



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Neurobiología

**Caracterización del receptor de acetilcolina nicotínico
(nAChR) en la sinapsis neuromuscular de la especie
*Branchiostoma lanceolatum***

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar al grado académico de Magíster en Neurobiología

MARIA ESPERANZA MARTINEZ CAMPOS

MARZO 2023

CONCEPCIÓN – CHILE

Profesor guía: Juan Pablo Henríquez Hohmann

Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

Dr. Juan Pablo Henríquez

Profesor guía tesis

Universidad de Concepción

Dra. Teresa Caprile

Profesora evaluadora interna

Universidad de Concepción

Dr. Felipe Aguilera Muñoz

Profesor evaluador externo

Universidad de Concepción

Dr. Gonzalo Yévenes

Director Programa Magíster

En Neurobiología

AGRADECIMIENTOS

Al programa de postgrado de Neurobiología y la Dirección de postgrado, por otorgar el espacio y beca que me permitió realizar esta tesis.

A mi tutor, el Dr Juan Pablo Henríquez, por su paciencia al recibirme hace años en su laboratorio y darme la oportunidad de desarrollarme en el ámbito científico.

A los miembros del laboratorio de Estudios Neuromusculares (Nest Lab), quienes transformaron el lugar de trabajo en un segundo hogar. A Jessica por su gran sabiduría y paciencia, no solo para ayudarme con experimentos, sino que también para resolver problemas de “adulta responsable”. A Francisca (Panki) por sumarle un grato ambiente al laboratorio y adentrarme al mundo del CrossFit.

A Ian, no solo por ayudarme a entender el inglés y la bioinformática, sino que además ser mi confidente dentro y fuera del laboratorio. A Viviana, que, si bien ya no forma parte del laboratorio, me aconseja siempre que lo necesito.

A los miembros de mi comisión de tesis, por sus comentarios y contribuciones a este trabajo.

A mis amigxs, quienes siempre me han escuchado, aconsejado y apoyado en las decisiones que he tomado.

A mis gatitas Nyx y Chloe, quienes me han enseñado a tener paciencia y me acompañaron con sus ronroneos cada vez que me estresaba por la tesis. Junto a ellas he descubierto lo que es el amor puro e incondicional.

Por último, quiero agradecer a mi familia, quienes siempre me apoyan y entregan todo su amor, confiando plenamente en mí.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	4
INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	8
ABREVIACIONES.....	9
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	13
I. INTRODUCCIÓN	15
1. Anfioxos como sistema modelo para estudios evolutivos	16
2. Estructuras anatómicas implicadas en las sinapsis neuromusculares en los anfioxos.....	18
A. Composición muscular de la notocorda	18
B. Organización estructural de los miotomas.....	21
C. Distribución y organización del tubo neural.....	23
3. Naturaleza sináptica de la unión neuromuscular en vertebrados.....	25
4. Naturaleza sináptica de la interacción del tubo neural con la notocorda y los miotomas	28
II. HIPÓTESIS	32
III. OBJETIVO GENERAL.....	32
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
MATERIALES	33
1. Animales de experimentación	33
2. Anticuerpos y sondas.....	33
3. Reactivos y soluciones en general.....	36
4. Equipos disponibles	36
V. MÉTODOS	38
1. Tinción tricrómica de Masson.....	38
2. Inmunofluorescencia	40
3. Técnica de aclaramiento óptico.....	41
4. Adquisición de imágenes	42

5. Obtención de secuencias genómicas de las subunidades del nAChR en diferentes especies.....	43
6. Alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético	45
Secuencia de pasos realizados para la creación del árbol filogenético de las subunidades de nAChRs de diferentes especies animales.	46
VI. RESULTADOS	47
1. Caracterización anatómica general de <i>B. lanceolatum</i>	47
2. Distribución del tejido conectivo presente en <i>B. lanceolatum</i>	52
3. Identificación del componente muscular en <i>B. lanceolatum</i>	57
4. Identificación del componente neuronal en <i>B. lanceolatum</i>	63
5. Localización de sinapsis colinérgicas en <i>B. lanceolatum</i>	66
6. Identificación de los componentes que conforman las sinapsis neuromusculares en <i>B. lanceolatum</i>	69
7. Análisis comparativo de la presencia de las subunidades de nAChR en el genoma de <i>B. lanceolatum</i> respecto a otras especies..	79
VII. DISCUSIÓN	83
1. Caracterización de nAChRs en las sinapsis neuromusculares de <i>B. lanceolatum</i>	85
2. Inervación neuromuscular de <i>B. lanceolatum</i>	87
3. Componente presináptico observado en <i>B. lanceolatum</i>	90
4. Componentes postsinápticos de <i>B. lanceolatum</i>	94
VIII. CONCLUSIONES.....	96
IX. PROYECCIONES	97
X. REFERENCIAS.....	99

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Posición filogenética y anatomía general del anfiexo.....	30
Figura 2: Esquema de la sinapsis neuromuscular de <i>B. lanceolatum</i>	31
Figura 3: Pasos involucrados en la generación del alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético de las subunidades nAChRs.....	46
Figura 4: Caracterización anatómica general de <i>B. lanceolatum</i> en etapa adulta.....	49-50
Figura 5: Identificación de estructuras anatómicas de <i>B. lanceolatum</i> en etapa adulta.....	51
Figura 6: Identificación de tejido conectivo en cortes transversales de <i>B. lanceolatum</i> en etapa adulta.....	53-54
Figura 7: Identificación de tejido conectivo en cortes longitudinales de <i>B. lanceolatum</i> en etapa adulta.....	55-56
Figura 8: Identificación de componente muscular en cortes transversales de <i>B. lanceolatum</i> en etapa adulta.....	59-60
Figura 9: Identificación de componente muscular en cortes longitudinales de <i>B. lanceolatum</i> en etapa adulta.....	61-62
Figura 10: Identificación del componente neuronal en cortes transversales y longitudinales de <i>B. lanceolatum</i> en etapa adulta.....	64-65
Figura 11: Detección de nAChRs en <i>B. lanceolatum</i> en etapa adulta.....	67-68
Figura 12: Sistema neuromuscular en cortes transversales de <i>B. lanceolatum</i> adultos.....	72
Figura 13: Sistema neuromuscular en cortes longitudinales de <i>B. lanceolatum</i> adultos.....	73-74

Figura 14: Distribución de nAChRs en cortes longitudinales de <i>B. lanceolatum</i> adultos.....	75-76
Figura 15: Distribución 3D de nAChRs en <i>B. lanceolatum</i> adultos.....	77-78
Figura 16: Árbol filogenético basado en análisis del vecino más cercano de las subunidades del nAChR en diferentes cordados.....	81-82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Anticuerpos utilizados en los distintos experimentos.....	34-35
Tabla 2: Anticuerpos secundarios y sondas utilizadas.....	35
Tabla 3: Protocolo de inclusión en parafina.....	39
Tabla 4: Códigos Uniprot.....	44

ABREVIACIONES

µm: micras

ACh: acetilcolina

AChR: receptor de acetilcolina

BTX: bungarotoxina

CC: canal central

ChAT: acetiltransferasa de colina

DC: compartimento dorsal

Ep: epitelio

FBS: suero bovino fetal

h: hora

HCl: ácido clorhídrico

hrs: horas

IPNs: interneuronas de proyección ipsilateral

M: miotomas

mAChR: receptor de acetilcolina muscarínico

MET: microscopia electrónica de transmisión

min: minutos

Ms: mioseptos

nAChR: receptor de acetilcolina nicotínico

nm: nanómetros

No: notocorda

NT: tubo neural

PBS: tampón fosfato salino

PFA: paraformaldehído

Ph: faringe

PMC: centro motor primario

rpm: revoluciones por minuto

SeeDB: see deep brain

SNC: Sistema nervioso central

TA: temperatura ambiente

UNM: union neuromuscular

VAcHT: transportador vesicular de acetilcolina

VGLUT: transportador vesicular de glutamato

VGAT: transportador vesicular de GABA

VC: compartimento ventral

WGA: aglutinina de gérmen de trigo

RESUMEN

La unión neuromuscular (UNM) es la sinapsis periférica entre neuronas motoras y fibras musculares que controla el movimiento coordinado de una gran variedad de organismos. El estudio de la UNM se ha realizado en distintos modelos animales. En dicho contexto, una alternativa concreta para adquirir conocimiento sobre los requerimientos celulares y moleculares básicos de las sinapsis es conocer los procesos evolutivos que han dado lugar a los primeros contactos neuromusculares. Los cordados se dividen en el subfilo de los urocordados, cefalocordados y vertebrados. Los cefalocordados o anfioxos (en el caso de esta tesis, la especie *Branchiostoma lanceolatum*) son particularmente interesantes, pues poseen una anatomía que comparte estructuras similares con los vertebrados. Entre ellas destacan la presencia de un tubo neural, una notocorda (presente en etapa embrionaria y adulta) y miotomas (músculos esqueléticos del tronco). Diversos estudios estructurales han determinado que el tubo neural establece contactos con la región dorsal de la notocorda mediante estructuras llamadas astas notocordales, las cuales emergen de placas musculares transversales que la notocorda posee en su interior. Además, se han observado procesos citoplasmáticos que emergen desde las láminas musculares de los miotomas y que establecen contacto con las regiones ventrolaterales del tubo neural. En cuanto a la identidad de dichos contactos sinápticos, se desconoce la naturaleza de los receptores que cumplen esta función en los anfioxos. Al respecto, diferentes experimentos de hibridación *in situ* y detección enzimática

de acetilcolinesterasa han identificado componentes colinérgicos en la interacción del tubo neural con la notocorda y con los procesos citoplasmáticos de los miotomas, lo que sugiere la presencia de sinapsis colinérgicas en la UNM de los anfibios. Aun cuando en la UNM de vertebrados la despolarización de las fibras musculares y la consecuente contracción muscular dependen del receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR), en el anfibio no se ha identificado la presencia ni identidad de los receptores presentes en estas sinapsis neuromusculares. En base a estos antecedentes, se propone como hipótesis que “En la especie *Branchiostoma lanceolatum*, se encuentran nAChR en las interacciones neuromusculares que establece el tubo neural tanto con proyecciones de los miotomas como con la región dorsal de la notocorda”. Nuestros estudios de histología y detección de sondas y anticuerpos específicos en cortes de anfibios adultos muestran una distribución de nAChRs en regiones delineadas alrededor y dentro de la porción ventral del tubo neural. Sorprendentemente, estas regiones muestran una distribución segmentada en el eje antero-posterior del tubo neural. Nuestros estudios *in silico* arrojaron la presencia de genes ortólogos para las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5-11$ y $\beta 2-4$ del nAChR, lo que sugiere que la conformación neuromuscular del receptor es diferente a la de los vertebrados. Estos hallazgos en *B. lanceolatum* amplían nuestros conocimientos sobre los requisitos celulares y moleculares básicos de las sinapsis que dieron lugar a los primeros contactos neuromusculares mediante el análisis comparativo entre vertebrados e invertebrados.

ABSTRACT

The neuromuscular junction (NMJ) is the peripheral synapse between motor neurons and muscle fibers that controls coordinated movement in a wide variety of organisms. The study of the NMJ has been performed in different animal models. In this context, a concrete alternative to gain knowledge about the basic cellular and molecular requirements of synapses is to learn about the evolutionary processes that led to the first neuromuscular contacts. Chordates are divided into the subphylum of urochordates, cephalochordates and vertebrates. Cephalochordates or amphioxus (in the case of this thesis, the species *Branchiostoma lanceolatum*) are particularly interesting, as they have an anatomy that shares similar structures with vertebrates. These include the presence of a neural tube, a notochord (present in embryonic and adult stages) and myotomes (skeletal muscles of the trunk). Several structural studies have determined that the neural tube establishes contacts with the dorsal region of the notochord through structures called notochordal horns, which emerge from transverse muscular plates that the notochord has in its interior. In addition, cytoplasmic processes have been observed that emerge from the muscular laminae of the myotomes and establish contact with the ventrolateral regions of the neural tube. As for the identity of these synaptic contacts, the nature of the receptors that perform this function in amphioxus is unknown. In this regard, different *in situ* hybridization experiments and enzymatic detection of acetylcholinesterase have

identified cholinergic components in the interaction of the neural tube with the notochord and with the cytoplasmic processes of the myotomes, suggesting the presence of cholinergic synapses in the UNM of amphioxus. Even though in the vertebrate UNM the depolarization of muscle fibers and the consequent muscle contraction depend on the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), in amphioxus the presence and identity of the receptors present in these neuromuscular synapses have not been identified. Based on this background, it is hypothesized that "In *Branchiostoma lanceolatum* species, nAChRs are found in the neuromuscular interactions established by the neural tube with both myotome projections and the dorsal region of the notochord". Our histology studies and detection of specific probes and antibodies in adult amphioxus slices show a distribution of nAChRs in delineated regions around and within the ventral portion of the neural tube. Surprisingly, these regions show a segmented distribution along the antero-posterior axis of the neural tube. Our *in silico* studies yielded the presence of orthologous genes for the $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5-11$ and $\beta 2-4$ subunits of the nAChR, suggesting that the neuromuscular conformation of the receptor is different from that of vertebrates. These findings in *B. lanceolatum* extend our knowledge of the basic cellular and molecular requirements of the synapses that gave rise to the first neuromuscular contacts through comparative analysis between vertebrates and invertebrates.

I. INTRODUCCIÓN

La unión neuromuscular (UNM) es la sinapsis periférica que controla la contracción muscular y el movimiento coordinado en una gran variedad de animales. En los seres humanos, la UNM madura es el principal blanco de desarticulación morfológica y declive funcional en varias condiciones fisiológicas y patológicas, como el envejecimiento y las enfermedades motoras, respectivamente. Diferentes paradigmas de daño nervioso en modelos murinos han revelado que el sistema nervioso periférico posee capacidades regenerativas que conducen a la recuperación funcional de la UNM; sin embargo, este proceso suele ser ineficaz en los humanos, probablemente debido a su mayor tamaño y a las diferencias en el establecimiento de un nicho regenerativo aún no totalmente identificado en la UNM (Zelada et al., 2021). Una forma de enfrentar este obstáculo es investigar la evolución de los contactos sinápticos a través de las especies, ya que este análisis podría proporcionar nuevos conocimientos sobre los requisitos celulares y moleculares fundamentales que han participado, desde tiempos ancestrales, en el desarrollo y la regeneración de las sinapsis neuromusculares. De hecho, se ha obtenido información relevante sobre los mecanismos moleculares implicados en la organización y regeneración neuronal periférica a partir de estudios usando moscas y gusanos como animales modelo (Broadie & Bate, 1993; Hebbar et al., 2006; Richardson & Shen, 2019).

Los cefalocordados, también conocidos como anfioxos, son un grupo de animales marinos invertebrados que comparten muchas características genómicas y de desarrollo con los vertebrados. De manera interesante, también comparten varias estructuras anatómicas con los vertebrados, incluidos los tejidos nervioso y muscular, pero con ciertas peculiaridades en sus patrones de inervación. A continuación, se describen específicamente las estructuras que conforman los contactos neuromusculares distintivos en la especie *B. lanceolatum* y las sinapsis que presentan, las que permiten las conductas motoras del animal.

1. Anfioxos como sistema modelo para estudios evolutivos

Los cordados se dividen en el subfilo de los urocordados, los cefalocordados y los vertebrados. Estudios filogenéticos han determinado que los urocordados son los parientes vivos más cercanos a los vertebrados (Fig. 1A) (Delsuc et al., 2006). Sin embargo, los cefalocordados (también llamados Anfioxos), a diferencia de los urocordados, comparten estructuras anatómicas similares a los vertebrados, pero más simplificadas (Escriva, 2018). Los anfioxos se caracterizan por tener una faringe perforada, un endostilo, una vesícula hepática y una notocorda (Fig. 1B), la que, a diferencia de los vertebrados, está presente en todas las etapas de la vida y posee una composición muscular en etapa adulta, lo cual permite el

movimiento ondulatorio del animal para su locomoción (Webb, 1973). Además, esta simplicidad no se reduce solo a su estructura anatómica, sino que además su genoma no sufrió los dos eventos de duplicación genómica que ocurrieron en la base de la diversificación de los vertebrados (Minguillón et al., 2002), por lo que el anfioxo se convierte en un representante crucial como ancestro cordado para análisis de estudios de evolución del desarrollo (área denominada como Evo-Devo) (Minguillón et al., 2002).

Los anfioxos son pequeños animales marinos que habitan en zonas costeras de aguas templadas a tropicales (Carvalho et al., 2017). Casi todas las especies descritas viven en aguas poco profundas y arenosas. Además, estos animales pasan la mayor parte de sus vidas parcialmente enterrados en el sustrato de su hábitat, alimentándose de algas unicelulares gracias a un proceso de filtración a través de su boca provista de cilios, sin mandíbula (Holland, 2015). En este contexto, un paso clave para el movimiento coordinado de una gran variedad de organismos es el establecimiento, maduración y mantenimiento de contactos funcionales entre neuronas motoras y células musculares. En el caso del anfioxo, las interacciones neuromusculares les permiten generar ondas de contracción muscular que producen la natación en caso de escape y para enterrarse en la arena (Lacalli, 2002).

Los cefalocordados se dividen en tres géneros: *Asymmetron*, *Epigonichthys* y *Branchiostoma* (Igawa et al., 2017). A su vez, el género *Branchiostoma* se divide en tres especies: *B. floridae*, que habita principalmente las costas de Florida,

EEUU y el Caribe, *B. belcheri*, que habita en el Asia oriental y *B. lanceolatum*, en el Mediterráneo. A pesar de que el tiempo de divergencia entre las tres especies es de aproximadamente 100 a 200 millones de años, existe un alto grado de conservación de expresión génica como similitudes morfológicas entre ellas, por lo que el anfioxo se caracteriza por tener una tasa evolutiva lenta (Igawa et al., 2017).

2. Estructuras anatómicas implicadas en las sinapsis neuromusculares en los anfioxos.

A. Composición muscular de la notocorda

Una notocorda prominente, que persiste hasta la edad adulta, se distribuye a lo largo del eje antero-posterior de prácticamente todo el cuerpo del anfioxo, extendiéndose en una distribución más anterior y ventral que el tubo neural (Fig. 1B).

La notocorda embrionaria está formada por células que presentan grandes vacuolas citoplasmáticas y desempeña un papel fundamental en el desarrollo del eje corporal y formación de tejidos neurodérmicos, mesodérmicos y endodérmicos adyacentes (Suzuki & Satoh, 2000). Durante la etapa de metamorfosis del animal, las vacuolas citosólicas que conforman la notocorda retroceden y son sustituidas progresivamente por miofibrillas, lo que proporciona

a la notocorda adulta propiedades contráctiles (Suzuki & Satoh, 2000), característica exclusiva de este animal (Flood et al., 1969). Mediante determinaciones morfológicas, se establece que existen tres tipos de células notocordales en los anfibios adultos: (1) probables “*células madre*”, que se caracterizan por poseer varios orgánulos citoplasmáticos que se suelen encontrar en las células madres de vertebrados, como por ejemplo una única mitocondria, ribosomas libres y perfiles poco visibles de RER. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en células de Müller (Holland & Somorjai, 2020a). (2) Células de Müller, las que se ubican en la región dorsal y ventral de la superficie de la notocorda y presentan la capacidad de proliferar y diferenciarse en células laminares. (3) Células laminares o placas notocordales, las que presentan componentes musculares en el citoplasma y que poseen además grandes vacuolas y que juegan un rol importante en la extensión de la notocorda y en la biomecánica de la natación del anfibio (Holland & Somorjai, 2020a).

Como consecuencia, la región interna de la notocorda adulta se organiza en una serie de placas transversales, llamadas láminas notocordales, que son unidades musculares especializadas con la capacidad de alterar las propiedades mecánicas de toda la notocorda al contraerse (Flood, 1970). En vertebrados, las fibras musculares esqueléticas están conformadas por unidades funcionales llamadas sarcómeros, los cuales están constituidos por filamentos gruesos y delgados que permiten su contracción. Los sarcómeros tienen una longitud de 1,6 a 2,6 μm (Huxley, 1957). Las células notocordales de los anfibios contienen

filamentos transversales con un patrón estriado semejante a los sarcómeros del músculo esquelético (Flood, 1974); de hecho, estudios por microscopía electrónica de transmisión (MET) han permitido demostrar la presencia de miofilamentos gruesos de unos 20 nm de diámetro en placas notocordales de larvas de anfióxio (Stach, 1999), mientras que el diámetro de los filamentos gruesos en vertebrados es de 10 a 12 nm aproximadamente (Ross, 2015).

A través del método de análisis por marcadores de secuencia expresada (EST, del inglés *Expressed Sequence Tag*), se ha descubierto que al menos 12 tipos diferentes de genes relacionados con músculo liso y esquelético en vertebrados se expresan en la notocorda de la especie *B. belcheri*, siendo homólogos entre ellos (Suzuki & Satoh, 2000). Además, se ha detectado la presencia de paramiosina, proteína fibrilar que influye en la longitud de los filamentos gruesos y proporciona una mayor tensión a la notocorda, aumentando su rigidez ante la contracción muscular (Castellani-Ceresa & Lanzavecchia, 1982).

La notocorda está rodeada por una gruesa vaina de colágeno de aproximadamente 0,3 μm de grosor (Holland & Somorjai, 2020a), similar a la del tubo neural (Flood, 1966, 1970). Estudios por microscopía de contraste de fases han revelado la presencia de "astas notocordales", extensiones de las placas notocordales rodeadas por el tejido conectivo de la vaina notocordal. Las astas notocordales se distribuyen uniformemente en dos filas anteroposteriores a lo largo de la región dorsal de la notocorda, apareciendo en intervalos de 52 μm como promedio. Se ha observado que las astas notocordales establecen

contactos focales con la región ventral del tubo neural a través de una serie de fosas o poros pareados de la vaina notocordal, en donde se pueden encontrar un promedio de 10 placas notocordales por cada asta notocordal (Flood, 1970).

Análisis por MET han demostrado que los procesos citoplasmáticos de las astas notocordales están inervados por terminaciones nerviosas presinápticas del tubo neural ventral, por lo que las placas notocordales están inervadas de forma eferente (Flood, 1970) (Fig. 2). Además, se ha observado que la contracción de las placas notocordales depende de la actividad de las células de Rhode ubicadas en el tubo neural (Banks, 1970). Las células de Rhode corresponden a células de gran soma, con dendritas ramificadas a ambos lados del tubo neural, y cuyo axón gigante establece numerosas sinapsis *en-passant* o de paso (sinapsis que ocurren en diferentes puntos del axón) con los procesos de las células somatomotoras (Wicht & Lacalli, 2005).

B. Organización estructural de los miotomas

La mayor parte del cuerpo del anfiexo está formado por músculos esqueléticos que se organizan en aproximadamente 60 miotomas, compuestos por células musculares mononucleadas y sarcomerizadas que se disponen como estructuras aplanadas y contiguas llamadas “láminas musculares”, las que son ensambladas por proteínas contráctiles que, de forma similar a las placas notocordales, comparten asociaciones funcionales y estructurales con los sarcómeros de los vertebrados (Hagiwara et al., 1971; Suzuki & Satoh, 2000)

(Fig. 2). Cada uno de los miotomas del anfioxo presenta forma de V con un ápice que apunta hacia delante, lateral a la notocorda. Cada miotoma está compuesto por más de mil láminas musculares, las cuales tienen un grosor de aproximadamente 1 μm y cada una posee su propia membrana plasmática (Flood, 1967).

Estudios morfológicos a través de microscopía óptica y electrónica han revelado la existencia de al menos dos tipos de láminas musculares en el miotoma del anfioxo. Un tipo de lámina estrecha situada justo debajo de la superficie lateral del miotoma, la que presenta miofibrillas irregulares, con núcleos ubicados en el extremo lateral del miotoma y en la que una de cada tres o cuatro láminas tiene su borde medial ubicado entre 10 a 20 μm por debajo de la superficie lateral. Estas láminas se localizan en continuidad citoplasmática con procesos finos que contactan al tubo neural, las que fueron denominadas láminas superficiales (Flood, 1967). Por otro lado, se encontraron láminas anchas que se extienden desde la superficie lateral a medial del miotoma, las que presentan miofilamentos dispuestos en un patrón hexagonal y núcleos agrupados una capa debajo del borde medial de las láminas superficiales. Estas láminas se prolongan hasta el borde medial de los miotomas y están en continuidad citoplasmática con procesos gruesos que contactan al tubo neural y fueron denominadas láminas profundas (Flood, 1967) (Fig. 2).

Gracias a registros de filmación, se ha podido observar que durante la natación rápida de los anfioxos los miotomas pueden contraerse más de 20 veces por

segundo, a diferencia de la natación lenta donde solo se contraen una o dos veces por segundo. Esta contracción no solo se produce en los miotomas, sino que además se genera una tensión máxima en la notocorda (Banks, 1970). Se ha concluido que las células de Rhode ubicadas en el tubo neural participan en las sinapsis neuromusculares de los miotomas y la notocorda (Banks, 1970).

Cabe señalar que los miotomas se encuentran separados por capas de tejido conectivo llamado mioseptos, estructuras a las que los miotomas se anclan medial y lateralmente. A su vez, los mioseptos se anclan lateralmente a la dermis y medialmente al tejido conectivo axial, como son la vaina notocordal, el tabique medio y el peritoneo (Gemballa et al., 2003). Se han observado entre 54 a 62 mioseptos en *B. lanceolatum* adultos (Gemballa et al., 2003). Además, se ha visto que en *B. lanceolatum* las fibras musculares no se unen directamente al eje antero – posterior de la notocorda, sino que solo a los mioseptos, por lo que la única forma de transmitir la fuerza muscular al eje es a través de los mioseptos, los que permiten generar el movimiento de flexión en el nado del animal (Bocina & Saraga-babic, 2009; Gemballa et al., 2003).

C. Distribución y organización del tubo neural

El tubo neural de los anfioxos está conformado por aproximadamente 20.000 neuronas (Candiani et al., 2012) y se divide en una vesícula cerebral (tubo neural anterior), que abarca desde el comienzo del tubo neural hasta aproximadamente

el nervio 6 ubicado entre los miotomas 4 y 5, y una médula espinal, correspondiente al resto del tubo neural (Castro et al., 2015). En embriones de anfióxico, se ha demostrado mediante hibridación *in situ* que las neuronas colinérgicas se organizan como filas discontinuas de células desde el centro motor primario (PMC) hasta la región posterior de los somitos 6 y 7, las que corresponderían a motoneuronas y además interneuronas grandes pareadas (LPN1-4), junto con cuatro interneuronas de proyección ipsilateral (IPNs) (Candiani et al., 2012). Se ha logrado determinar que en la región ventrolateral del tubo neural del anfióxico se pueden encontrar motoneuronas del compartimento ventral (VC) y dorsal (DC) (Flood, 1966). Gracias a estudios histológicos realizados con tinción tricrómica de Van Gieson y análisis ultraestructural mediante MET, se ha revelado que los extremos de las láminas musculares miotómicas extienden largos procesos citoplasmáticos que atraviesan la vaina de colágeno que rodea el tubo neural, estableciendo los contactos neuromusculares del tubo neural (Flood, 1966) (Fig. 2).

Se ha observado que los procesos citoplasmáticos que contactan con la región del VC se extienden desde láminas musculares profundas pobres en sarcoplasma que tienen pocas mitocondrias, mientras que los procesos citoplasmáticos que contactan con la región DC del tubo neural se originan en láminas musculares superficiales que muestran abundantes mitocondrias y glucógeno dentro de su sarcoplasma extendido (Fig. 2). Basándose en estas

características, estas células musculares se han clasificado como láminas musculares rápidas y lentas, respectivamente (Flood, 1967).

Cabe destacar que algunas de las características particulares de los contactos neuromusculares de los miotomas de los anfioxos son similares a las de los vertebrados. Por ejemplo, en el pez cebra adulto, las fibras musculares lentas se localizan en las regiones laterales, mientras que las fibras musculares rápidas se distribuyen en las porciones profundas de los miotomas, como en los anfioxos (Ampatzis et al., 2013). Sin embargo, las fibras musculares blancas del pez cebra, responsables de la natación rápida de escape, están inervadas por neuronas motoras grandes dorsales, mientras que las fibras musculares rojas, que permiten la natación prolongada, están inervadas por neuronas motoras pequeñas ventrales (Ampatzis et al., 2013), lo cual es opuesto al patrón de inervación motora observado en los anfioxos (Flood, 1966, 1967). Aunque no son idénticos, estos estudios a nivel celular e histológico revelan que la organización general del aparato locomotor de los anfioxos y su control conservan algunas de sus características con los vertebrados.

3. Naturaleza sináptica de la unión neuromuscular en vertebrados

Las sinapsis son las unidades básicas que median la comunicación entre las neuronas y sus células blanco, lo que permite que el sistema nervioso interactúe con el resto del organismo, volviéndose uno de los mecanismos de comunicación

más avanzados a lo largo de la línea evolutiva de los seres vivos (Purves, 2008). En este tipo de comunicación, encontramos a células presinápticas y células receptoras postsinápticas, existiendo a su vez dos tipos de sinapsis, la eléctrica y la química (Purves, 2008). La sinapsis química se caracteriza estructuralmente por presentar sus componentes pre y postsinápticos separados por un espacio sináptico de 50 nm aproximadamente (Purves, 2008).

El aparato presináptico de la UNM de vertebrados se caracteriza por presentar numerosas mitocondrias, vesículas que contienen factores tróficos y vesículas cargadas con el neurotransmisor Acetilcolina (ACh) (Kiernan, 2013). La entrada de ACh a las vesículas sinápticas se debe a la presencia del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), una proteína de 12 dominios de transmembrana que transporta una molécula de ACh al interior de la vesícula intercambiándola por la salida de dos protones (H^+) (Nguyen et al., 1998). En el terminal presináptico se ubica la zona activa, en donde se encuentran las proteínas de membrana presinápticas (principalmente syntaxina y Snap-25), que reconocen a las proteínas de la membrana vesicular (sinaptobrevina y sinaptotagmina) (Purves, 2008). Producto de la propagación de un potencial de acción por el axón hasta el terminal presináptico, se abren los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje provocando la entrada del calcio extracelular y, en consecuencia, el aumento de su concentración en el citosol (Purves, 2008). Este aumento será detectado por la sinaptotagmina, lo que producirá la fusión de ambas membranas, desencadenando la liberación del contenido vesicular al

espacio sináptico (Lodish, 2005), ubicado entre los dominios pre- y postsináptico, liberando con ello a la ACh (Kiernan, 2013).

Luego de esta etapa, el neurotransmisor entra en contacto con la membrana postsináptica, en la que se encuentran los receptores específicos para el neurotransmisor liberado, los que serán responsables de transducir la señal hacia el interior celular para generar la respuesta contráctil.

En las sinapsis colinérgicas de los vertebrados, existen dos tipos de AChR activados por ligando: los muscarínicos (mAChR), de naturaleza metabotrópica y que están presentes en las neuronas y en los tejidos periféricos, y los nicotínicos (nAChR), que actúan por mecanismos ionotrópicos y son expresados por los músculos esqueléticos en la UNM y por las neuronas somáticas (Purves, 2008). Los receptores ionotrópicos tienen una estructura pentamérica que pueden agruparse en cinco subunidades iguales (homopentaméricos) o en cinco subunidades homólogas (heteropentaméricos) (Raftery et al., 1980). Los receptores nicotínicos ionotrópicos se pueden dividir según su ubicación anatómica, ya sea neuronal o muscular. En relación a los receptores nicotínicos neuronales, se han clonado genes que codifican para nueve subunidades α (α_2 - α_{10}) y para tres subunidades β (β_2 - β_4). En cuanto a los receptores nicotínicos musculares, en etapa embrionaria poseen una estequiometría $\alpha_2\beta_1\gamma\delta$ (Cetin et al., 2020). En la etapa postnatal, la subunidad γ es reemplazada por la subunidad ϵ , presentando el pentámero funcional una estequiometría $\alpha_2\beta_1\epsilon\delta$. La sustitución de las subunidades γ por ϵ es crucial para la organización y función de la UNM

(Cetin et al., 2020). Por un lado, los nAChR fetales tienen una mayor sensibilidad a la ACh, lo que podría facilitar la transmisión neuromuscular poco después de la innervación muscular (Cetin et al., 2020). Por otro lado, los nAChRs adultos muestran tasas de recuperación más rápidas desde la desensibilización y una mayor permeabilidad al Ca^{2+} , dos características relevantes para regular la eficacia de la UNM (Cetin et al., 2020).

4. Naturaleza sináptica de la interacción del tubo neural con la notocorda y los miotomas

Mientras que las UNM de los mamíferos son de naturaleza colinérgica, las moscas establecen UNM glutamatérgicas (Broadie & Bate, 1993). ¿Se parecen más los contactos neuromusculares de los anfibios a los de otras especies no vertebradas o a los de los vertebrados? Al respecto, se ha descubierto que las terminaciones nerviosas del tubo neural ventral de los anfibios que contactan con la notocorda y los miotomas contienen vesículas sinápticas, mitocondrias y gránulos de glucógeno (Flood, 1970). Los estudios de TEM han demostrado que las vesículas sinápticas poseen un calibre de 70-117 nm y un espacio sináptico de aproximadamente 60 nm de ancho, similar al de los vertebrados (Flood, 1966). Más aun, estudios de hibridación *in situ* han revelado la expresión del transportador vesicular de acetilcolina (VAChT) y de la acetiltransferasa de colina (ChAT) a lo largo del tubo neural anterior en embriones y larvas de anfibios (Candiani et al., 2012). Por otra parte, siguiendo la técnica clásica de Karnovsky

& Roots, se ha detectado una elevada actividad colinesterasa tanto en el extremo dorsal de cada asta notocordal que contacta con el tubo neural, como en las regiones VC y DC, donde los procesos musculares miotómicos contactan con el tubo neural (Flood, 1974).

Aunque análisis de secuencia han demostrado que los anfioxos expresan genes homólogos para las subunidades α_1 , α_2 , α_4 , α_9 , α_{10} , y para las subunidades β_2 , β_4 y β_5 de los nAChR, los receptores específicos potencialmente implicados en la conectividad neuromuscular siguen siendo desconocidos (Pedersen et al., 2019).

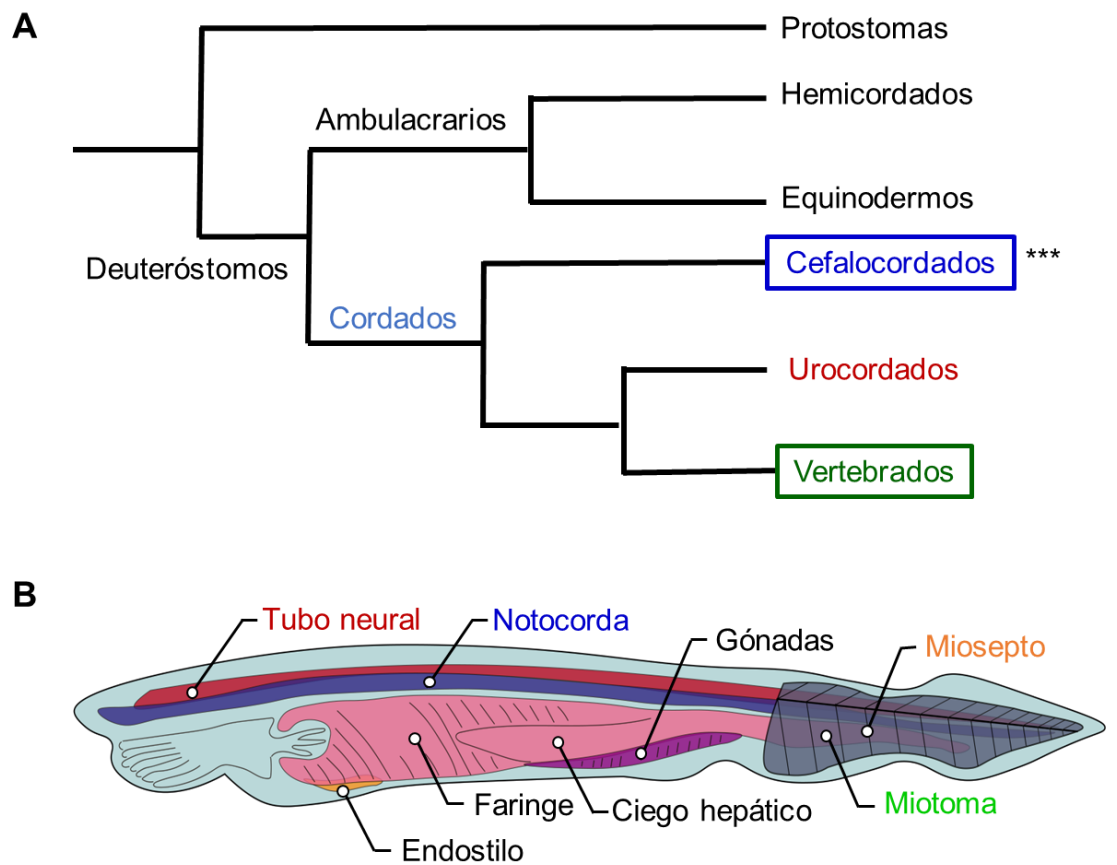


Figura 1. Posición filogenética y anatomía general del anfioxo.

Se representan las características generales de los anfioxos. (A) Relaciones filogenéticas de los principales linajes de deuteróstomos, destacando la distancia evolutiva entre los cefalocordados y los vertebrados. (B) Esquema anatómico longitudinal del anfioxo adulto, destacando los principales componentes anatómicos.

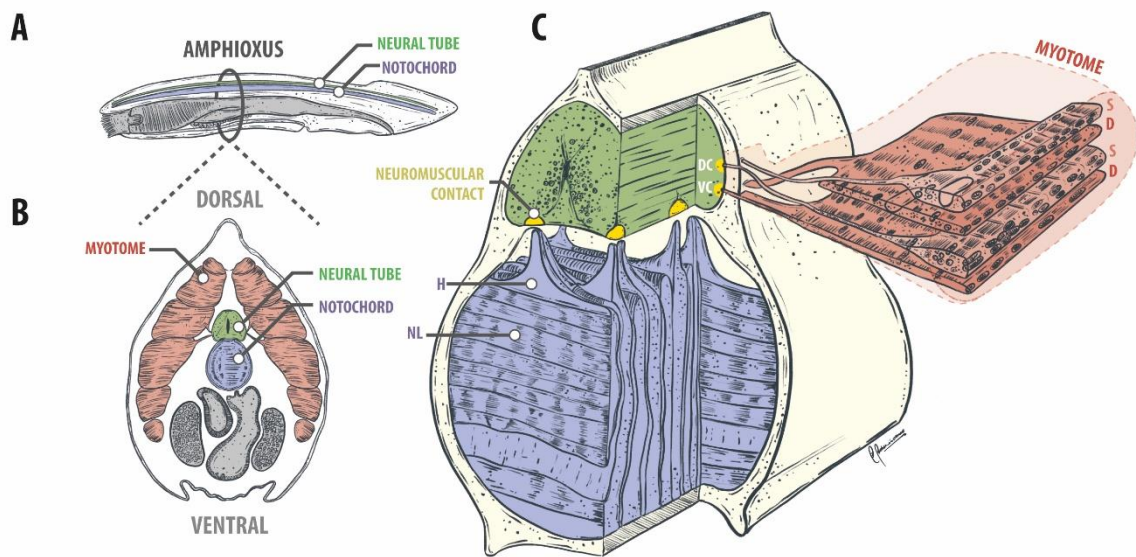


Figura 2. Esquema de la sinapsis neuromuscular de *B. lanceolatum*.

Se esquematizan las principales estructuras implicadas en las sinapsis neuromusculares en los anfioxos adultos. (A) Esquema longitudinal del anfioxo adulto, destacando el tubo neural (verde) y la notocorda (púrpura). (B) Esquema transversal de la zona representada en A, mostrando los miotomas (rojo), el tubo neural (verde) y la notocorda (púrpura). (C) Los contactos neuromusculares (amarillo) se producen dentro de la zona del tubo neural con los miotomos y la notocorda: las placas notocordales (NL) proyectan astas notocordales (H) que contactan con zonas ventrales del tubo neural; a su vez, el miotoma, compuesto por láminas superficiales (S) y profundas (D), proyecta proyecciones musculares que contactan con los compartimentos dorsal (DC) y ventral (VC) del tubo neural, respectivamente. El tubo neural y la notocorda están rodeados por vainas de colágeno (Martínez et al., 2022).

II. HIPÓTESIS

En la especie *Branchiostoma lanceolatum*, se encuentran nAChR en las interacciones neuromusculares que establece el tubo neural tanto con los miotomas como con la región dorsal de la notocorda.

III. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar al nAChR en las interacciones neuromusculares que establece el tubo neural con los miotomas y con la notocorda en la especie *Branchiostoma lanceolatum*.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar marcadores de las regiones pre y postsinápticas de las sinapsis neuromusculares en *B. lanceolatum*.
- Detectar la presencia y distribución de los nAChRs en las sinapsis neuromusculares de *B. lanceolatum*.
- Comparar la presencia de genes de diferentes subunidades del nAChR en el genoma de *B. lanceolatum* en un contexto evolutivo.

MATERIALES

1. Animales de experimentación

Se obtuvieron anfioxos de la especie *Branchiostoma lanceolatum* en etapa adulta, del laboratorio Biologie Intégrative des Organismes Marins, BIOM, Observatoire Océanologique, Sorbonne Université, Banyuls-sur-Mer, Francia. La captura de esta especie cuenta con un permiso específico otorgado por el Prefecto de la Región Provenza Alpes Côte d' Azur, Francia. Los animales fueron mantenidos en tanques con agua de mar a 17°C bajo fotoperíodo natural. Los procedimientos experimentales fueron aprobados y conducidos siguiendo los protocolos del manual de bioseguridad y bioética de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID, Gobierno de Chile) y del Comité de Bioética de la Universidad de Concepción.

2. Anticuerpos y sondas

Lista de anticuerpos primarios, secundarios y sondas utilizadas en la dilución indicada respecto del propósito experimental (tabla 1 y 2).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en los distintos experimentos.

	Anticuerpo	Estructura	Marca	Especie	Dilución
1	M3F7	Colágeno tipo IV	DSHB	Mouse	1:50
2	MO-1	Motoneurona	DSHB	Mouse	1:50
3	16.5H2	Motoneurona	DSHB	Mouse	1:50
4	AE-2	Acetilcolinesterasa	DSHB	Mouse	1:50
5	2H3	Neurofilamento	DSHB	Mouse	1:100
6	3A10	Neurofilamento asociado	DSHB	Mouse	1:50
7	4H6	Neurofilamento	DSHB	Mouse	1:50
8	RT97	Neurofilamento	DSHB	Mouse	1:50
9	S100	Células de Schwann mielínicas	Sigma	Rabbit	1:50
10	α -tubulina	Microtúbulos	Sigma	Mouse	1:2500
11	MAP1B	Microtúbulos asociados a proteína 1B	Santa cruz biotechnology	Mouse	1:50
12	3C11	Sinapsina	DSHB	Mouse	1:50
13	SB1	Sinaptobrevina-1	DSHB	Mouse	1:50
14	SV2	Vesículas sinápticas glicoproteína 2A	DSHB	Mouse	1:50
15	mAb30	Sinaptotagmina-1	DSHB	Mouse	1:50
16	mAb35	nAChR	DSHB	Mouse	1:50
17	C1B7	Acetilcolinesterasa	DSHB	Mouse	1:50
18	anti-AChR ϵ	ϵ AChR	Santa cruz biotechnology	Mouse	1:50
19	ANTI-SMP	Células de Schwann mielínicas	DSHB	Mouse	1:50
20	A4.74	Miosina cadena pesada (fibras rápidas humanas)	DSHB	Mouse	1:50
21	A4.840	Miosina cadena pesada (fibras lentas humanas)	DSHB	Mouse	1:50
22	A4.951	Miosina cadena pesada (fibras lentas humanas)	DSHB	Mouse	1:50
23	D3	Desmina, filamento intermedio	DSHB	Mouse	1:50
24	PAX 7	Células satélites	DSHB	Mouse	1:50
25	N3.36	Miosina cadena pesada (neonatal humano y fibras rápidas adultas)	DSHB	Mouse	1:50
26	10F5	Miosina cadena pesada , rápida IIB	DSHB	Mouse	1:50
27	F5D	Miogenina	DSHB	Mouse	1:50

28	MF 20	Miosina, sarcómero (MHC)	DSHB	Mouse	1:50
29	F59	Miosina cadena pesada (todas las fibras rápidas)	DSHB	Mouse	1:50
30	S58	Miosina cadena pesada , (contracción lenta)	DSHB	Mouse	1:50
31	A4.1025	Miosina, todas las isoformas	DSHB	Mouse	1:50
32	SC-71	Miosina cadena pesada, Tipo IIA	DSHB	Mouse	1:50
33	MF 30	Miosina cadena pesada , neonatal y adulto	DSHB	Mouse	1:50
34	2F7	Miosina cadena pesada , rápida IIA (MYH2)	DSHB	Mouse	1:50
35	BF-F3	Miosina cadena pesada Tipo IIB	DSHB	Mouse	1:50
36	BA-D5	Miosina cadena pesada, tipo I	DSHB	Mouse	1:50
37	β -actina	Músculo	Sigma	Mouse	1:1000
38	Tubulina β III	Microtúbulos	Sigma	Mouse	1:5000
39	JG22	Laminina	DSHB	Mouse	1:50
40	Rapsina	Rapsina	Santa cruz biotechnology	Mouse	1:50

Tabla 2. Anticuerpos secundarios y sondas utilizadas

Anticuerpo / sonda / toxina	Marca	Dilución
DAPI	ThermoFisher	1:100
Faloidina 488	Invitrogen	1:200
WGA 488	Invitrogen	1:500
Cy3	Jackson	1:200
α -BTX 647	Invitrogen	1:200

3. Reactivos y soluciones en general

Histo-Clear (Sigma-Aldrich); Etanol (Merck); HCl (Merck); isopropanol (Merck); Glicina (US Biological); medio de montaje acuoso para fluorescencia (Sigma-Aldrich); PBS 1X (136 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 8,1 mM de Na₂HPO₄; 1,5 mM de KH₂PO₄; pH 7,4); Sacarosa (US Biological); agarosa (BRL); TxBuffer (gelatina al 0,2%, NaCl 300mM, Tritón X-100 al 0,3% en PBS); Tritón X-100; SeeDB (80,2% (wt/wt) fructosa, 0,5% 1-tioglicerol, 0,1M buffer fosfato pH7,5); Fructosa (100% (wt/v) fructosa, 0,5% 1-tioglicerol, 0,1M buffer fosfato pH7,5).

4. Equipos disponibles

El laboratorio posee cuatro refrigeradores 2-8°C, tres refrigeradores de -20°C, un refrigerador de -80°C, una balanza electrónica, pHmetro, homogenizador de tejidos, microcentrífuga de sobremesa, fuentes de poder y una sala de disección, dedicada a la manipulación de animales.

Se cuenta además con una sala de microscopía equipada con un estereomicroscopio AxioZoom.V16 con objetivos de alta apertura numérica de 1,0x y 2,3x con un factor de acercamiento de 12,5:1 (generando magnificación desde 11x hasta 410x) (Carl Zeiss) equipado con un sistema Apotome. El estereomicroscopio cuenta con platina motorizada y filtros para longitudes de onda en el rango de GFP, RFP, BFP y DAPI. La sala de microscopía cuenta

también con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse i80 equipado con una cámara monocromática digital de alta calidad Nikon DS Qi1Mc.

Además, se cuenta con las facilidades del Centro de Microscopía Avanzada CMA-BíoBío, que contiene un microscopio confocal LSM700 (Zeiss) y un microscopio espectral LSM 780 (Zeiss).

El Laboratorio de Estudios Neuromusculares (NeSt Lab) contempla todas las normas de bioseguridad detalladas en el manual respectivo de ANID y la Universidad de Concepción.

V. MÉTODOS

1. Tinción tricrómica de Masson

Para identificar las regiones colagenosas y musculares de especímenes adultos de *B. lanceolatum*, los anfióxos fueron fijados en PFA 4% y luego fueron incluidos en bloques de parafina. Para ello, las muestras fueron puestas en cassettes de inclusión y se procedió a lavar con PBS 1X por 30 minutos. Posteriormente, se realizaron los pasos de deshidratación, aclaramiento e inclusión con parafina (Tabla 3). Para el proceso de deshidratación, las muestras fueron lavadas en concentraciones crecientes de alcohol, luego la muestra fue transferida a la batería de Histo-Clear con el fin de generar el aclaramiento del tejido y posteriormente, se realizó la inclusión con parafina, previamente licuada en una estufa regulada a 60°C. Finalmente, se vertió parafina líquida en un molde, se introdujo la muestra y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Los bloques de parafina fueron cortados utilizando un micrótomo rotatorio (modelo Reichert-Jung 2040) en láminas de 7 µm de espesor. Estos cortes fueron montados en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina. Posteriormente, se desparafinaron los cortes con una batería consistente en Histo-Clear I, II y III con lavados de 5 minutos en cada Histo-Clear y con una batería compuesta con alcoholes en concentraciones decrecientes (100°, 96°I, 96°II, 70° y 50°), donde las muestras fueron dejadas 5 minutos en cada uno de los alcoholes y lavar en

agua destilada por 1 min. Luego, los cortes fueron mordentados en solución Bouin durante 1 h a 56°C, para luego dejar enfriar y lavar en agua corriente, con posterior agua destilada. Para teñir, se utilizó hematoxilina de Weigert (Merck) por 8 min, solución de Biebrich Scarlett/fucsina ácida (Merck) durante 2 min y se diferenció con ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (Merck) dos veces durante 5 minutos cada uno. Luego, se tiñó con azul de anilina 2,5% (Merck) durante 5 min y se trataron los cortes con solución de ácido acético 1% (Merck) por 3 min. Finalmente, se deshidrataron las muestras en baterías de alcoholes de concentración creciente, se aclaró en Histoclear y se montaron con medio hidrofóbico de resina Entellan. Con esta técnica se obtienen núcleos en color negro, fibras colágenas en azul y citoplasma/fibras musculares en rojo.

Tabla 3. Protocolo de inclusión en parafina

Batería de inclusión	Tiempo (minutos)
Alcohol 70°	20
Alcohol 96°	20
Alcohol 100° I	15
Alcohol 100° II	15
Alcohol 100° III	10
Alcohol 100° IV	10
Histoclear I	15
Histoclear II	30
Histoclear III	180
Parafina I	30
Parafina II	30
Parafina III	45
Parafina IV	15

2. Inmunofluorescencia

Se utilizaron 40 anticuerpos primarios contra componentes neuronales, musculares, gliales y subunidades del nAChR que dan marcaje positivo en la UNM de vertebrados (Tabla 1). Los anfibios previamente fijados en PFA 4%, se lavaron en PBS 1X (136 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 8,1 mM de Na₂HPO₄; 1,5 mM de KH₂PO₄; pH 7,4) y fueron crioprotegidos con sacarosa al 30% p/v en PBS 1X durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los anfibios fueron cortados en segmentos y se congelaron en medio OCT (Sakura) sumergiéndolo en isopentano (Merk) enfriado por nitrógeno líquido. El taco obtenido fue cortado en crióstato (Thermo Scientific Cryostat Microm HM 525) a 20 µm de espesor. Estos cortes fueron montados en portaobjetos cargados (NewPath). Posteriormente, se realizaron tres lavados en PBS 1X durante 10 min cada uno y se redujo la autofluorescencia con 0,1M de Borohidruro de Sodio (Sigma) por 5 min, para luego realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1X.

Los anticuerpos primarios se diluyeron en diferentes concentraciones en buffer PBS 1X con suero bovino fetal 1% (FBS 1%) y se incubaron por 14-16 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego de reiterados lavados durante 30 min con (PBS 1%) (US Biological), se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario Cy3, DAPI para marcaje nuclear, BTX acoplada a Alexa Fluor 645 para reconocer los nAChRs, WGA acoplado a Alexa Fluor 488 para reconocer matriz extracelular y/o Faloidina acoplada a Alexa Fluor 488 para identificación

de actina F, según corresponda. Los anticuerpos secundarios y sondas fueron diluidos en PBS 1X más FSB 1% (Tabla 2), e incubados durante 2h a 3h a temperatura ambiente en cámara húmeda oscura. Finalmente se realizaron lavados con PBS 1X en oscuridad durante 30 min. Los cortes se montaron con medio de montaje acuoso (DakoCytomation). Como control negativo se usaron cortes de anfióxos procesados según el protocolo establecido, pero sin agregar anticuerpo primario. Como control positivo se utilizaron cortes de músculos de ratones adultos.

3. Técnica de aclaramiento óptico

Los anfióxos previamente fijados en PFA 4% se lavaron en PBS 1X (136 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 8,1 mM de Na₂HPO₄; 1,5 mM de KH₂PO₄; pH 7,4). Posteriormente, los anfióxos fueron incluidos en bloques de agarosa 4% y cortados en vibrátomo (Leica VT1200) a 300 µm de espesor, los cuales fueron almacenados en PBS/Azida de sodio 0,02% a 4°C.

Para realizar la permeabilización del tejido, las muestras fueron incubadas en Tritón X-100 al 0,5% en PBS durante 2 días con rotación a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron α -tubulina y β -actina, los cuales fueron diluidos en Tx Buffer con Thimerosal e incubados durante 7 días a temperatura ambiente con rotación. Posteriormente, las muestras se lavaron con

300 µl de Tritón/PBS al 0,3%, 6 veces durante 1 día a temperatura ambiente con rotación.

Luego, se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario Cy3 (1:200), DAPI (1:100) para marcaje nuclear, BTX acoplada a Alexa Fluor 647 (1:300) para reconocer los nAChRs y WGA acoplado a Alexa Fluor 488 (1:500) para reconocer la matriz extracelular. Los anticuerpos secundarios y sondas fueron diluidos en Tx Buffer con Thimerosal y se incubaron durante 4 días a temperatura ambiente con rotación.

Finalmente, las muestras fueron lavadas con 300µl de Tritón/PBS al 0,3%, 6 veces durante 1 día a temperatura ambiente con rotación.

Para realizar el aclaramiento óptico, las muestras fueron incubadas en baterías sucesivas de Fructosa 25% por 2 hrs, Fructosa 50% por 2 hrs, Fructosa 75% durante toda la noche. Posteriormente, se incubó en Fructosa 100% durante 1 día y finalmente con SeeDB durante 1 día.

Las muestras fueron montadas y observadas en el estereomicroscopio AxioZoom.V16 (Carl Zeiss) equipado con sistema Apotome.

4. Adquisición de imágenes

Para la observación de resultados se utilizó microscopía óptica compuesta en el microscopio Axioplan 2 (Zeiss) para la visualización de técnicas de tinción. Los resultados de las inmunofluorescencias fueron analizados mediante microscopía

de epifluorescencia (Nikon Eclipse i80 vertical) y el estereomicroscopio AxioZoom.V16 (Carl Zeiss). Por otro lado, las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de láser espectral múltiple (LSM780 NLO Zeiss). Las imágenes fueron procesadas con los softwares ImageJ y Motion tracking.

5. Obtención de secuencias genómicas de las subunidades del nAChR en diferentes especies

Los nAChR pertenecen a la superfamilia de receptores ionotrópicos, los que se dividen en receptores del tipo neuronal y muscular (Purves, 2008). Los receptores nicotínicos musculares en vertebrados poseen una estequiometría $\alpha_2\beta_1\delta\gamma/\epsilon$ (Cetin et al., 2020). Actualmente se ha encontrado que las sinapsis de *B. lanceolatum* presentan componentes colinérgicos, existiendo la posibilidad que la estructura de su receptor de acetilcolina sea homóloga al nAChR de vertebrados (Flood, 1974). Por lo tanto, se realizaron búsquedas de secuencias de las diferentes subunidades del nAChR mediante Uniprot. Las especies estudiadas fueron las siguientes: tunicados (*Ciona intestinalis* y *Ciona savignyi*), celacanto (*Latimeria chalumnae*), lamprea (*Petromyzon marinus*), pez cebra (*Danio rerio*), rana (*Xenopus tropicalis*), pollo (*Gallus gallus*), ratones (*Mus musculus*) y humano (*Homo sapiens*). Todos los números de acceso para la filogenia se informan en la Tabla 4.

Tabla 4. Códigos Uniprot

nAChr	COELACANTH		CIONA 1		CIONA 2		CHICKEN		HUMAN	
	<i>Latimeria chalumnae</i>		<i>Ciona intestinalis</i>		<i>Ciona savignyi</i>		<i>Gallus gallus</i>		<i>Homo sapiens</i>	
	Código	Ensembl Transcript ID	Código	Ensembl Transcript ID	Código	Ensembl Transcript ID	Código	Ensembl Transcript ID	Código	Ensembl Transcript ID
α1	H2ZRV3		X	X	X	X	AOA1D5P2H9		P02708	ENST00000348749
α1.2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
α2	H3A283	ENSLACT00000003788	X	X	X	X	F1NHP4	ENSGALT00000026738	Q15822	ENST00000407991
α2a	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
α2b	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
α3	H3A717	β4 (ENSLACT00000005485)	X	X	X	X	P09481	ENSGALT00000004759	P32297	ENST00000326828
α4	H3AQ75	ENSLACT00000011886	X	X	X	X	P09482	ENSGALT00000009316	P43681	ENST00000370263
α4b	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
α5	H3A0F2	ENSLACT00000003153	X	X	X	X	F1NAI4	ENSGALT00000004776	P30532	ENST00000299565
α6	X	X	X	X	X	X	F1NQD3	ENSGALT00000037792	Q15825	ENST00000276410
α7	H3AA28		X	X	X	X	F1P4Y5	ENSGALT00000006519	P36544	ENST00000306901
α8	X	X	X	X	X	X	Q03481	ENSGALT00000024751	X	X
α9	H3AMK2	ENSLACT00000010953	X	X	X	X	Q9PTS8	ENSGALT00000023080	Q9UGM1	ENST00000310169
α10	H3AAK8	ENSLACT00000006733	X	X	X	X	F1NWW3	ENSGALT00000022103	Q9GZ26	ENST00000250699
α11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
β1	H3AIR6	ENSLACT00000009609	X	X	X	X	P16005		P11230	ENST00000306071
β1.2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
β2	H3B5V5	ENSLACT00000017276	X	X	X	X	P09484		P17787	ENST00000368476
β3	H2ZYU2	ENSLACT00000002583	X	X	X	X	F1NKI4	ENSGALT00000024820	Q05901	ENST00000289957
β3a	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
β3b	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
β4	H3A716	ENSLACT00000005438	X	X	X	X	F1P4U2	ENSGALT00000039804	P30926	ENST00000261751
β5a	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
β5b	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
γ / G	H3B7M9	ENSLACT00000018030	X	X	X	X	F1NJ22	ENSGALT00000012833	P07510	ENSG00000196811
δ / D	H3B7C7	ENSLACT00000017928	X	X	X	X	F1NJ26	ENSGALT00000012824	Q07001	ENST00000258385
ε / E	H3A037	ENSLACT00000003034	X	X	X	X	X	X	Q04844	ENSG00000108556
D E S C O N O C I D O	H3A718	X	H2XXX5	ENSCINT00000031717	H2Y827	ENSCSAVT00000001494				
	M3XL07	X	E7FIY7	ENSCINT00000022806	H2ZA04	ENSCSAVT00000014584				
			E7FIZ4	ENSCINT00000017902	H2Y602	ENSCSAVT00000000758				
			F6WQ59	ENSCINT00000004364	H2YD2T	ENSCSAVT00000003533				
			E7FIY8	ENSCINT00000005063	H2YV76	ENSCSAVT00000009704				
			F6ZNF4	ENSCINT00000022420						
		F6S2F9	ENSCINT00000006586							

nAChr	LAMPREA		MOUSE		XENOPUS		ZEBRAFISH	
	<i>Petromyzon marinus</i>		<i>Mus musculus</i>		<i>Xenopus tropicalis</i>		<i>Danio rerio</i>	
	Código	Ensembl Transcript ID	Código	Ensembl Transcript ID	Código	Ensembl Transcript ID	Código	Ensembl Transcript ID
α1	X	X	P04756	ENSMUST0000002851	AOA6I8QB3		Q98880	ENSDART00000020261
α1.2	X	X	X	X	Q6P229		X	X
α2	X	X	Q91X60	ENSMUST0000002262	AOA6I8T284		X	X
α2a	X	X	X	X	X	X	Q1RLX8	ENSDART00000033947
α2b	X	X	X	X	X	X	F1R808	ENSDART000000136317
α3	S4RT03		Q8R4G9	ENSMUST0000003485	X	X	AOAOR4IEE6	
α4	X	X	O70174	ENSMUST00000006712	AOA803JE50		X1WDM5	
α4b	X	X	X	X	X	X	Q0PJT8	ENSDART00000018614
α5	X	X	Q2MKA5	ENSMUST0000009384	AOA6I8SCH7		Q567Y7	ENSDART00000021372
α6	X	X	Q9ROW9	ENSMUST0000003388	AOA6I8SYB1		F1QR92	ENSDART00000031546
α7	X	X	P49582	ENSMUST0000003273	AOA7D9NLQ4		B3DH13	ENSDART000000171463
α8	X	X	X	X	X	X	AOAOR4IYH1	ENSDART000000165912
α9	X	X	G3X8Z7	ENSMUST0000003110	AOA6I8RG40		AOA2R8QP56	
α10	X	X	B2RX82	ENSMUST00000008483	F6ZMM6		Q1LY90	ENSDART00000012872
α11	X	X	X	X	X	X	Q1L8Y9	ENSDART000000138971
β1	S4RTN1		P09690	ENSMUST0000004597	X	X	E7F892	ENSDART000000101528
β1.2	X	X	X	X	X	X	E7F2Q4	ENSDART00000035325
β2	X	X	Q9ERK7	ENSMUST0000002956	A4IIS6		E7F4S7	ENSDART000000041625
β3	S4REV7	X	Q8BMN3	ENSMUST0000006094	AOA6I8R737	X	X	X
β3a	X	X	X	X	X	X	F1QK53	ENSDART00000074678
β3b	X	X	X	X	X	X	Q8AV68	ENSDART000000050037
β4	X	X	Q8R493	ENSMUST0000003485	AOA6I8RWF1		AOAOR4ISQ3	ENSDART000000161429
β5a	X	X	X	X	X	X	AOA2R8Q5R6	XP_009289434.1 (gen)
β5b	X	X	X	X	X	X	AOA140LGX8	ENSDART000000173319
γ / G	X	X	F8VQK4	ENSMUST0000002747	AOA6I8QR12		E7F9V1	ENSDART000000123966
δ / D	S4RK71		P02716	ENSMUST0000007325	AOA6I8R5H3		Q75XT1	ENSDART00000015391
ε / E	X	X	P20782	ENSMUST00000010255	AOA6I8QMUM5		A2BG85	ENSDART000000112487

6. Alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético

Para la búsqueda preliminar de similitudes de secuencias, las secuencias de nAChR de la especie humana (*Homo sapiens*) se alinearon con las secuencias de *B. lanceolatum* utilizando BLAST. Para eliminar automáticamente las secuencias duplicadas, se utilizó el software Bioedit. Posteriormente, para el alineamiento de secuencias se utilizó el software CLUSTALX. Se preparó un archivo con todas las secuencias de *B. lanceolatum* obtenidas y las secuencias de *Ciona intestinalis*, *Ciona savignyi*, *Latimeria chalumnae*, *Petromyzon marinus*, *Danio rerio*, *Xenopus tropicalis*, *Gallus gallus*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*, correspondientes a cada una de las subunidades del nAChR y se realizó el alineamiento múltiple de secuencias utilizando la configuración predeterminada. Finalmente, se eliminaron manualmente los gap con el software Bioedit. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA (<https://www.megasoftware.net/>), utilizando el método del vecino más cercano con la configuración estándar, modificando las Tasas entre sitios usando Gamma Distribuida y fijando el número de pruebas Bootstrap en 1000 (Fig. 3). Como grupo externo para la familia completa de nAChR, se incluyeron las secuencias humanas 5HTR3A y 5HTR3B.

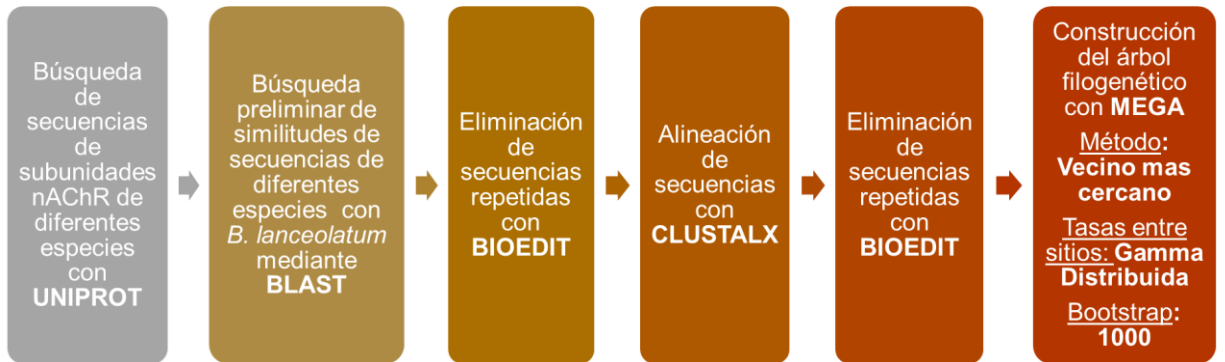


Figura 3. Pasos involucrados en la generación del alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético de las subunidades nAChRs

Secuencia de pasos realizados para la creación del árbol filogenético de las subunidades de nAChRs de diferentes especies animales.

VI. RESULTADOS

1. Caracterización anatómica general de *B. lanceolatum*.

Debido a que el mayor porcentaje de composición anatómica de los anfioxos es el componente muscular, el que está rodeado de vainas de tejido conectivo, se realizó en primer lugar la tinción Tricrómica de Masson, la cual tiñe de color negro los núcleos, de color rojo el componente muscular y de color azul el colágeno, permitiendo observar un panorama general de la anatomía del animal. La tinción se realizó en tres ejes de cortes distintos, con el fin de obtener la mayor cantidad de información de las estructuras.

En los cortes transversales (Fig. 4a-a''), se observan deposiciones de colágeno en el miosepto, en la membrana basal del epitelio, alrededor de la notocorda y del tubo neural; a su vez, se identifica de color rojo la presencia de los miotomas y la notocorda. Respecto a la sinapsis neuromuscular, a mayor aumento se observan procesos musculares que se extienden entre uno de los miotomas y el tubo neural (Fig. 4a''; flechas).

Con el objetivo de analizar a mayor profundidad la inervación entre el tubo neural con la notocorda y con los miotomas, se realizaron cortes longitudinales en los ejes medial y lateral del anfioxo. En cortes longitudinales mediales (Fig. 4b-b''), a menor aumento se observa la estructura general del anfioxo, destacando principalmente la presencia de la notocorda con las respectivas láminas

notocordales formando “pilas de monedas” (Stach, 1999). A mayor aumento, se pueden distinguir fosas notocordales (Fig. 4b”, punta de flecha), las cuales corresponden a adelgazamientos de la vaina de colágeno que rodea la notocorda, espacio donde se posicionan las astas notocordales (Flood, 1970). Los cortes longitudinales laterales de los anfioxos (Fig. 4c-c”) corresponden a la zona muscular del animal; por lo tanto, a aumento menor se puede ver el tejido colagenoso que rodea los miotomas, formando los mioseptos. A mayor aumento, se observan pequeñas cápsulas ovaladas que se generan en los mioseptos (Fig. 4c”; flecha azul), la que está rodeada por una matriz extracelular rica en colágeno.

Para estudiar con mayor detalle las estructuras anatómicas del anfioxo, se realizó una búsqueda de señales positivas con 40 anticuerpos dirigidos a estructuras relacionadas a la UNM en distintos animales. Al ser el anfioxo un animal ancestral, se ha descrito que muy pocos anticuerpos usados en animales vertebrados reconocen los epítopes de los componentes estructurales del anfioxo. Los resultados de los experimentos fueron analizados por microscopía de epifluorescencia y se seleccionaron los anticuerpos que dieron marcaje positivo, es decir aquellos que no presentaran un marcaje inespecífico evidente (Fig. 5). Los anticuerpos seleccionados para la identificación de la región presináptica fueron los dirigidos contra α - tubulina (Fig. 5A-A’), que reconoce microtúbulos y 2H3 (Fig. 5B-B’), contra neurofilamentos; para la región postsináptica se seleccionaron anticuerpos que reconocen a β -actina (Fig. 5C-

C'); y para la detección de colágeno tipo IV el anticuerpo M3F7 (Fig. 5D-D'). Además, se usó la sonda faloidina (Fig. 5E-E') para detectar actina F y aglutinina de germen de trigo (WGA) (Fig. 5F-F') para detección de la matriz extracelular.

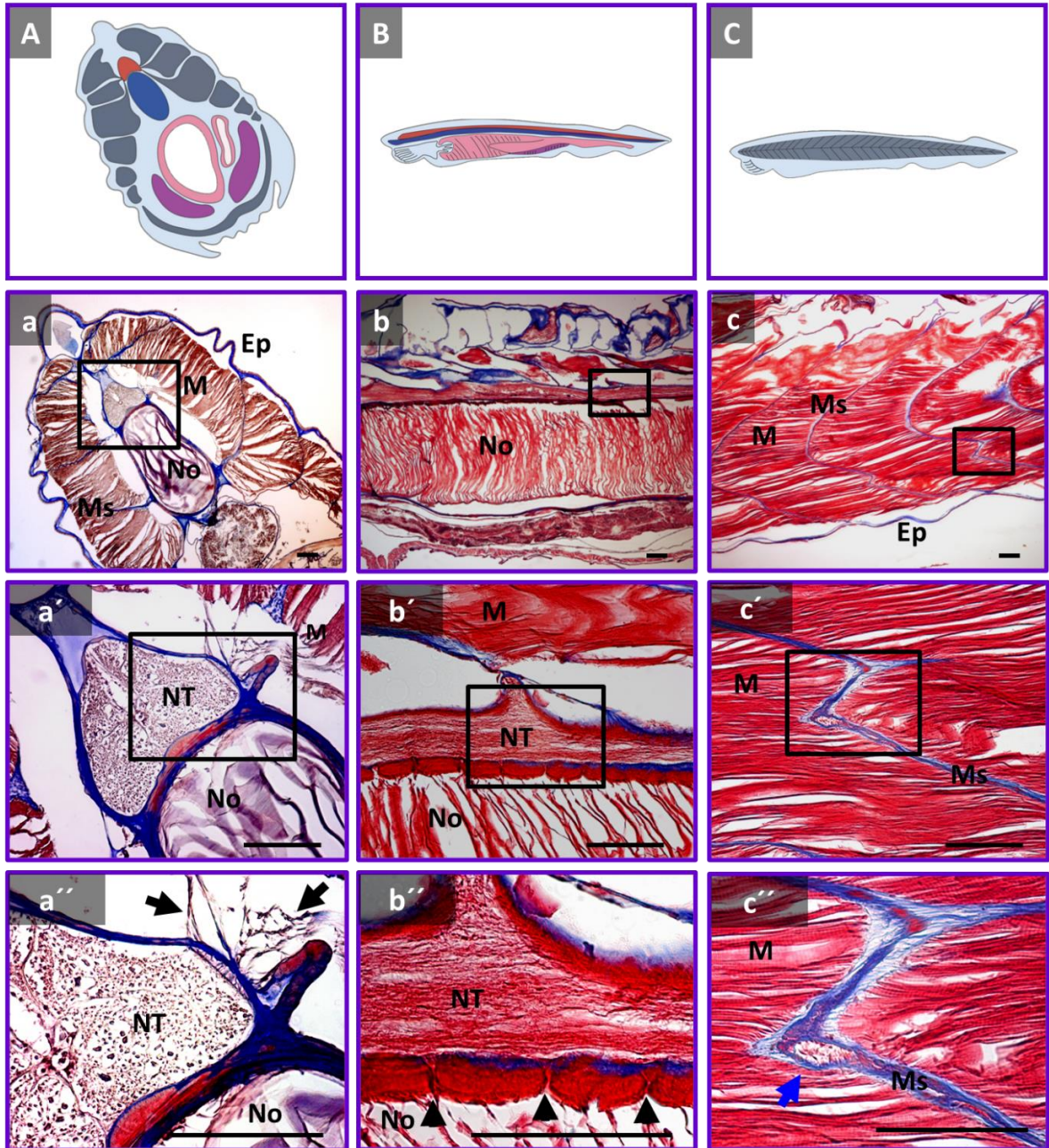


Figura 4. Caracterización anatómica general de *B. lanceolatum* en etapa adulta.

Secciones de anfioxos se tiñeron con tinción de tricrómica de Masson y se visualizaron mediante microscopía de luz. A,B,C corresponden a esquemas de los ejes de cortes realizados en los anfioxos. Las imágenes en A-a'' corresponden a secciones transversales de anfioxo. Las imágenes en B-b'' corresponden a secciones longitudinales mediales, mientras que C-c'' corresponden a secciones longitudinales laterales del anfioxo. Las imágenes a' y a'' son aumentos de los recuadros en a y a'. Las imágenes b' y b'' son aumentos de los recuadros en b y b' aumento del recuadro en b'. Las imágenes c' y c'' son aumentos de los recuadros en c y c', respectivamente. Los componentes identificados son: tubo neural (NT), notocorda (No), miotomas (M), mioseptos (Ms) y epitelio (Ep). Las flechas negras indican los procesos musculares entre los miotomas y el tubo neural; las puntas de flecha indican las fosas notocordales. Barra: 100 μm .

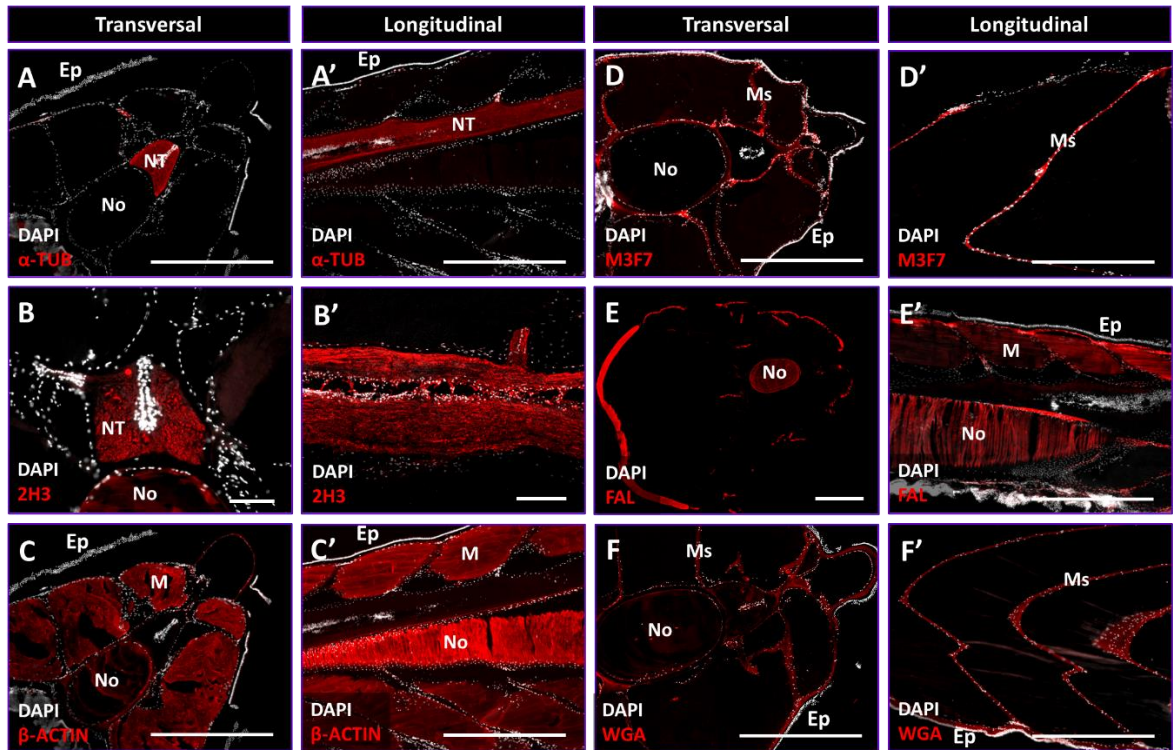


Figura 5. Identificación de estructuras anatómicas de *B. lanceolatum* en etapa adulta.

Secciones de anfióxos fueron inmunomarcadas para revelar los núcleos con DAPI (blanco) y diferentes anticuerpos primarios y sondas (rojo). Entre los anticuerpos se encuentran en las imágenes A-A': α -tubulina (microtúbulos), B-B': 2H3 (neurofilamentos), C-C': β -actina (microfilamentos) y D-D': M3F7 (colágeno IV). Además, se utilizaron las sondas Faloidina (actina F) en las imágenes E-E' y WGA (matriz extracelular) en F-F'. Los componentes identificados son: el tubo neural (NT), la notocorda (No), los miotomas (M), los mioseptos (Ms) y el epitelio (Ep). Barra: A-A', B'-F' = 500 μ m; B = 100 μ m.

2. Distribución del tejido conectivo presente en *B. lanceolatum*.

Para observar la distribución del tejido conectivo del anfibio en más detalle, se realizaron estudios de marcaje con la sonda WGA, la cual marca la matriz extracelular y de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo M3F7, el que reconoce al colágeno tipo IV (Foellmer & Madri, 1983). Como se observa en la figura 6A, en cortes transversales se identifica doble marcaje en la membrana basal del epitelio, en los mioseptos, alrededor del tubo neural y en algunas zonas específicas de la vaina notocordal (Fig. 6B-C). A mayor aumento, se observa la similitud de los marcajes (Fig. 6D-D’). En cortes longitudinales mediales (Fig. 7B), tanto el anticuerpo M3F7 como WGA marcan los mioseptos. A mayor aumento, se logra ver una tinción similar entre ambos (Fig. 7C-C’). En cortes longitudinales laterales (Fig. 7E), tanto el WGA como el antígeno M3F7 tiñen los mioseptos de los anfibios. En los mioseptos se pueden encontrar estructuras ovaladas, las cuales son teñidas completamente por el WGA, pero solo el borde de la estructura con el marcador de colágeno tipo IV, generando un anillo (Fig. 7F-F’).

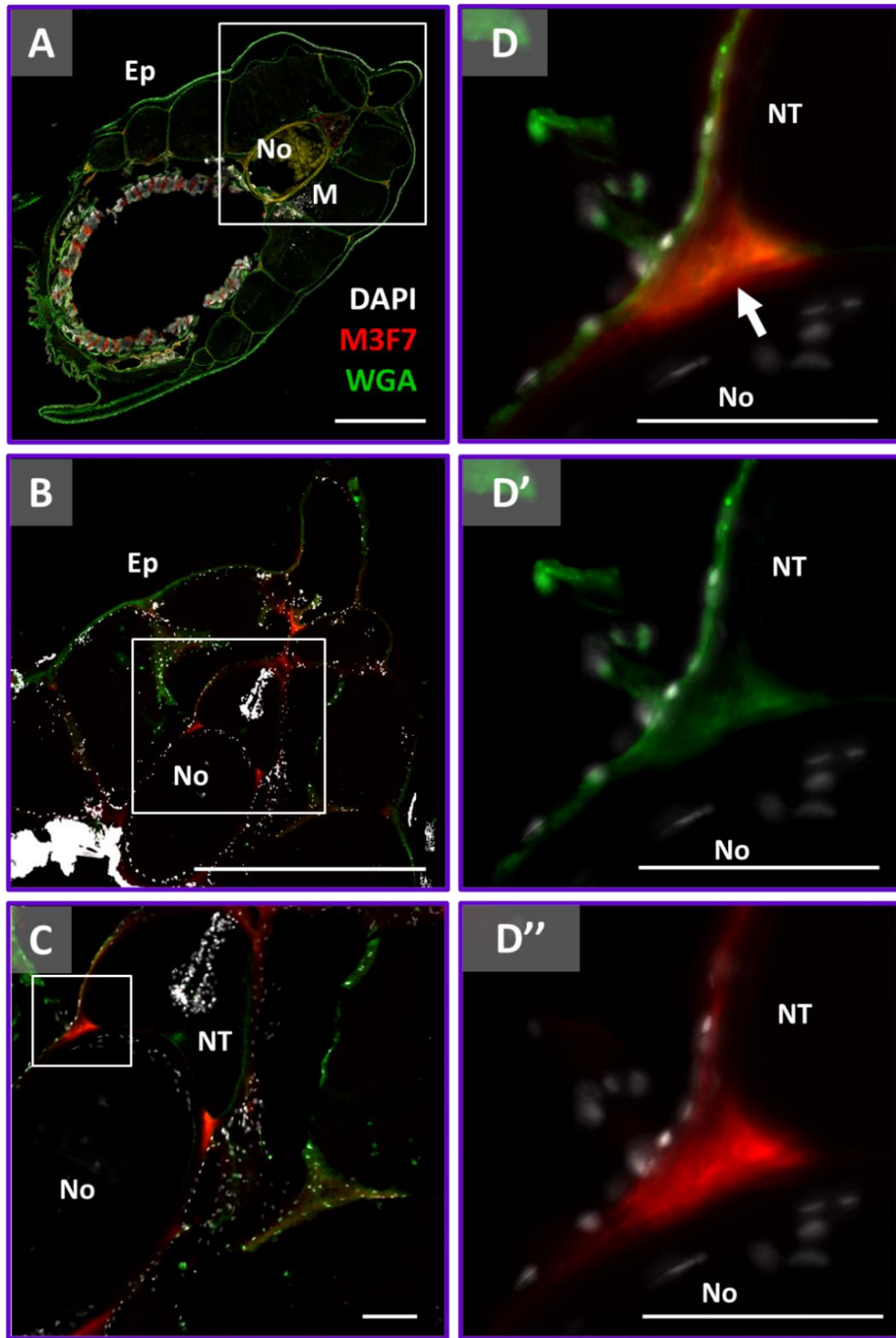


Figura 6. Identificación de tejido conectivo en cortes transversales de *B. lanceolatum* en etapa adulta.

Secciones de anfibios fueron inmunomarcadas para revelar los núcleos con DAPI (blanco), la matriz extracelular con WGA (verde) y el colágeno tipo IV con M3F7 (rojo). La imagen B corresponde a la ampliación del cuadro en A; la imagen C es ampliación del cuadro en B. Las imágenes D-D'' corresponden al aumento del recuadro en C. Los componentes identificados son: el tubo neural (NT), la notocorda (No), los miotomas (M), los mioseptos (Ms) y el epitelio (Ep). La flecha blanca indica la similitud del marcaje de M3F7 y WGA en el miosepto. Barra: A-B= 500 μm ; C-D''= 100 μm ;

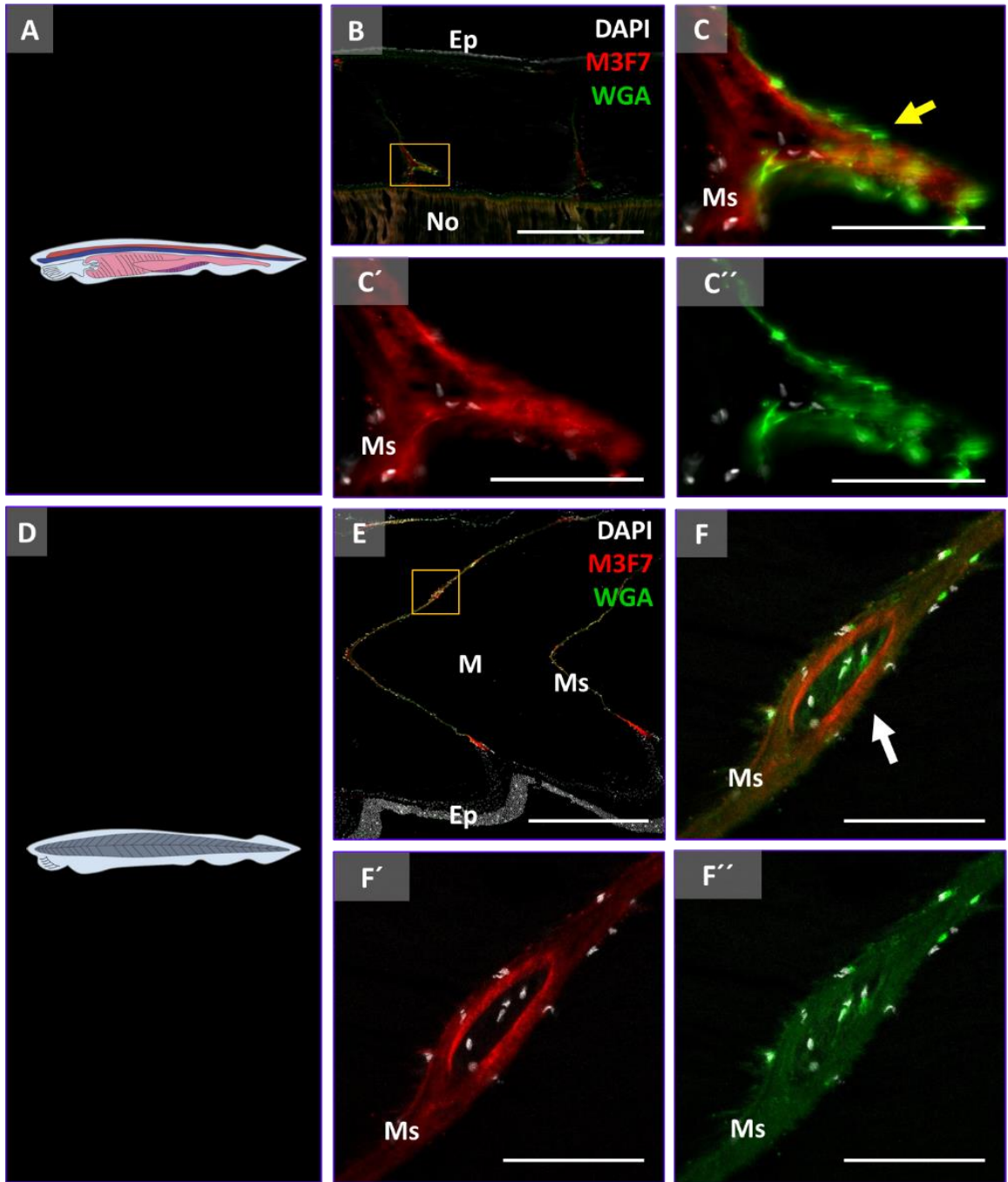


Figura 7. Identificación de tejido conectivo en cortes longitudinales de *B. lanceolatum* en etapa adulta.

Secciones de anfibios fueron inmunomarcadas para revelar los núcleos con DAPI (blanco), la matriz extracelular con WGA (verde) y el colágeno tipo IV con M3F7 (rojo). Las imágenes A y D corresponden a esquemas de cortes mediales y laterales, respectivamente. La imagen C corresponde a la ampliación del cuadro en B; las imágenes C'-C'' corresponden a la separación de canales de C. La imagen F es ampliación del cuadro en E. Las imágenes F'-F'' corresponden a la separación de canales de F. Los componentes identificados son: la notocorda (No), los miotomas (M), los mioseptos (Ms) y el epitelio (Ep). La flecha amarilla indica la similitud de marcaje entre WGA y M3F7; la flecha blanca indica el anillo de marcaje de M3F7. Barra: B, E= 500 μm ; C-C''= 100 μm ; F-F''= 50 μm .

3. Identificación del componente muscular en *B. lanceolatum*

Teniendo en cuenta que el componente postsináptico del anfioxo corresponde a los miotomas y la notocorda, tejido que ocupa un gran porcentaje de la anatomía del anfioxo, es relevante identificar el tejido muscular de *B. lanceolatum* en más detalle. Para ello, se realizaron estudios de marcaje con la sonda Faloidina y de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido contra α -actina. En cortes transversales de anfioxos, tanto α -actina como faloidina tiñen el músculo transversal abdominal y la notocorda (Fig. 8B), la que en adultos está constituida de tejido muscular (Flood, 1970). Sin embargo, al observar los miotomas del anfioxo, el anticuerpo α -actina los tiñe completamente, no así la faloidina, la que se une a los bordes externos de los miotomas del cuerpo completo del animal (Fig. 8B). Al observar a mayor aumento los bordes de los miotomas, se denota que el patrón de marcaje de la faloidina y la α -actina marcan diferentes componentes del sarcómero; además, faloidina reconoce a estructuras elongadas que se posicionan entre el marcaje de la β -actina (Fig. 8C-C'; flecha verde). Más aun, la tinción con faloidina también reconoce estructuras en el extremo dorsal de la notocorda, generando un arco de mayor intensidad de fluorescencia en esta zona (Fig. 8D-D'; flecha blanca).

En relación a los cortes longitudinales mediales del anfioxo, se observa marcaje tanto de α -actina como de faloidina en la notocorda y en los miotomas, pero estableciendo un particular marcaje de faloidina en el borde externo de los

miotomas y en el extremo dorsal de la notocorda (Fig. 9B-C), al igual que lo observado en cortes transversales del animal. Al observar a mayor aumento la región del borde externo de los miotomas, se ve un patrón de sarcomerización diferente para β -actina y faloidina (Fig. 9D; flecha blanca), añadiendo la diferencia de planos en que se encuentran dichos marcajes al observar en 3D (Fig. 9D'; flecha blanca). Sin embargo, al analizar la región central del miotoma, la tinción de la β -actina y la faloidina co-localizan (Fig. 9E; flecha amarilla). Al observar a mayor aumento la zona de la notocorda se ve una estructura fibrilar marcada con faloidina (Fig. 9F; asterisco). Por otra parte, en las láminas notocordales se observa una co-distribución de la β -actina con la faloidina en las mismas regiones (Fig. 9G-I).

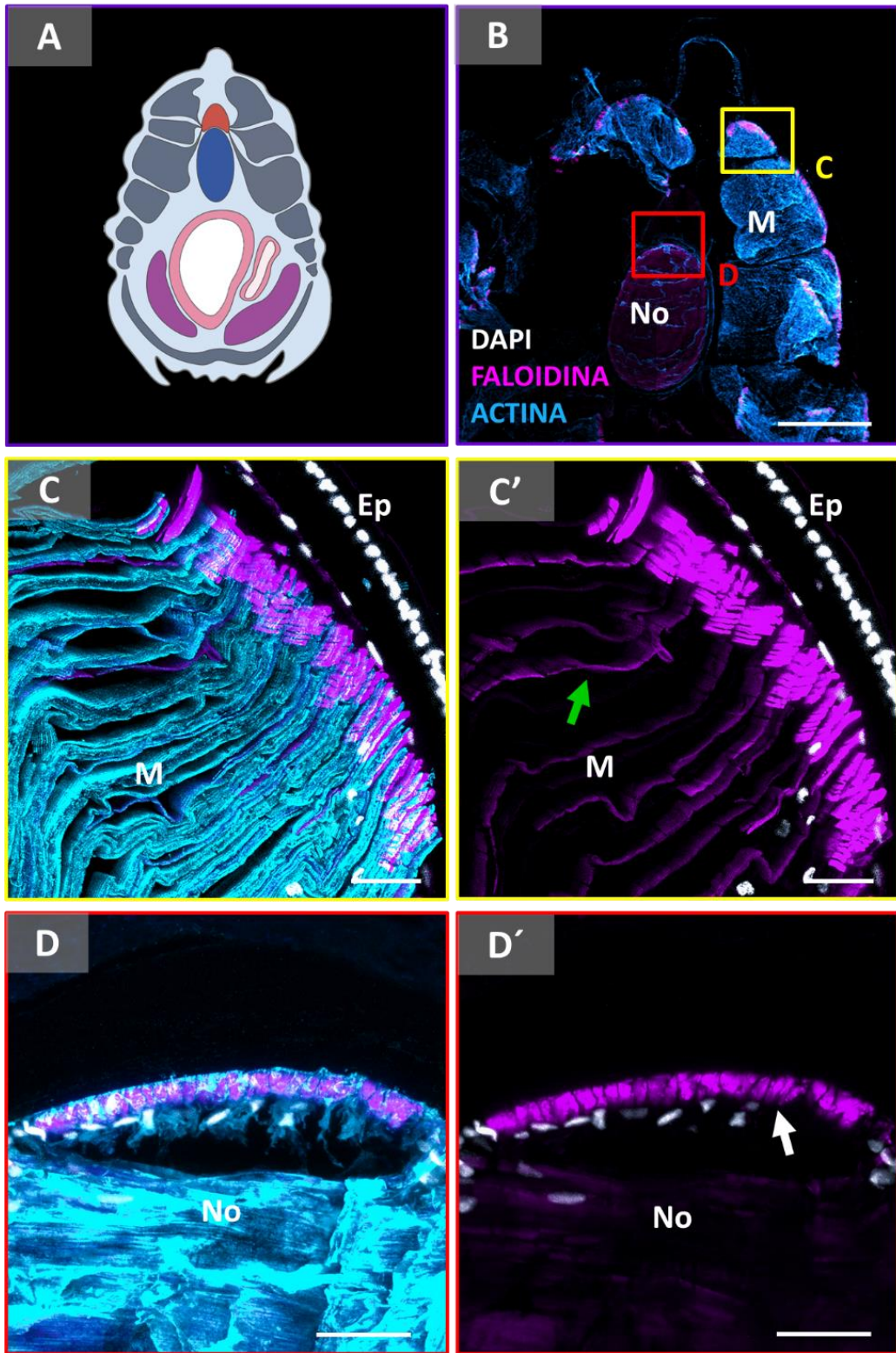


Figura 8. Identificación de componente muscular en cortes transversales de *B. lanceolatum* en etapa adulta.

Secciones de anfibios adultos fueron inmunomarcadas para revelar los núcleos con DAPI (blanco), los microfilamentos con anticuerpos contra la β -actina (cian) y la actina F con la sonda Faloidina (magenta). La imagen A corresponde a un esquema de corte en eje transversal del anfibio. La imagen B corresponde a la ampliación del cuadro amarillo en B y D a la ampliación del cuadro rojo en B. Las imágenes C' y D' corresponden al canal de Faloidina de C y D, respectivamente. Los componentes identificados son: la notocorda (No), los miotomas (M) y el epitelio (Ep). La flecha verde indica las estructuras elongadas que se observa con el marcaje de faloidina en los miotomas; la flecha blanca indica el arco segmentado que se genera en el borde dorsal de la notocorda con el marcaje de faloidina. Barra: B= 200 μ m; C-D'= 20 μ m.

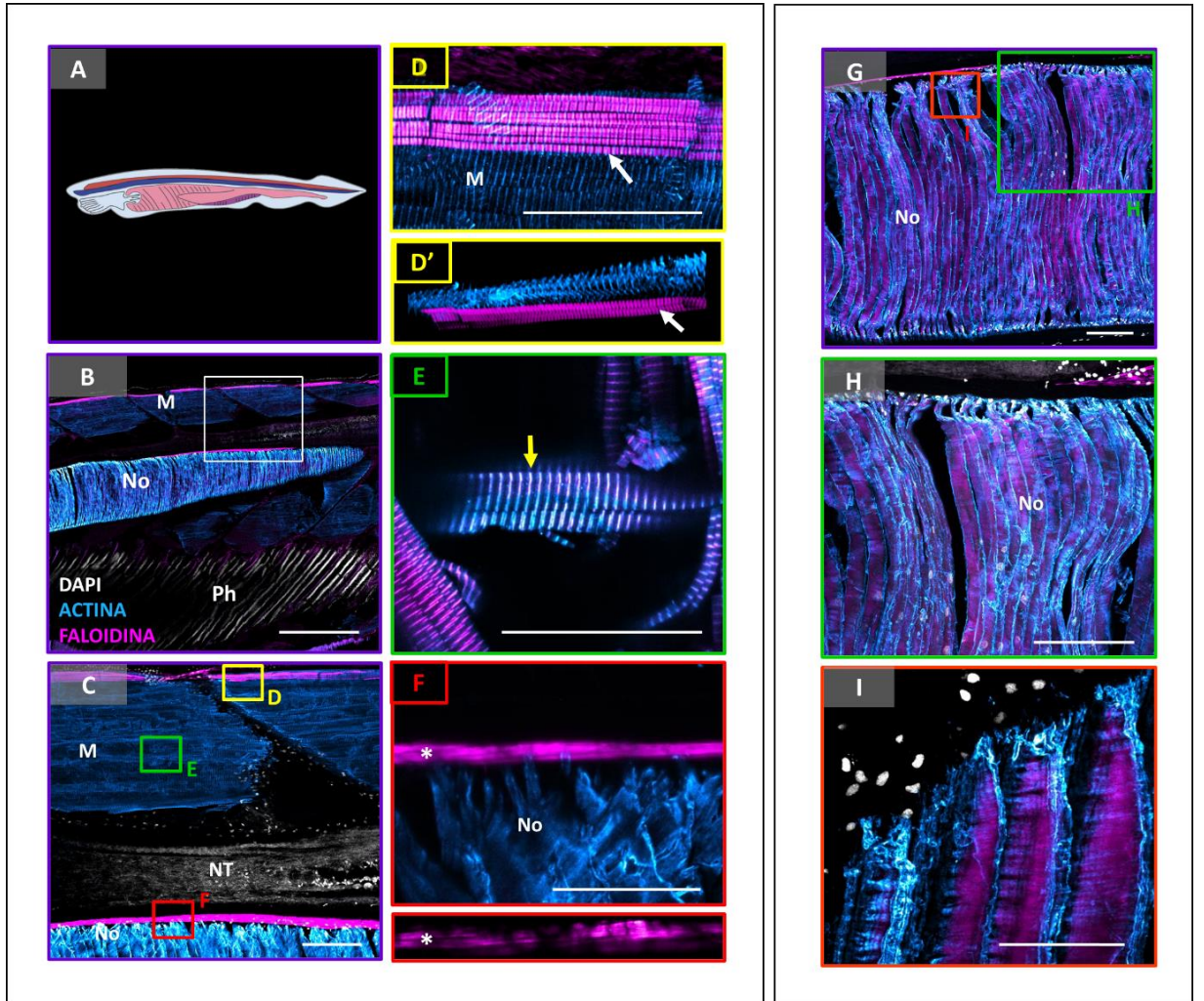


Figura 9. Identificación del componente muscular en cortes longitudinales de *B. lanceolatum* en etapa adulta.

Secciones de anfióxos adultos fueron inmunomarcadas para revelar los núcleos con DAPI (blanco), los microfilamentos con anticuerpos contra la β -actina (cian) y la actina F con la sonda Faloidina (magenta). La imagen A corresponde a un esquema de corte en eje longitudinal medial del anfióxo. La imagen C corresponde a la ampliación del cuadro en B; D es ampliación del cuadro amarillo en C, junto con una vista 3D en D'; E es una ampliación del cuadro verde en C; F es ampliación del cuadro rojo en C. La imagen G corresponde a una región de la notocorda; H es una ampliación del recuadro verde G; I es una ampliación del recuadro rojo en G. Los componentes identificados son: la notocorda (No), los miotomas (M) y la faringe (Ph). La flecha blanca indica la sarcomerización marcada con faloidina; la flecha amarilla indica la colocalización de actina y faloidina. Barra: B= 500 μm ; C,G= 100 μm ; D-F, H-I= 50 μm .

4. Identificación del componente neuronal en *B. lanceolatum*

Para identificar el componente neuronal del anfióxico en más detalle, se realizaron estudios de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido contra α -tubulina, lo que permite identificar microtúbulos, y el anticuerpo 2H3 que se une a neurofilamentos. Como se observa en cortes transversales y longitudinales de anfióxos (Fig 10. D–F; flechas) la α -tubulina marca el tubo neural y las proyecciones axonales que inervan la epidermis del anfióxico. En cuanto al marcaje con el anticuerpo 2H3, los neurofilamentos se observan dentro del tubo neural, lo que corresponde al sistema nervioso central (SNC), y en proyecciones axonales que corresponde al sistema nervioso periférico del animal (Fig. 10G–I; flechas).

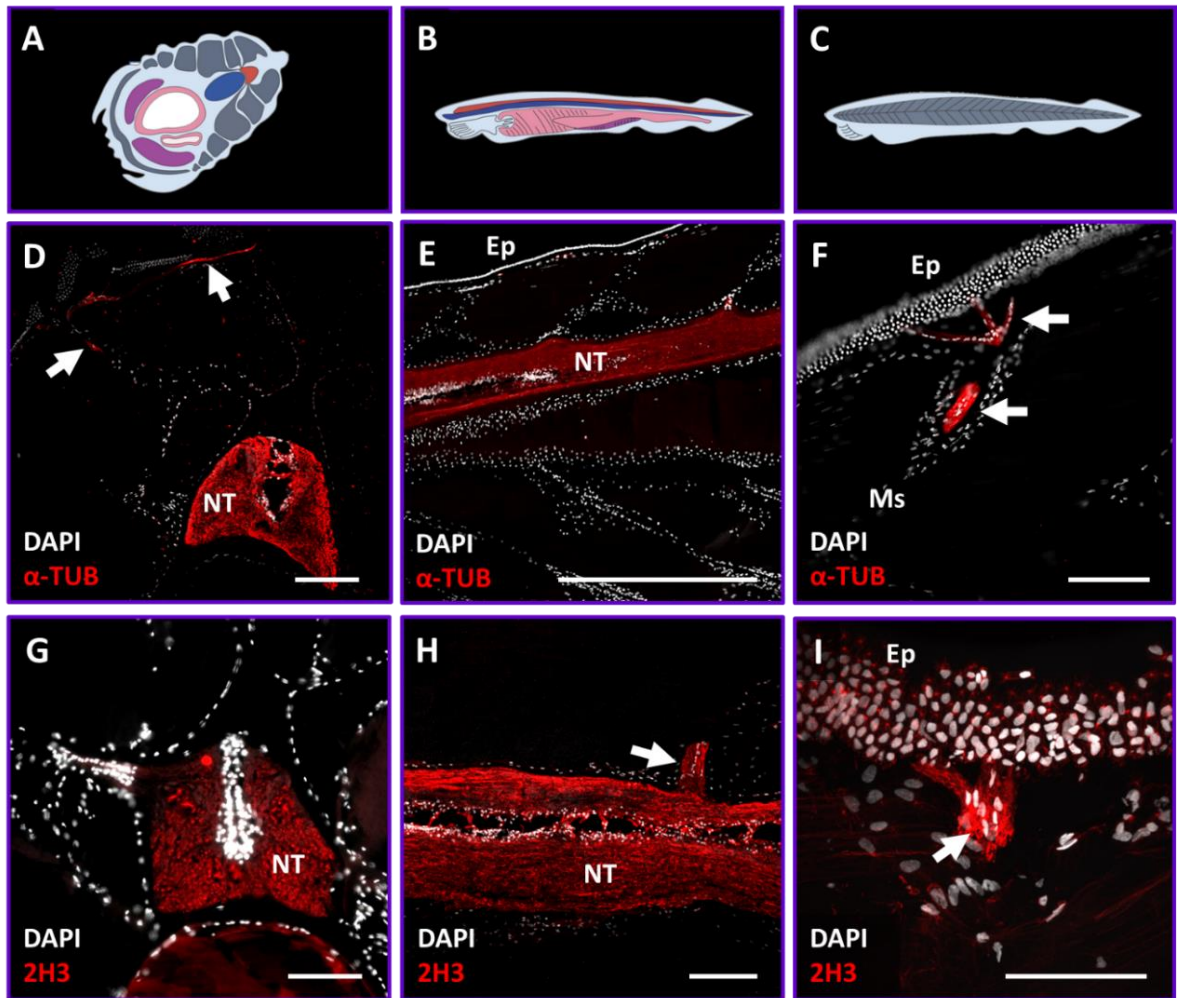


Figura 10. Identificación del componente neuronal en cortes transversales y longitudinales de *B. lanceolatum* en etapa adulta.

Secciones de anfibios fueron inmunomarcadas para revelar los núcleos con DAPI (blanco), los microtúbulos con α -tubulina (rojo) (D-F) y los neurofilamentos con el anticuerpo 2H3 (G-I). Las imágenes A-C corresponden a esquemas de los ejes de cortes de anfibios. Las imágenes D y G corresponden a cortes transversales; las imágenes E y H a cortes longitudinales mediales y las imágenes F y I a cortes longitudinales laterales. Los componentes identificados son: el tubo neural (NT), la notocorda (No), los mioseptos (Ms) y el epitelio (Ep). Las flechas blancas indican las proyecciones axonales que emergen del tubo neural. Barra: D, F-H= 100 μ m; E= 500 μ m; I= 50 μ m.

5. Localización de sinapsis colinérgicas en *B. lanceolatum*

Debido a que se ha descrito la expresión de VAChT y actividad colinesterasa en los puntos de interacción entre el tubo neural y las estructuras musculares de los anfioxos, se ha planteado que estas sinapsis son colinérgicas (Candiani et al., 2012; Flood, 1966, 1974). Sin embargo, no se han descrito los receptores específicos que se encuentran presentes en los contactos neuromusculares de los anfioxos. Teniendo en cuenta que en la UNM de los vertebrados los nAChR se distribuyen en las crestas de los pliegues subneurales de las fibras musculares (Ross, 2015) y que la unión de α -bungarotoxina (BTX) a los nAChR es altamente específica y de gran afinidad (Changeux et al., 1970), se utilizó dicha sonda para identificar la posible presencia de sinapsis colinérgicas nicotínicas en las sinapsis neuromusculares de los anfioxos. En cortes transversales de anfioxos, a menor aumento (Fig. 11A-A'), se puede observar el marcaje de la BTX exclusivamente en el tubo neural del animal. A mayores aumentos (Fig. 11B-C'), se observa marcaje positivo para BTX tanto en la interacción de la región ventral del tubo neural con la región dorsal de la notocorda (Fig. 11C'; flecha roja), como también los bordes laterales del tubo neural, donde se establece contacto con los procesos citoplasmáticos provenientes de las fibras musculares de los miotomas (Fig. 11C'; flecha verde). Además, se detecta marcaje positivo de BTX dentro del tubo neural (Fig. 11C'; flecha blanca), el que presenta una forma de arco que abarca desde el extremo ventral del tubo neural hasta el canal central (CC).

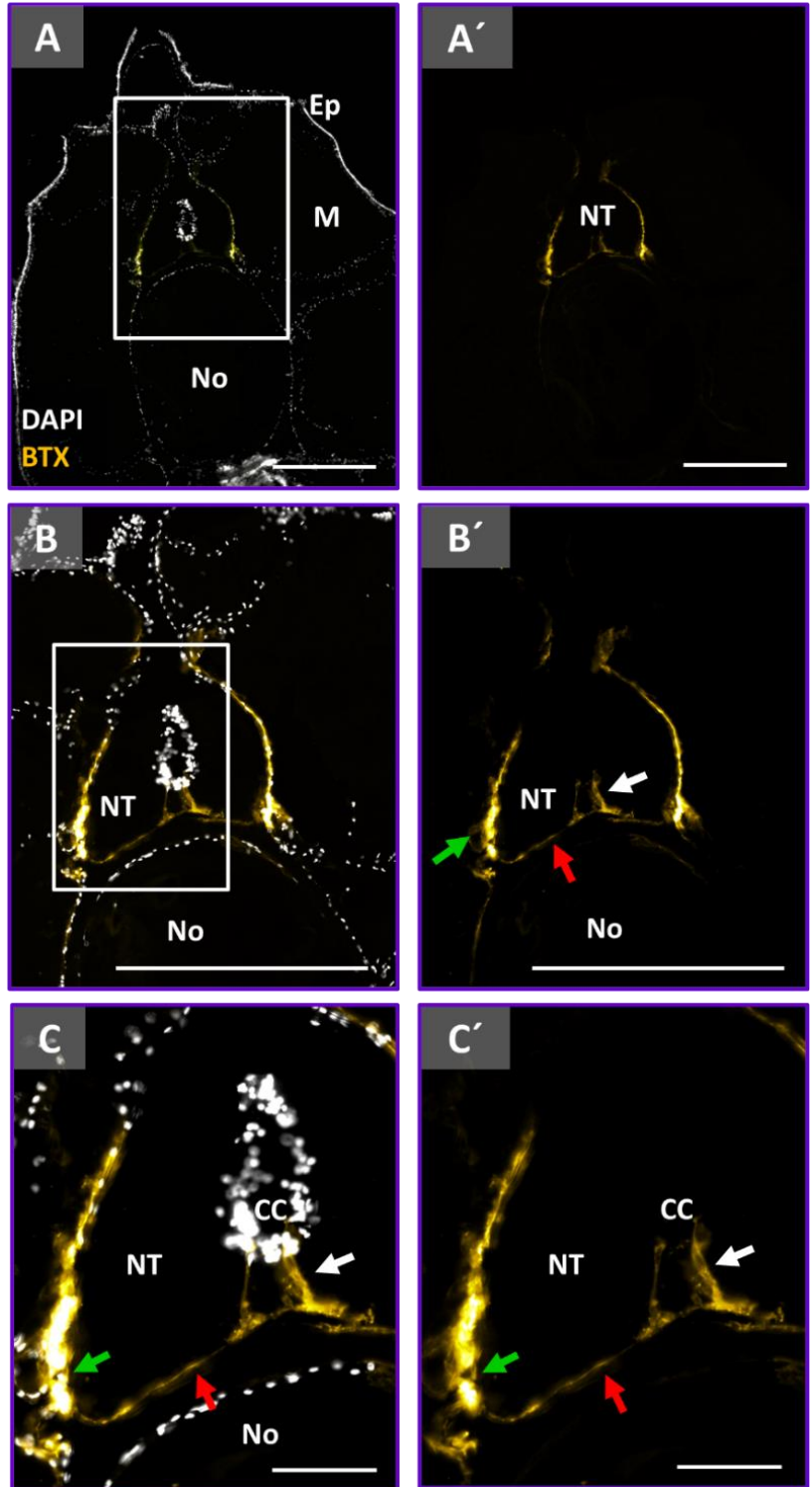


Figura 11. Detección de nAChRs en *B. lanceolatum* en etapa adulta.

Secciones de anfibios fueron marcadas para revelar los núcleos con DAPI (blanco) y los AChR con BTX (amarillo). La imagen B corresponde a la ampliación del cuadro en A; la imagen C es ampliación del cuadro en B. Las imágenes A', B' y C' corresponden al canal de BTX de A, B y C, respectivamente. Los componentes identificados son: el tubo neural (NT), el canal central (CC), la notocorda (No), los miotomas (M), y el epitelio (Ep). La flecha blanca indica la estructura positiva para la tinción de BTX que se encuentran dentro del NT. La flecha verde indica el marcaje positivo en la región lateral del NT en donde se establece contacto con los procesos musculares de los miotomas. La flecha roja indica el marcaje positivo de la interacción de la región ventral del NT con la región dorsal de la notocorda. Barra: A-B'= 200 μ m; C-C'= 50 μ m.

6. Identificación de los componentes que conforman las sinapsis neuromusculares en *B. lanceolatum*.

Para identificar las estructuras que conforman las sinapsis neuromusculares de los anfibios, se utilizaron anticuerpos que reconocen al componente neuronal y muscular del animal. Los microtúbulos del componente neuronal fueron detectados con α -tubulina y los microfilamentos del componente muscular con α -actina. Además, se utilizó BTX para la detección de los AChRs en las regiones sinápticas. En cortes transversales de anfibios, se observa tinción de α -tubulina tanto en el tubo neural como en la región de las vísceras del animal (Fig. 12A). La tinción de α -actina marca la notocorda y los miotomas. A mayor aumento se distingue el marcaje de BTX entre el tubo neural con la notocorda y la región que establece contacto con los procesos citoplasmáticos que provienen de los miotomas (Fig. 12C'''; flecha amarilla). Además, en esta sección se observa un asta notocordal que establece contacto con la región ventral del tubo neural, misma región donde se detectan nAChRs (Fig. 12C'''; flecha verde).

En cortes longitudinales mediales del anfibio, se observa tinción positiva de α -actina en los miotomas y la notocorda, así como de α -tubulina en el tubo neural (Fig. 13B-C). A mayor aumento se distingue marcaje de nAChRs dentro del tubo neural, tinción que abarca desde la región ventral del tubo neural hasta su canal central, estructura que es posible reconocer gracias a la concentración de núcleos de los somas neuronales teñidos con DAPI (Fig. 13D-D''''; flecha blanca).

Además, para observar los mioseptos que rodean los miotomas, se utilizó la sonda WGA, la que otorga un marcaje similar al colágeno tipo IV.

El marcaje de la matriz extracelular es positivo en la membrana basal del epitelio y en los mioseptos (Fig. 13F-G). A mayor aumento, se pueden observar las estructuras ovaladas (Fig. 13H-H'''; flecha amarilla), previamente encontradas en los mioseptos teñidos con tricrómica de Masson (Fig. 4c''; flecha azul). El uso del anticuerpo anti α -tubulina sugiere marcaje positivo para un componente neuronal dentro de dicha estructura ovalada del miosepto.

Finalmente, se analizó un corte longitudinal medial mediante reconstrucción 3D con el objetivo de obtener un mayor detalle de la distribución de los nAChRs dentro del tubo neural (Fig. 14). Con este experimento se logró observar que los nAChRs se distribuyen entre el componente neuronal (Fig. 14C-E).

Por lo tanto, los nAChRs se distribuyen entre los contactos que establecen los procesos citoplasmáticos de los miotomas y de la notocorda con el tubo neural, como se planteó en la hipótesis. Sin embargo, de manera inesperada, se encontraron nAChRs dentro del tubo neural, desde la región ventral hasta el canal central del tubo neural, formando una estructura arqueada en cortes transversales, hallazgo del cual no hay antecedentes publicados.

Con el fin de observar la distribución de los nAChRs dentro del tubo neural, se realizó una reconstrucción 3D mediante la técnica de aclaramiento óptico (Fig. 15). Los resultados obtenidos indican una distribución segmentada de los nAChRs dentro del tubo neural, la que comienza desde la región ventral del tubo

neural hasta el canal central. Además, esta aproximación permitió evidenciar la distribución intercalada de las astas notocordales de la región dorsal de la notocorda (Fig. 15A-B; flechas).

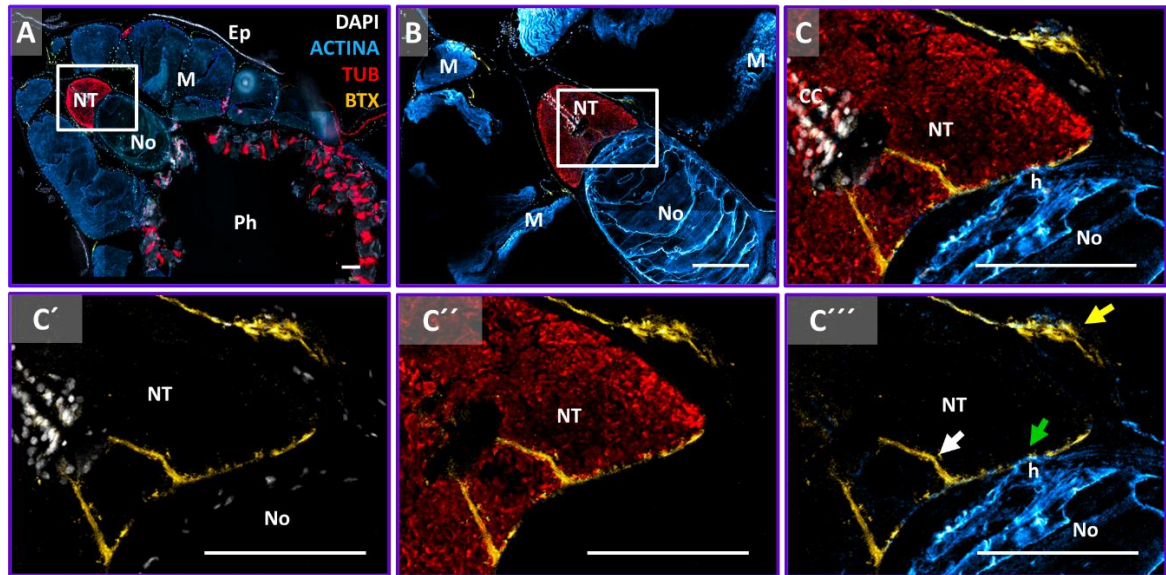


Figura 12. Sistema neuromuscular en cortes transversales de *B. lanceolatum* adultos.

Secciones de anfibios fueron marcadas para revelar los núcleos con DAPI (blanco), los microtúbulos con anticuerpos contra tubulina (rojo), los microfilamentos con anticuerpos contra la α -actina (cian), los AChR con BTX (amarillo). La imagen B corresponde a la ampliación del cuadro en A; la imagen C es ampliación del cuadro en B. Las imágenes C'-C''' corresponden a la separación de canales de la imagen C. Los componentes identificados son: el tubo neural (NT) el canal central (CC), la notocorda (No), los miotomas (M), la faringe (Ph) y el epitelio (Ep). La flecha amarilla indica la colocalización entre α -actina y BTX en la región lateral del NT; la flecha blanca el marcaje de BTX dentro del NT y BTX en la región lateral del NT; la flecha verde indica una asta notocordal que establece contacto con la zona ventral del tubo neural. Barra: 100 μ m.

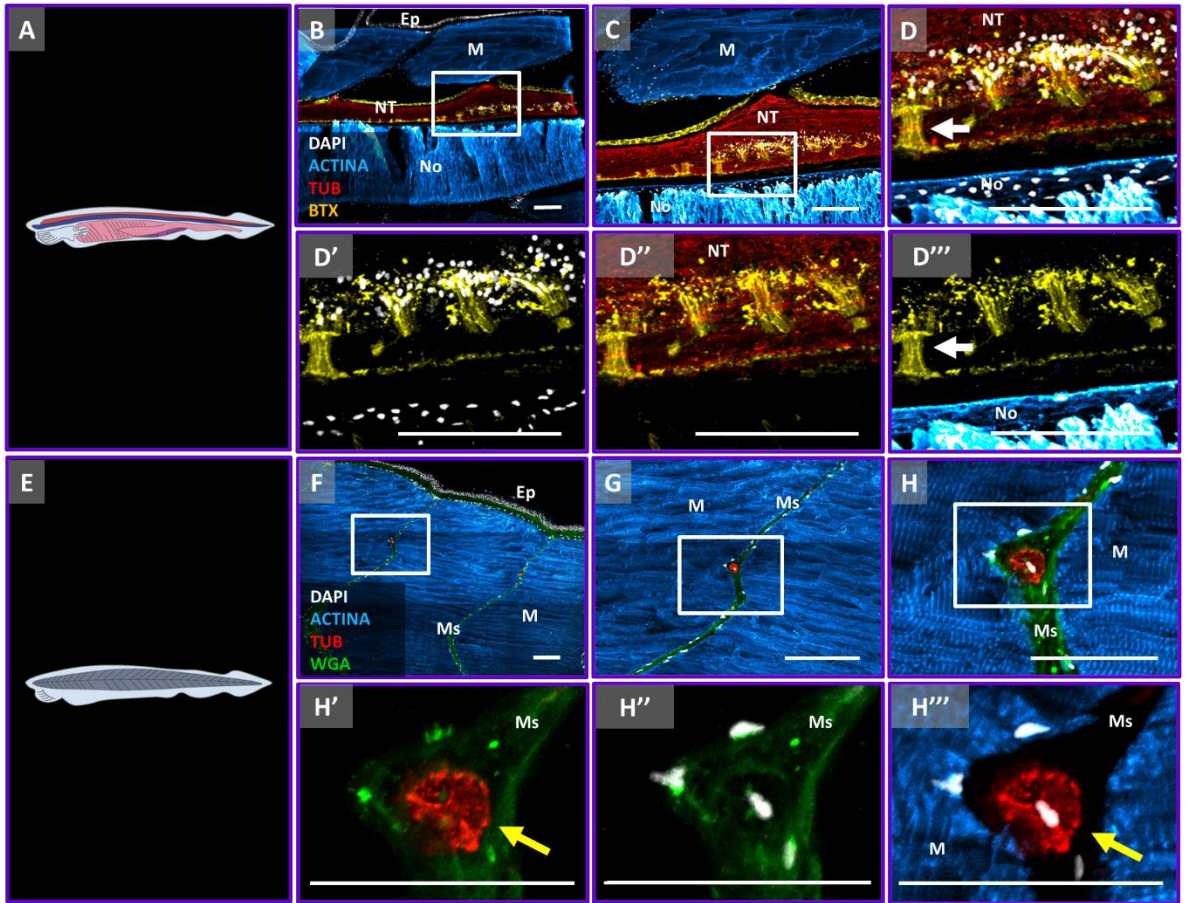


Figura 13. Sistema neuromuscular en cortes longitudinales de *B. lanceolatum* adultos.

Secciones de anfióxos fueron marcadas para revelar los núcleos con DAPI (blanco), los microtúbulos con anticuerpos contra tubulina (rojo), los microfilamentos con anticuerpos contra la α -actina (cian), y la matriz extracelular con sonda WGA (verde). Las imágenes A,E corresponden a esquemas de los ejes de cortes de anfióxos. B-D''' corresponden a secciones de la región medial y F-H''' a secciones de la región lateral del animal. La imagen C corresponde a la ampliación del cuadro en B; la imagen D es ampliación del cuadro en C; D'-D''' corresponden a la separación de canales de D. La imagen G corresponde a la ampliación del cuadro en F; la imagen H es ampliación del cuadro en G. las imágenes H'-H''' corresponden a la separación de canales del recuadro en H. Los componentes identificados son: el tubo neural (NT), la notocorda (No), los miotomas (M), los mioseptos (Ms) y el epitelio (Ep). Las flechas blancas indican las estructuras positivas para la tinción de BTX que se encuentran dentro del TN; las flechas amarillas indican la presencia de componente neural entre los mioseptos. Barra: 100 μ m.

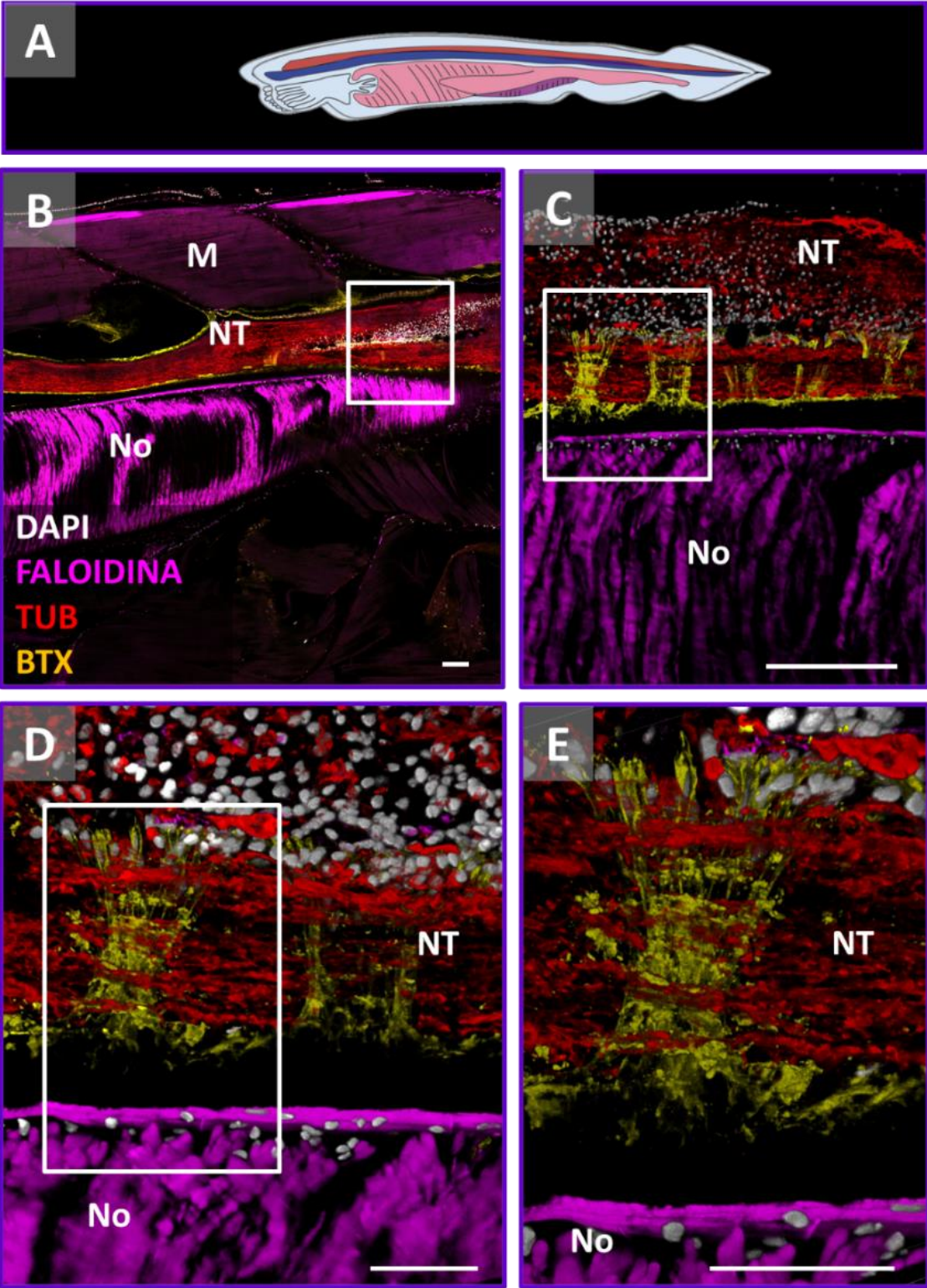


Figura 14. Distribución de nAChRs en cortes longitudinales de *B. lanceolatum* adultos.

Secciones de anfioxos fueron marcadas para revelar los núcleos con DAPI (blanco), los microtúbulos con anticuerpos contra tubulina (rojo) y la actina F con faloidina (magenta). A corresponde a un esquema del corte longitudinal del anfioxo. La imagen C corresponde a la ampliación del cuadro en B; la imagen D es ampliación del cuadro en C; E corresponde a la ampliación del cuadro en D. Los componentes identificados son: el tubo neural (NT), la notocorda (No) y los miotomas (M). Barra: B-C= 100 μm ; D-E= 30 μm .

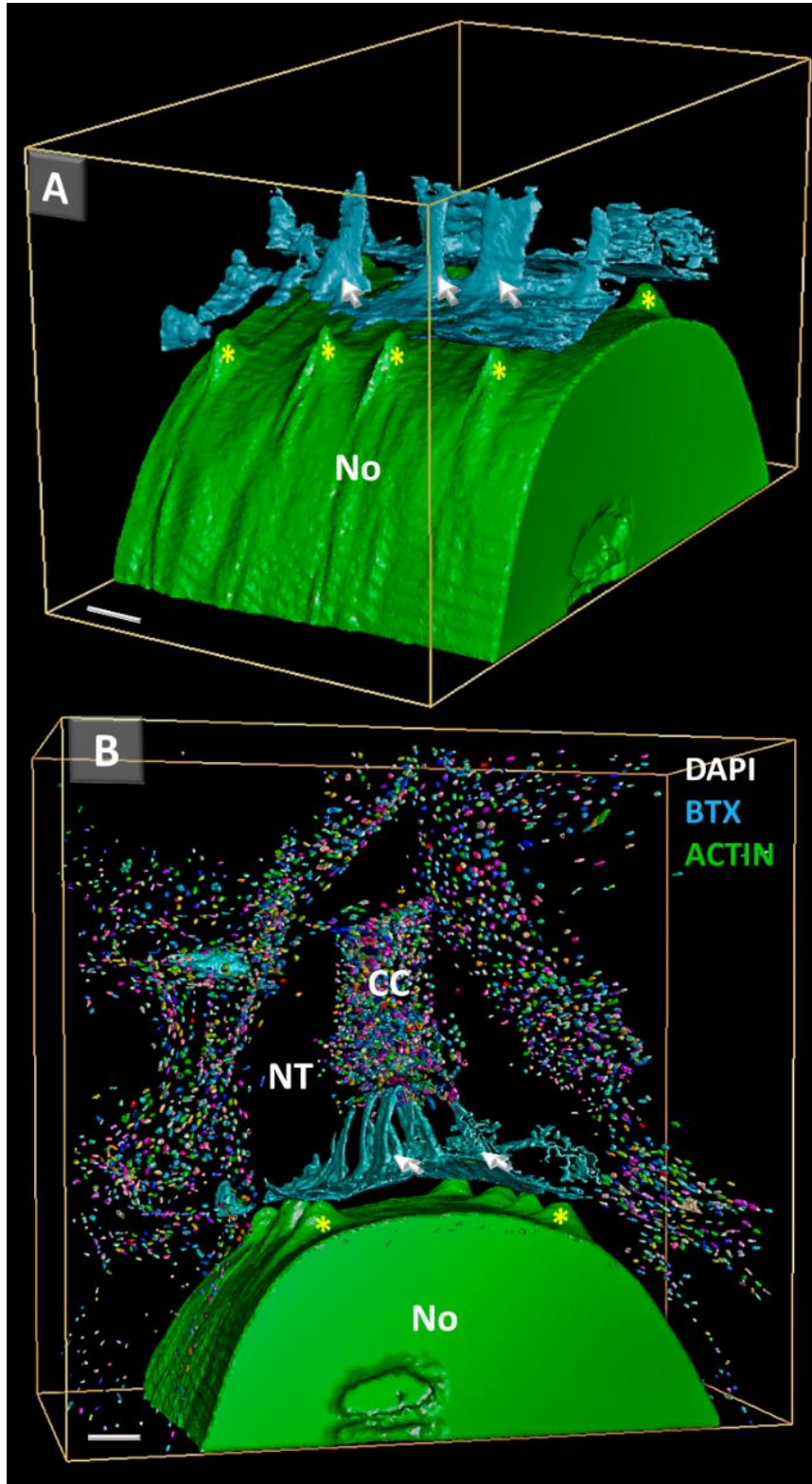


Figura 15. Distribución 3D de nAChRs en *B. lanceolatum* adultos.

Secciones de anfibios fueron marcadas para revelar los núcleos con DAPI (arcoíris), la notocorda con β -actina (verde) y los nAChRs con BTX (cian), los cuales posteriormente fueron reconstruidos en 3D. Los componentes identificados son: el tubo neural (NT), el canal central (CC) y la notocorda (No). Las flechas blancas indican las estructuras positivas para la tinción de BTX que se encuentran dentro del TN; los asteriscos amarillos indican la presencia de astas notocordales. Barra: 50 μ m.

7. Análisis comparativo de la presencia de las subunidades de nAChR en el genoma de *B. lanceolatum* respecto a otras especies.

Con el fin de identificar subunidades homólogas del nAChR entre especies y caracterizar la identidad del receptor presente en las sinapsis neuromusculares de *B. lanceolatum*, se realizó un análisis filogenético de los genes de las subunidades de nAChR en diferentes especies de animales. Los análisis de similitud de secuencias con el algoritmo BLAST arrojaron un total de 206 secuencias. El alineamiento múltiple de estas 206 secuencias de proteínas y su posterior procesamiento permitió la generación de un árbol filogenético del tipo “Vecino más cercano”, el cual es un método que permite estimar “distancia”, donde el algoritmo se basa en encontrar taxones vecinos y unirlos progresivamente añadiendo su ancestro en común. Debido a que el método genera arboles sin raíz, se debe añadir un taxón previamente conocido como “el más alejado de todo el resto”, y determinarlo como punto de inicio del árbol, lo que se conoce como *outgroup* o grupo externo (Aguado, 2015). En este caso, el árbol fue enraizado con los receptores 5HTR3A y 5HTR3B, los que fueron utilizados como grupo externo. Para mayor claridad, las homologías entre subunidades del nAChR de las diferentes especies animales fueron ordenadas por colores. Al momento de generar arboles filogenéticos, se debe evaluar la robustez de los clados generados. Para ello se utiliza el método de *bootstrap*, método estadístico que crea réplicas de los alineamientos generados a partir del original, creando diferentes arboles filogenéticos a partir de cada uno de los

nuevos alineamientos. Finalmente, se evalúa el porcentaje de veces que aparece cada nodo en cada uno de los árboles generados, estimándose como fiables los valores de *bootstrap* mayores a 90% (Aguado, 2015).

En relación a la especie *B. lanceolatum*, el árbol muestra que entre los miembros de la familia nAChR, la subfamilia compuesta por los genes CHRNA1 presenta mayor homología con los vertebrados, generando un *bootstrap* de 100%. Por su parte, los genes CHRNA9 y CHRNA10 presentan un valor de *bootstrap* de 99%; los genes CHRNA3, CHRNA5, CHRNA6 y CHRNB3 un *bootstrap* de 80%; los genes CHRNB2 y CHRNB4 un valor de 75%; y los genes CHRNA7, CHRNA8 y CHRNA11 un valor de *bootstrap* de 99% (Fig. 16). Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que existen genes ortólogos para las subunidades α_1 , α_3 , α_5 , α_6 , α_7 , α_8 , α_9 , α_{10} , α_{11} , además de las subunidades β_2 , β_3 y β_4 . Cabe señalar que los genes CHRNB1, CHRND, CHRNG y CHRNE no se han encontrado como parientes cercanos de los anfibios. Con estos resultados se puede concluir que el nAChR presente en las sinapsis neuromusculares de *B. lanceolatum* tiene una conformación distinta a la de los vertebrados.

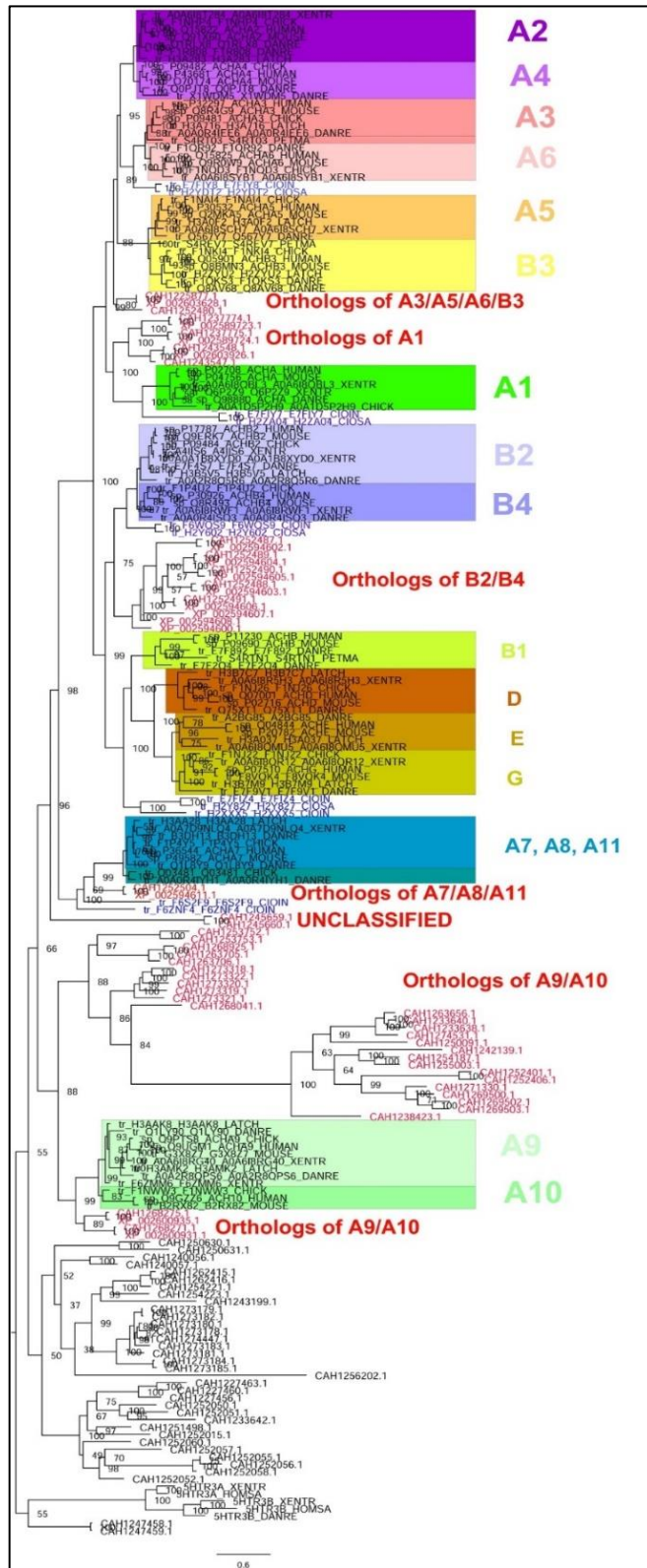


Figura 16. Árbol filogenético basado en análisis del vecino más cercano de las subunidades del nAChR en diferentes cordados.

El soporte estadístico basado en porcentaje de bootstrap se indican en los nodos que dan a lugar a los diferentes grupos de subunidades de nAChR. Las subunidades se etiquetaron de acuerdo a códigos en recuadros de colores específicos. Las subunidades ortólogas para *B. lanceolatum* se indican en color rojo.

VII. DISCUSIÓN

La UNM es la sinapsis que permite la contracción muscular, por lo que su integridad es esencial para el movimiento voluntario de los animales. La UNM ha sido estudiada en diversos modelos animales vertebrados e invertebrados. Sin embargo, para el estudio evolutivo de la UNM, modelos como *C. elegans* y *D. melanogaster* presentan grandes distancias evolutivas con los vertebrados.

El anfioxo, representante más antiguo del filo de los cordados, se considera actualmente un "fósil viviente" desde una perspectiva genómica y morfológica. Sus características únicas posicionan a esta especie no vertebrada como un intermediario clave para entender la aparición de los vertebrados. Los anfioxos se caracterizan por tener estructuras anatómicas similares a los vertebrados, pero más simples, por lo que han sido utilizados como un novedoso modelo de estudio de desarrollo evolutivo (Escriva, 2018). Más aun, el anfioxo es blanco de estudio para análisis de anatomía comparativa, ya que este animal posee rudimentarios órganos encontrados en los vertebrados, como por ejemplo la presencia de la fosa de Hatschek, el endostilo y el ciego hepático, los que corresponden a precursores homólogos de la hipófisis, la tiroides y el hígado en los vertebrados, respectivamente (Ogasawara, 2000; On et al., 2022; Wang & Zhang, 2011). En relación al sistema nervioso central del anfioxo, se ha identificado la vesícula cerebral, la que presenta un di-mesencéfalo equivalente a la región del tálamo, pretectum y mesencéfalo en los vertebrados, por lo que

estas regiones se encuentran evolutivamente relacionadas (Albuixech-Crespo et al., 2017). Además, en los anfibios adultos se ha identificado la región del neuropilo post-infundibular, que corresponde a un centro integrador que procesa la información sensorial, ya sea captando la luz presente en el ambiente y/o el contacto físico que reciben los anfibios, para así evaluar la toma de decisiones respecto a su nado, equivalente al tronco cerebral de los vertebrados (Lacalli, 2018).

Si bien existen investigaciones que evalúan la presencia y funcionalidad de componentes presinápticos (tubo neural) y postsinápticos (miotomas y notocorda) de las sinapsis neuromusculares de los anfibios, la ausencia de estudios de los receptores que participan en la UNM de estos animales motivó el presente trabajo. Basados en el conocimiento actual, abordamos este trabajo mediante la identificación de las regiones pre y postsinápticas de la especie *B. lanceolatum* en etapa adulta, lo que permitió a su vez visualizar la distribución de los nAChRs entre las estructuras anatómicas que participan de la natación del animal. Por otro lado, se analizó la presencia de secuencias que codifican para diferentes subunidades del nAChRs en el genoma de *B. lanceolatum*, encontrando subunidades homólogas de los nAChRs de vertebrados.

1. Caracterización de nAChRs en las sinapsis neuromusculares de *B. lanceolatum*

Los nAChRs de la UNM de los mamíferos presentan una estequiometría $\alpha_2\beta_1\gamma\delta$ en etapa prenatal, que se modifica a un pentámero $\alpha_2\beta_1\varepsilon\delta$, en la etapa postnatal (Cetin et al., 2020). Teniendo en consideración que los anfibios presentan características anatómicas similares a los peces, al evaluar la UNM del modelo pez cebra (*Danio rerio*), se han identificado nAChRs comparables a la de los mamíferos, ya que expresan subunidades α_1 , β_1 , γ , δ y ε . Sin embargo, al utilizar modelos mutantes de pez cebra con subunidades de nAChRs funcionales solo en músculos lentos, se ha observado que la subunidad δ tiene diferentes efectos en los nAChR de las fibras musculares lentas y rápidas (Park et al., 2014). La identidad de los nAChRs musculares en la evolución también ha sido estudiada en urocordados, invertebrados marinos que son los parientes filogenéticamente más cercanos a los vertebrados (Delsuc et al., 2006; Stach, 2008), de cuyo grupo el modelo más utilizado es la ascidia *Ciona intestinalis*. Experimentos en células musculares de larvas de *C. intestinalis* han permitido identificar genes ortólogos de vertebrados para la subunidad α_1 y $\beta_1\gamma\delta\varepsilon$, gen parálogo de las subunidades β_1 , γ , δ y ε encontradas en los nAChRs musculares de los vertebrados (Nishino et al., 2011). Filogenéticamente más alejado de los cordados, el nemátodo *Caenorhabditis elegans* ha sido un modelo crucial para estudiar los contactos neuromusculares. Al respecto, se sabe que *C. elegans* presenta una inervación neuromuscular colinérgica (excitatoria) y GABAérgica (inhibitoria) proveniente de

motoneuronas presentes dentro del cordón ventral, donde las motoneuronas colinérgicas forman sinapsis dobles innervando la musculatura y a las neuronas motoras GABAérgicas simultáneamente (Jospin et al., 2009). Así, la acetilcolina liberada desde las neuronas motoras estimula la contracción muscular sobre un lado del cuerpo, y simultáneamente activa una motoneurona inhibitoria que se proyecta hacia el lado opuesto del cuerpo, lo que produce la liberación de GABA y relaja a los músculos del lado contralateral, generándose una onda sinusoidal que se propaga desde la cabeza hasta la cola del nemátodo, permitiendo que se arrastre (Jospin et al., 2009). En *C. elegans*, se ha observado la presencia de subunidades α_1 y β_1 del nAChR que comparten una estrecha homología con las subunidades nAChR de músculo vertebrado (Fleming et al., 1997). Con respecto a la distribución de los nAChRs en los anfibios, nuestros estudios señalan concordancia con investigaciones previas mediante la detección de componentes presinápticos y postsinápticos de sinapsis colinérgicas en este animal (Candiani et al., 2008; Candiani et al., 2012; Flood, 1974), lo que corresponde a las interacciones neuromusculares entre el tubo neural con los miotomas y la notocorda. Sin embargo, al analizar el genoma de la especie *B. lanceolatum*, solo se encontró homología con la subunidad α_1 del nAChR presente en los músculos de los vertebrados.

De manera inesperada, nuestros experimentos permitieron identificar la presencia de nAChRs dentro del tubo neural, hallazgo para el que no existen precedentes. La BTX es una toxina que presenta alta afinidad y especificidad por

los nAChRs, por lo que ha sido ampliamente utilizada para la detección de estos receptores (Changeux et al., 1970). La BTX se une tanto a las subunidades α_1 (muscular) como α_7 (neuronal) de los nAChRs (Katchalski-Katzir et al., 2002). Al respecto, es importante recalcar que en la especie *C. elegans* se han encontrado subunidades de nAChRs que se asemejan a subunidades formadoras de pentámeros homómeros neuronales similares a receptores α_7 de vertebrados (Mongan et al., 2002). Nuestros resultados filogenéticos indican homología de la subunidad α_7 entre *B. lanceolatum* y vertebrados, hallazgo que abre la posibilidad de que el marcaje de BTX tanto dentro del tubo neural como en los contactos neuromusculares pudiera corresponder a la presencia de nAChRs de conformación neuronal en vertebrados, similar a lo encontrado en *C. elegans* (Mongan et al., 2002). Experimentos futuros de detección localizada de las distintas subunidades del receptor en anfibio permitirán corroborar esta idea.

2. Inervación neuromuscular de *B. lanceolatum*

En vertebrados, la UNM es una sinapsis periférica de tipo colinérgica, formada por el terminal presináptico de una neurona motora, la especialización postsináptica de una fibra muscular esquelética y células de Schwann terminales que cubren al terminal nervioso (Sanes & Lichtman, 2001). Para poder efectuar el movimiento voluntario, los axones de las motoneuronas que se encuentran en

la asta ventral de la médula espinal migran a través de las raíces ventrales de la médula hasta inervar la región central de las fibras musculares (Sanes & Lichtman, 1999). Se ha observado que en la especie anfibia *Xenopus tropicalis*, la inervación producida por los axones de las motoneuronas se produce en los extremos de los miotomas musculares de las ranas (Godfrey et al., 1999). En relación al pez cebra, se han descrito tres patrones de inervación neuromuscular del musculo axial: (1) inervación localizada al centro de los miotomas, que es más prevalente en los mamíferos, (2) inervación distribuida, donde existen terminaciones nerviosas dispersas por toda la longitud de la fibra muscular y (3) inervación mioseptal, que corresponde a terminaciones nerviosas localizadas en los extremos de las fibras musculares, como ocurre en *X. tropicalis* (Lefebvre et al., 2007). Por otra parte, las lampreas, que corresponden a vertebrados sin mandíbula, presentan láminas musculares miotomales clasificadas en lentas (parietales) y rápidas (centrales) (Teräväinen, 1971) al igual que el anfibio. Mientras las láminas musculares parietales presentan una inervación directa con múltiples UNMs, las láminas musculares centrales presentan inervación motora directa solo en los extremos mioseptales (inervación mioseptal), siendo el resto de las láminas musculares inervadas mediante sinapsis eléctricas, lo que indica un patrón evolutivo más primitivo en relación a los vertebrados (Nakao, 1976). Por su parte, el urocordado *C. intestinalis* presenta en etapa larvaria una forma de renacuajo con bandas musculares bilaterales, un tubo neural y una notocorda axial (Nishino et al., 2011). La cola bilateral está conformada por células

musculares estriadas y mononucleadas (Razy-Krajka & Stolfi, 2019), al igual que los anfioxos (Dennisson et al., 2010). El movimiento de la cola muscular se debe a la presencia de 18 células musculares a cada lado, innervadas por 4 a 5 pares de motoneuronas colinérgicas ubicadas en el ganglio motor del animal, lo que permite la contracción muscular alternada de derecha a izquierda (Nishino et al., 2011). Las motoneuronas colinérgicas presentes en el tubo neural proyectan axones por la cola e innervan una parte de las células musculares, principalmente dorsales, mientras que otras reciben excitación a través de uniones comunicantes entre sus miofibrillas, comportándose como un sincitio, similar a los cardiomiocitos de los vertebrados (Razy-Krajka & Stolfi, 2019). Tanto en anfioxo como en lampreas no se ha descrito la presencia de este tipo de uniones entre células musculares.

En cuanto al nemátodo *C. elegans*, el SNC se divide en la porción del neuropilo sináptico, que cuenta con un anillo nervioso, y cordones nerviosos que recorren el resto del cuerpo, los que se dividen a su vez en cordón nervioso ventral (VNC) y cordón nervioso dorsal (DNC). Para producir el movimiento de arrastre del animal, un grupo de motoneuronas del VNC extiende procesos circunferenciales o “comisuras” dorsales para generar el DNC, permitiendo así la flexión ventral/dorsal. La UNM de *C. elegans* se genera mediante la extensión de “brazos musculares” provenientes de células musculares agrupadas en cuatro cuadrantes que rodean a los cordones nerviosos (Hall et al., 2005), similar a la sinapsis neuromuscular producida entre los miotomas y el tubo neural en el

anfioxo (Flood, 1966). Al igual que en larvas de urocordados y lampreas, se han observado sinapsis eléctricas mediante uniones comunicantes entre miocitos, pero no entre motoneuronas y miocitos (Hall et al., 2005). Si bien el mecanismo por el que se generan los procesos musculares provenientes de los miotomas en los anfioxos es desconocido, en los urocordados se ha observado que los brazos musculares que contactan a los cordones nerviosos se producen gracias al contacto que genera el soma del mioblasto de cada célula muscular con la motoneurona presináptica correspondiente, generando un puente citoplasmático al alejarse la célula muscular del cordón nervioso (Hall et al., 2005). Esta información provee una posible explicación a la peculiar distribución anatómica presente en los contactos neuromusculares entre los miotomas y el tubo neural en *B. lanceolatum*.

3. Componente presináptico observado en *B. lanceolatum*

La médula espinal en vertebrados está organizada en astas ventrales, que contienen a las neuronas motoras, y en astas dorsales, que participan del sistema sensorial (Ross, 2015). Tal como detectamos en cortes longitudinales teñidos con α -tubulina y marcador de neurofilamentos, el sistema nervioso periférico sensitivo del anfioxo extiende nervios dorsales que pasan entre los mioseptos desde el tubo neural hacia la epidermis, generando plexos periféricos conformados por

terminaciones nerviosas libres que comandan la conducta motora de escape del animal. Sin embargo, a diferencia de los vertebrados, en los anfibios no se han descrito homólogos de ganglios sensitivos (Holland & Somorjai, 2020c; Wicht & Lacalli, 2005).

Si bien la inervación neuromuscular del anfibio es distinta a la de los vertebrados, el tubo neural de los anfibios se encuentra dividido en una región dorsal de función sensitiva y una región ventral de función motora (Flood, 1966), similar a lo ocurrido en las astas dorsales y ventrales de la médula espinal en vertebrados, respectivamente (Purves, 2008). Es importante señalar que el sistema nervioso del anfibio no está vascularizado (Sarnat et al., 1975) y los procesos axonales y dendríticos de sus neuronas no están mielinizados. Sin embargo, diversos estudios indican que las neuronas del SN de los anfibios, tanto neuromuscular como sensorial, están rodeadas por células gliales denominadas glías de Müller, las que podrían ser el equivalente a las células terminales de Schwann de los vertebrados (Holland & Somorjai, 2020c; Wicht & Lacalli, 2005). De manera interesante desde la perspectiva evolutiva, las lampreas presentan raíces ventrales primitivas que presentan células de Schwann alrededor de los axones que contactan a las láminas musculares presentes en los miotomas (Nakao & Ishizawa, 1987), lo que sugiere que el anfibio podría ser el modelo antecesor de la UNM de los vertebrados.

El patrón muscular de los miotomas de los anfioxos, corresponde a la presencia de láminas musculares superficiales de contracción lenta, ubicadas en el extremo lateral del miotoma, y láminas musculares profundas de contracción rápida que se extienden desde la superficie lateral a medial del miotoma (Flood, 1967). Este patrón de organización muscular se evidenció en cortes longitudinales y transversales marcados con α -actina y actina F (faloidina), en donde se observa un patrón de marcaje que concuerda con dicha descripción (Flood, 1967). Además, el control locomotor de los modos de natación lenta y rápida del anfioxo se produce gracias al centro motor primario (PMC), ubicado en el tubo neural anterior de los anfioxos, región equivalente al prosencéfalo y mesencéfalo de los vertebrados. Este sistema se encuentra coordinado por neuronas pareadas grandes (LPN), motoneuronas y neuronas ipsilaterales (IPN) de carácter excitatorio, así como por neuronas comisurales (CN), de transmisión inhibitoria (Lacalli & Candiani, 2017). Mediante experimentos de hibridación *in situ*, se ha detectado la expresión del transportador vesicular de glutamato (VGLUT) (sinapsis glutamatérgicas), VACHT (sinapsis colinérgicas) y el transportador vesicular de GABA (VGAT) (sinapsis GABAérgicas) dentro del tubo neural, respectivamente (Candiani et al., 2012). Si bien estos estudios están realizados en anfioxos en etapa larvaria, la detección de VACHT en motoneuronas que forman parte del PMC podría explicar la detección de nAChRs en forma de arco dentro del tubo neural.

La activación del sistema motor en anfibios se produce por las entradas sinápticas excitatorias provenientes de las células sensoriales epiteliales, cuyas fibras ingresan a la médula espinal a través de los nervios rostrales y dorsales, de las células bipolares dorsales anteriores y de las LPN y las IPN, las que se encuentran en el VC del tubo neural (rápido) (Lacalli & Candiani, 2017). Además, se ha descrito un sistema lento, que corresponde al DC del tubo neural, que está casi desprovisto de entradas sinápticas (Lacalli & Candiani, 2017). El tercer par de LPN (LPN3), son las más importantes y están innervadas bilateralmente, lo que indica que se pueden inhibir mutuamente. Las LPN3 generan sinapsis con las motoneuronas colinérgicas del compartimiento ventral del tubo neural (VC = rápido), y a la vez se comunican por medio de uniones yuxtarréticas con las motoneuronas del compartimiento dorsal (DC = lento), por lo que los autores de estas investigaciones plantean que las LPN3 son las neuronas que median el nado rápido y lento, sin producir interferencia entre ellos. Aun cuando no se ha dilucidado en detalle la coordinación de este sistema (Lacalli & Candiani, 2017), estos antecedentes demuestran similitudes en la complejidad del funcionamiento del SNC de los anfibios con los vertebrados, específicamente respecto a la planificación y ejecución de movimientos.

4. Componentes postsinápticos de *B. lanceolatum*

Los anfioxos poseen dos grandes componentes musculares a lo largo de su cuerpo, los miotomas y la notocorda. Se ha descrito que las láminas musculares de los miotomas presentan una marcada sarcomerización, con bandas A de 1,6 μm de longitud, al igual que en los vertebrados (Hagiwara et al., 1971). Se ha observado que los sarcómeros de los invertebrados no presentan la proteína nebulina, cuya función en vertebrados es modular la longitud de los filamentos de actina sarcomérica. Sin embargo, se ha detectado la expresión de nebulina en sarcómeros miotomales del anfioxo cumpliendo el mismo rol que en los vertebrados (Hanashima, 2009). Otra característica similar que presentan las láminas musculares de los anfioxos con las de los vertebrados es la presencia de retículo sarcoplásmico, el que se encuentra rodeando a cada lámina muscular a nivel de la Banda I (Hagiwara et al., 1971). Respecto a los miotomas, se ha demostrado que la troponina C de los anfioxos, al igual que en vertebrados, actúa como un inhibidor del complejo actina-miosina en ausencia de Ca^{2+} . En los ascidios (urocordados), al estar en ausencia de Ca^{2+} , la troponina C no produce una inhibición de la interacción entre actina y miosina, como sucede con los anfioxos y los vertebrados (Endo & Obinata, 1981). A nivel evolutivo, a partir de estas observaciones se podría especular que la troponina vertebrada heredó características estructurales y funcionales de la troponina de los anfioxos (Dennisson et al., 2010). Este estudio demostró además que la presencia de Ca^{2+}

permite la contracción muscular en miotomas y músculos abdominales transversos, pero no en la notocorda de los anfioxos (Dennisson et al., 2010). En su conjunto, estos hallazgos muestran que a pesar de que los anfioxos son filogenéticamente más lejanos a los vertebrados que los urocordados, los anfioxos presentan una mayor similitud en los componentes musculares miotomales.

VIII. CONCLUSIONES

1. Existe la presencia de nAChRs en las interacciones neuromusculares del tubo neural con los procesos musculares de los miotomas y con el asta notocordal en *B. lanceolatum*.
2. La conformación del nAChR de las sinapsis neuromusculares de *B. lanceolatum* es diferente a la de los vertebrados.

IX. PROYECCIONES

Una de las principales características relevantes para el estudio de la UNM de los anfioxos está relacionada con la capacidad regenerativa de su extremo anterior y posterior, que implica la regeneración de los cilios bucales, su aleta dorsal, la notocorda, el tubo neural y los miotomas. Además, gracias a la secuenciación genómica de los anfioxos, se ha descubierto que poseen una arquitectura genómica simple, ya que carecen de la duplicación genómica observada en vertebrados, lo que convierte a este modelo experimental en un punto clave para estudiar la evolución de los mecanismos regenerativos en cordados (Somorjai et al., 2012).

Experimentos de regeneración en anfioxo han mostrado que, al dañarse estructuras vitales como la faringe, la cesta braquial o el divertículo hepático, disminuye la capacidad regenerativa o bien, puede desencadenarse la muerte del animal. La regeneración del anfioxo comienza con la formación de un blastema. A la segunda semana luego de la amputación de la cola, se puede observar que la notocorda contiene células aplanadas, perdiendo su organización de pilas de monedas. A la sexta semana desde la amputación, la notocorda que se encontraba desdiferenciada vuelve a formar laminillas musculares. Este ejemplo de cambio morfológico sugiere una regeneración mediante desdiferenciación de estructuras existentes (Somorjai et al., 2012). Además, se observó que los anfioxos más viejos y de mayor tamaño se regeneran más lento y/o más ineficientemente que animales jóvenes o de menor tamaño (Somorjai et al., 2012). Sumado a esta evidencia, experimentos recientes indican que la especie *Asymmetron lucayanum* posee la

capacidad de regeneración más rápida entre las especies de anfibios más estudiadas, alcanzando el 35% del total de la cola amputada después de 14 días, sin depender del tamaño del animal (Holland & Somorjai, 2020b). Esta regeneración es mucho más rápida en comparación a las lampreas, las que presentan una recuperación funcional luego de 10 a 12 semanas posterior a un corte en la médula espinal (Hanslik et al., 2019). Por lo tanto, los anfibios se convierten en un excelente modelo de estudio debido a su rápida regeneración.

En vertebrados, un componente esencial de la regeneración muscular corresponde a las células satélite. De manera interesante, en el anfibio se ha descubierto un genotipo de Pax 3/7, homólogo a los genes maestros de la regeneración muscular de vertebrados Pax3 y Pax7, que además se expresan durante la somitogénesis de los vertebrados (Barton-Owen et al., 2018; Somorjai et al., 2012). Sin embargo, se desconoce la posible regeneración de contactos neuromusculares en el anfibio. A partir de estos hallazgos, se puede proyectar que el anfibio posee un potencial relevante para abordar los mecanismos moleculares complejos conservados en diferentes especies animales, incluyendo futuras investigaciones sobre la activación de mecanismos de regeneración de sinapsis neuromusculares.

X. REFERENCIAS

Aguado, M. T. (2015). *Métodos y técnicas para el estudio de la filogenia* (1° edición).

Albuixech-Crespo, B., López-Blanch, L., Burguera, D., Maeso, I., Sánchez-Arrones, L., Moreno-Bravo, J. A., ... Ferran, J. L. (2017). Molecular regionalization of the developing amphioxus neural tube challenges major partitions of the vertebrate brain. *PLOS Biology*, 15(4), e2001573. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001573>

Ampatzis, K., Song, J., Ausborn, J., & El Manira, A. (2013). Pattern of Innervation and Recruitment of Different Classes of Motoneurons in Adult Zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 33(26), 10875–10886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0896-13.2013>

Banks, J. R. (1970). Observations on the Function and Physiological Properties of a Fast Paramyosin Muscle--The Notochord Of Amphioxus (Branchiostoma Lanceolatum). *Journal of Experimental Biology*, 52(1), 125–138.

Barton-Owen, T. B., Ferrier, D. E. K., & Somorjai, I. M. L. (2018). Pax3/7 duplicated and diverged independently in amphioxus, the basal chordate lineage. *Scientific Reports*, 8(1), 9414. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27700-x>

Bocina, I., & Saraga-babic, M. (2009). The neuromuscular junction in the amphioxus myotomes revealed by an ultrastructural and immunohistochemical study. *Life Sciences*, 2(1975), 79–80.

- Broadie, & Bate. (1993). Development of the embryonic neuromuscular synapse of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Neuroscience*, 13(1), 144–166. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-01-00144.1993>
- Candiani, S., Lacalli, T. C., Parodi, M., Oliveri, D., & Pestarino, M. (2008). The cholinergic gene locus in amphioxus: Molecular characterization and developmental expression patterns. *Developmental Dynamics*, 237(5), 1399–1411. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21541>
- Candiani, S., Moronti, L., Ramoino, P., Schubert, M., & Pestarino, M. (2012). A neurochemical map of the developing amphioxus nervous system. *BMC Neuroscience*, 13(1), 59. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-59>
- Carvalho, J. E., Lahaye, F., & Schubert, M. (2017). Keeping amphioxus in the laboratory: an update on available husbandry methods. *The International Journal of Developmental Biology*, 61(10-11–12), 773–783. <https://doi.org/10.1387/ijdb.170192ms>
- Castellani-Ceresa, L., & Lanzavecchia, G. (1982). Isolation and identification of paramyosin from amphioxus notochord. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 3(1), 75–85. <https://doi.org/10.1007/BF00711881>
- Castro, A., Becerra, M., Manso, M. J., & Anadón, R. (2015). Neuronal organization of the brain in the adult amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*): A study with acetylated tubulin immunohistochemistry. *Journal of Comparative Neurology*, 523(15), 2211–2232. <https://doi.org/10.1002/cne.23785>

- Cetin, H., Beeson, D., Vincent, A., & Webster, R. (2020). The Structure, Function, and Physiology of the Fetal and Adult Acetylcholine Receptor in Muscle. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.581097>
- Changeux, J.-P., Kasai, M., & Lee, C.-Y. (1970). Use of a Snake Venom Toxin to Characterize the Cholinergic Receptor Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 67(3), 1241–1247. <https://doi.org/10.1073/pnas.67.3.1241>
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, 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>
- Dennisson, J. G., Tando, Y., Sato, N., Ogasawara, M., Kubokawa, K., & Obinata, T. (2010). Functional Characteristics of Amphioxus Troponin in Regulation of Muscle Contraction. *Zoological Science*, 27(6), 461–469. <https://doi.org/10.2108/zsj.27.461>
- Endo, & Obinata. (1981). Troponin and Its Components from Ascidian Smooth Muscle. *The Journal of Biochemistry*, 89(5), 1599–1608. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133355>
- Escriva, H. (2018). My Favorite Animal, Amphioxus: Unparalleled for Studying Early Vertebrate Evolution. *BioEssays*, 40(12), 1800130. <https://doi.org/10.1002/bies.201800130>

- Fleming, J. T., Squire, M. D., Barnes, T. M., Tornoe, C., Matsuda, K., Ahnn, J., ... Lewis, J. A. (1997). *Caenorhabditis elegans* Levamisole Resistance Genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* Encode Functional Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits. *The Journal of Neuroscience*, 17(15), 5843–5857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05843.1997>
- Flood. (1966). A Peculiar Mode of Muscular Innervation in *Amphioxus*. *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY*, 126(February), 181–218.
- Flood. (1970). The connection between spinal cord and notochord in *Amphioxus* (*Branchiostoma lanceolatum*). *Zeitschrift for Zellforschung*, 103(1), 115–128. <https://doi.org/10.1007/BF00335405>
- Flood. (1974). Histochemistry of cholinesterase in *amphioxus* (*Branchiostoma lanceolatum*, pallas). *The Journal of Comparative Neurology*, 157(4), 407–437. <https://doi.org/10.1002/cne.901570405>
- Flood, Guthrie, D. M., & Banks, J. R. (1969). Paramyosin Muscle in the Notochord of *Amphioxus*. *Nature*, 222(5188), 87–88. <https://doi.org/10.1038/222087a0>
- Flood, P. R. (1967). Structure of the segmental trunk muscle in *amphioxus*. *Zeitschrift for Zellforschung*, 84(3), 389–416. <https://doi.org/10.1007/BF00334754>
- Foellmer, H. G., & Madri, J. A. (1983). *Methods in laboratory investigation . Monoclonal antibodies to type IV collagen : Probes for the study of structure and function of basement membranes*. (June).

- Gemballa, S., Weitbrecht, G. W., & Sánchez-Villagra, M. R. (2003). The myosepta in *Branchiostoma lanceolatum* (Cephalochordata): 3D reconstruction and microanatomy. *Zoomorphology*, 122(4), 169–179. <https://doi.org/10.1007/s00435-003-0082-3>
- Godfrey, E. W., Roe, J., & Heathcote, R. D. (1999). Overexpression of Agrin Isoforms in *Xenopus* Embryos Alters the Distribution of Synaptic Acetylcholine Receptors during Development of the Neuromuscular Junction. *Developmental Biology*, 205(1), 22–32. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9104>
- Hagiwara, S., Henkart, M. P., & Kidokoro, Y. (1971). Excitation-contraction coupling in amphioxus muscle cells. *The Journal of Physiology*, 219(1), 233–251. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1971.sp009659>
- Hall, D. H., Lints, R., & Altun, Z. (2005). Nematode Neurons: Anatomy and Anatomical Methods in *Caenorhabditis elegans*. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 69, pp. 1–35). [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(05\)69001-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)69001-0)
- Hanashima, A., Kubokawa, K., & Kimura, S. (2009). Characterization of amphioxus nebulin and its similarity to human nebulin. *Journal of Experimental Biology*, 212(5), 668–672. <https://doi.org/10.1242/jeb.022681>
- Hanslik, K. L., Allen, S. R., Harkenrider, T. L., Fogerson, S. M., Guadarrama, E., & Morgan, J. R. (2019). Regenerative capacity in the lamprey spinal cord is not altered after a repeated transection. *PLOS ONE*, 14(1), e0204193.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204193>

Hebbar, S., Hall, R. E., Demski, S. A., Subramanian, A., & Fernandes, J. J. (2006). The adult abdominal neuromuscular junction of *Drosophila*: A model for synaptic plasticity. *Journal of Neurobiology*, 66(10), 1140–1155. <https://doi.org/10.1002/neu.20279>

Holland, L. Z. (2015). Cephalochordata. In *Evolutionary developmental biology of invertebrates* (pp. 91–133). Springer, Vienna.

Holland, N. D., & Somorjai, I. M. L. (2020a). Serial blockface SEM suggests that stem cells may participate in adult notochord growth in an invertebrate chordate, the Bahamas lancelet. *EvoDevo*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13227-020-00167-6>

Holland, N. D., & Somorjai, I. M. L. (2020b). Tail regeneration in a cephalochordate, the Bahamas lancelet, *Asymmetron lucayanum*. *Journal of Morphology*, 282(2), 217–229. <https://doi.org/10.1002/jmor.21297>

Holland, N. D., & Somorjai, I. M. L. (2020c). The sensory peripheral nervous system in the tail of a cephalochordate studied by serial blockface scanning electron microscopy. *Journal of Comparative Neurology*, 528(15), 2569–2582. <https://doi.org/10.1002/cne.24913>

Huxley, H. E. (1957). THE DOUBLE ARRAY OF FILAMENTS IN CROSS-STRIATED MUSCLE. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3(5), 631–648. <https://doi.org/10.1083/jcb.3.5.631>

- Igawa, T., Nozawa, M., Suzuki, D. G., Reimer, J. D., Morov, A. R., Wang, Y., ... Yasui, K. (2017). Evolutionary history of the extant amphioxus lineage with shallow-branching diversification. *Scientific Reports*, 7(1), 1157. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00786-5>
- Jospin, M., Qi, Y. B., Stawicki, T. M., Boulin, T., Schuske, K. R., Horvitz, H. R., ... Jin, Y. (2009). A Neuronal Acetylcholine Receptor Regulates the Balance of Muscle Excitation and Inhibition in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biology*, 7(12), e1000265. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000265>
- Katchalski-Katzir, E., Kasher, R., Balass, M., Scherf, T., Harel, M., Fridkin, M., ... Fuchs, S. (2002). Design and synthesis of peptides that bind α -bungarotoxin with high affinity and mimic the three-dimensional structure of the binding-site of acetylcholine receptor. *Biophysical Chemistry*, 100(1–3), 293–305. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00287-9](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00287-9)
- Kiernan, J. A. (2013). *Barr El Sistema Nervioso Humano: Una Perspectiva Anatómica* (9°). Wolters Kluwer.
- Lacalli, T. (2018). Amphioxus neurocircuits, enhanced arousal, and the origin of vertebrate consciousness. *Consciousness and Cognition*, 62(March), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.concog.2018.03.006>
- Lacalli, T. C. (2002). The dorsal compartment locomotory control system in amphioxus larvae. *Journal of Morphology*, 252(3), 227–237. <https://doi.org/10.1002/jmor.1101>

- Lacalli, T., & Candiani, S. (2017). Locomotory control in amphioxus larvae: new insights from neurotransmitter data. *EvoDevo*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13227-017-0067-9>
- Lefebvre, J. L., Jing, L., Becaficco, S., Franzini-Armstrong, C., & Granato, M. (2007). Differential requirement for MuSK and dystroglycan in generating patterns of neuromuscular innervation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2483–2488. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610822104>
- Lodish, H. (2005). Formación y función de las vesículas sinápticas. In *Biología molecular y celular* (5ta edición, pp. 735–740).
- Martínez, E., Marcellini, S., & Henríquez, J. (2022). Beyond vertebrates: the amphioxus as a relevant model system to explore the formation, organization, and regeneration of neuromuscular synapses. *Neural Regeneration Research*, 17(11), 2425. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.338994>
- Michael H. Ross; Wojciech Pawlina. (2015). *Histología texto y atlas* (7° edición).
- Minguillón, C., Ferrier, D. E. K., Cebrián, C., & Garcia-Fernández, J. (2002). Gene duplications in the prototypical cephalochordate amphioxus. *Gene*, 287(1–2), 121–128. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00828-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00828-9)
- Mongan, N. P., Jones, A. K., Smith, G. R., Sansom, M. S. P., & Sattelle, D. B. (2002). Novel $\alpha 7$ -like nicotinic acetylcholine receptor subunits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Protein Science*, 11(5), 1162–1171. <https://doi.org/10.1110/ps.3040102>

- Nakao, T. (1976). An electron microscopic study of the neuromuscular junction in the myotomes of larval lamprey, *Lampetra japonica*. *The Journal of Comparative Neurology*, 165(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/cne.901650102>
- Nakao, T., & Ishizawa, A. (1987). Development of the spinal nerves in the lamprey: I. Rohon-beard cells and interneurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 256(3), 342–355. <https://doi.org/10.1002/cne.902560304>
- Nguyen, M. L., Cox, G. D., & Parsons, S. M. (1998). Kinetic Parameters for the Vesicular Acetylcholine Transporter: Two Protons Are Exchanged for One Acetylcholine †. *Biochemistry*, 37(38), 13400–13410. <https://doi.org/10.1021/bi9802263>
- Nishino, A., Baba, S. A., & Okamura, Y. (2011). A mechanism for graded motor control encoded in the channel properties of the muscle ACh receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2599–2604. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013547108>
- Ogasawara, M. (2000). Overlapping expression of amphioxus homologs of the thyroid transcription factor-1 gene and thyroid peroxidase gene in the endostyle: insight into evolution of the thyroid gland. *Development, Genes and Evolution*, 210(5), 231. <https://doi.org/10.1007/s004270050309>
- On, J. S. W., Su, L., Shen, H., Arokiaraj, A. W. R., Cardoso, J. C. R., Li, G., & Chow, B. K. C. (2022). PACAP/GCGa Is an Important Modulator of the Amphioxus CNS-Hatschek's Pit Axis, the Homolog of the Vertebrate Hypothalamic-Pituitary

- Axis in the Basal Chordates. *Frontiers in Endocrinology*, 13(April), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.850040>
- Park, J.-Y., Mott, M., Williams, T., Ikeda, H., Wen, H., Linhoff, M., & Ono, F. (2014). A Single Mutation in the Acetylcholine Receptor α -Subunit Causes Distinct Effects in Two Types of Neuromuscular Synapses. *Journal of Neuroscience*, 34(31), 10211–10218. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0426-14.2014>
- Pedersen, J. E., Bergqvist, C. A., & Larhammar, D. (2019). Evolution of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1341-8>
- Purves, D. (2008). *Neurociencia* (3ra edicio). Madrid.
- Raftery, M., Hunkapiller, M., Strader, C., & Hood, L. (1980). Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science*, 208(4451), 1454–1456. <https://doi.org/10.1126/science.7384786>
- Razy-Krajka, F., & Stolfi, A. (2019). Regulation and evolution of muscle development in tunicates. *EvoDevo*, 10(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13227-019-0125-6>
- Richardson, C. E., & Shen, K. (2019). Neurite Development and Repair in Worms and Flies. *Annual Review of Neuroscience*, 42(1), 209–226. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050208>
- Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (1999). DEVELOPMENT OF THE VERTEBRATE NEUROMUSCULAR JUNCTION. *Annual Review of Neuroscience*, 22(1), 389–

442. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.389>

Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2001). INDUCTION, ASSEMBLY, MATURATION AND MAINTENANCE OF A POSTSYNAPTIC APPARATUS. *Nature*, 2(November), 791–805.

Sarnat, H. B., Campa, J. F., & Lloyd, J. M. (1975). Inverse prominence of ependyma and capillaries in the spinal cord of vertebrates: A comparative histochemical study. *American Journal of Anatomy*, 143(4), 439–449. <https://doi.org/10.1002/aja.1001430403>

Somorjai, I. M. L., Somorjai, R. L., Garcia-Fernàndez, J., & Escrivà, H. (2012). Vertebrate-like regeneration in the invertebrate chordate amphioxus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), 517–522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100045109>

Stach, T. (2008). Chordate phylogeny and evolution: a not so simple three-taxon problem. *Journal of Zoology*, 276(2), 117–141. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00497.x>

Stach, Thomas. (1999). The ontogeny of the notochord of Branchiostoma lanceolatum. *Acta Zoologica*, 80(1), 25–33. <https://doi.org/10.1046/j.1463-6395.1999.20007.x>

Suzuki, M. M., & Satoh, N. (2000). Genes Expressed in the Amphioxus Notochord Revealed by EST Analysis. *Developmental Biology*, 224(2), 168–177. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9796>

- Teräväinen, H. (1971). Anatomical and physiological studies on muscles of lamprey. *Journal of Neurophysiology*, 34(6), 954–973. <https://doi.org/10.1152/jn.1971.34.6.954>
- Wang, Y., & Zhang, S. (2011). Identification and expression of liver-specific genes after LPS challenge in amphioxus: the hepatic cecum as liver-like organ and “pre-hepatic” acute phase response. *Functional & Integrative Genomics*, 11(1), 111–118. <https://doi.org/10.1007/s10142-010-0199-7>
- Webb, J. E. (1973). The role of the notochord in forward and reverse swimming and burrowing in the amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. *Journal of Zoology*, 170(3), 325–338. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1973.tb01381.x>
- Wicht, H., & Lacalli, T. C. (2005). The nervous system of amphioxus: structure, development, and evolutionary significance. *Canadian Journal of Zoology*, 83(1), 122–150. <https://doi.org/10.1139/z04-163>
- Zelada, D., Bermedo-García, F., Collao, N., & Henríquez, J. P. (2021). Motor function recovery: deciphering a regenerative niche at the neuromuscular synapse. *Biological Reviews*, 96(2), 752–766. <https://doi.org/10.1111/brv.12675>