno, N., & Matsuda, Y. (2013). Homoeologous chromosomes of *Xenopus laevis* are highly conserved after whole-genome duplication. *Heredity*, 111(5), 430-436. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.65>

Wozniak, K. L., Phelps, W. A., Tembo, M., Lee, M. T., & Carlson, A. E. (2018). The TMEM16A channel mediates the fast polyspermy block in *Xenopus laevis*. *The Journal of General Physiology*, 150(9), 1249-1259. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812071>

Yatim, Benne, Sobhian, Lelievre, Levy, & Benkirane. (2012). NOTCH1 Nuclear Interactome Reveals Key Regulators of Its Transcriptional Activity and Oncogenic Function: *Molecular Cell*. [https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765\(12\)00740-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS109727651200740X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765(12)00740-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS109727651200740X%3Fshowall%3Dtrue)

Yoshimura, S. H., & Hirano, T. (2016). HEAT repeats—Versatile arrays of amphiphilic helices working in crowded environments? *Journal of Cell Science*, 129(21), 3963-3970. <https://doi.org/10.1242/jcs.185710>

Yu, Ren, & Uesaka. (2024). Hagfish genome elucidates vertebrate whole-genome duplication events and their evolutionary consequences | *Nature Ecology & Evolution*. <https://www.nature.com/articles/s41559-023-02299-z>

Zahn, N., James-Zorn, C., Ponferrada, V. G., Adams, D. S., Grzymkowski, J., Buchholz, D. R., Nascone-Yoder, N. M., Horb, M., Moody, S. A., Vize, P. D., & Zorn, A. M. (2022). Normal Table of *Xenopus* development: a new graphical resource. *Development* (Cambridge, England), 149(14), dev200356. <https://doi.org/10.1242/dev.200356>

Zallen, J. A., Peckol, E. L., Tobin, D. M., & Bargmann, C. I. (2000). Neuronal cell shape and neurite initiation are regulated by the Ndr kinase SAX-1, a member of the Orb6/COT-1/warts

serine/threonine kinase family. *Molecular Biology of the Cell*, 11(9), 3177-3190.
<https://doi.org/10.1091/mbc.11.9.3177>