



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Genoarquitectura del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario del anfibio: implicaciones evolutivas para el origen del cerebro de vertebrados

Beatriz Albuixech Crespo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Programa de doctorado

Tesis Doctoral presentada por

Beatriz Albuixech Crespo

bajo el título

**Genoarquitectura del sistema nervioso en desarrollo embrionario del anfibio:
implicaciones para el origen del cerebro de vertebrados.**

Para optar al título de Doctor por la Universitat de Barcelona

Firmado, la doctoranda

Firmado, el director:

Dr. Jordi Garcia-Fernández

Komura negó con la cabeza.
-¿Es que queda muy lejos, no?
Komura asintió y miró a su alrededor.
-Pero, ahora que estoy aquí, no parece que haya llegado tan lejos. Es curioso.
Eso lo hace el *avión*, que va muy deprisa- dijo Shimao-. El cuerpo se mueve, pero la
consciencia no le sigue.
-Puede ser.
-¿Querías venir tan lejos?
-*Supongo* que sí.

Haruki Murakami. *Después del terremoto*

Índice

Introducción	5
Neuroanatomía de vertebrados	7
La genoarquitectura	10
Ontogenia del sistema nervioso de los vertebrados.....	13
Establecimiento de los ejes	15
Organizadores secundarios	16
Sistemas nerviosos en invertebrados No-Deuteróstomos.....	19
Artrópodos	19
Anélidos	19
Sistemas nerviosos en invertebrados Deuteróstomos.....	21
Equinodermos	21
Hemicordados	23
El sistema nervioso de cefalocordados	26
Inervación	27
Citoarquitectura del tubo neural del anfiexo adulto	29
Neurulación en anfiexo	34
Genoarquitectura del anfiexo en desarrollo	35
Bibliografía de la introducción	41
Objetivos.....	51
Resultados	53
Las principales divisiones rostrocaudales.....	54
El DiMeP	54
El HyP y sus subdivisiones	56
Las Fronteras HyP/DiMeP/ RhSp	59
La metamerización caudal: El RhSp	60
Regionalización del suelo de la placa y la notocorda	63
Regionalización temprana de la placa neural.....	66
Otros marcadores neurales y no neurales.....	68
Estudio funcional en vertebrados.....	69
Bibliografía de los resultados	72
Discusión.....	75
La placa neural del anfiexo y su genoarquitectura.....	75
Aplicación del modelo en placa neural para la identificación de derivados del tubo neural del anfiexo adulto: correspondencias ontogenéticas	78
Derivados del HyP: El ojo frontal	79
Derivados del DiMeP.....	80
Derivados del RhSp	80

Implicaciones para los derivados neurales en vertebrados: Buscando el plan corporal de cordados	81
El ojo frontal y órganos fotorreceptores.....	81
Organobalance/reloj circadiano	82
El DiMeP y sus derivados: el órgano infundibular	83
El DiMeP y sus derivados: el cuerpo lamelar.....	84
El RhSp: el final de la vesícula cerebral	84
Bauplan neural de cordados: testando el modelo	86
El modelo de cordados y la actualización del modelo de vertebrados.	88
El origen de los organizadores secundarios. ¿Existe un Bauplan neural en bilaterios?	90
Bibliografía de la discusión.....	92
Conclusiones.....	97
Material y métodos	101
Anotación génica y clonajes.	101
Modelos animales	103
Hibridaciones in situ in toto e histología.	105
Bibliografía del material y métodos	107
Anexos	109
Anexo A1 Esquemas	
Anexo A2 Cefalocordados	
Anexo A3 Publicación	
Anexo A4 Resumen	
Anexo A5 Abstract	

Introducción

El desarrollo del sistema nervioso complejo de los vertebrados y la aparición de sus derivados han sido, y es, objeto de estudio desde muy distintas perspectivas. Tanto la regionalización molecular como la especialización estructural de cada uno de sus derivados, hasta la modificación conductual de los modelos animales existentes hoy en día, generan a todo nivel de detalle, grandes cantidades de información que es interpretada con el fin de conocer el cómo y porqué cada parte del cerebro de los vertebrados existe y funciona. Conocer en detalle, además, el desarrollo y las funciones de los sistemas nerviosos de otros metazoos nos proporciona una idea sobre el origen y la historia evolutiva de los sistemas neurales y de qué manera las innovaciones y los cambios evolutivos han ido esculpiendo la variabilidad de sistemas nerviosos que hoy nos encontramos en la naturaleza.

Todos los eumetazoos poseen un sistema nervioso, o sistema que conduce información a lo largo del cuerpo del animal de forma dirigida gracias a funciones eléctricas (mediante potenciales de acción) y/o químicas (neurotransmisores) de células especializadas. Existe gran diversidad en el desarrollo, estructuración y especializaciones de los sistemas nerviosos en la diversidad de animales vivos (Northcutt, 2012). Mientras que los cnidarios desarrollan una red discreta de conexiones a lo largo del cuerpo, las planarias poseen ganglios cefálicos y cordones nerviosos que transmiten las señales y, en un orden de organización más elevado, los vertebrados desarrollan un sistema nervioso central dorsal, que consta de un cerebro definido como tal por la colección de núcleos neurales con acciones distribuidas y jerárquicas (Schmidt-Rhaesa, 2007).

Las comparaciones entre distintos tipos de sistemas nerviosos dentro del subreino de los metazoos se hacen complicadas a nivel de estructura y función debido a su vasta diversidad, aunque las homologías entre las redes génicas que controlan el desarrollo y funciones que se dan entre muy distintos y distantes sistemas nerviosos contribuyen en gran medida a establecer relaciones de homología entre sus componentes y derivados (Davidson and Erwin, 2006).

Introducción

El objetivo general de esta tesis consiste en profundizar y clarificar estas relaciones de homología, tanto a nivel molecular como morfológico, y ampliar el conocimiento en general sobre el origen y la evolución del sistema nervioso complejo que observamos en los vertebrados, enmarcándolo y conociendo las relaciones evolutivas que ostenta con distintos sistemas nerviosos que observamos actualmente en la naturaleza.

Para conocer el origen y evolución de un sistema tan complejo como el sistema nervioso de vertebrados es necesario conocer y entender su estructura interna tanto a nivel global y, como un compendio de unidades independiente que constituyen finalmente un conjunto variado de derivados terminales.

Neuroanatomía de vertebrados

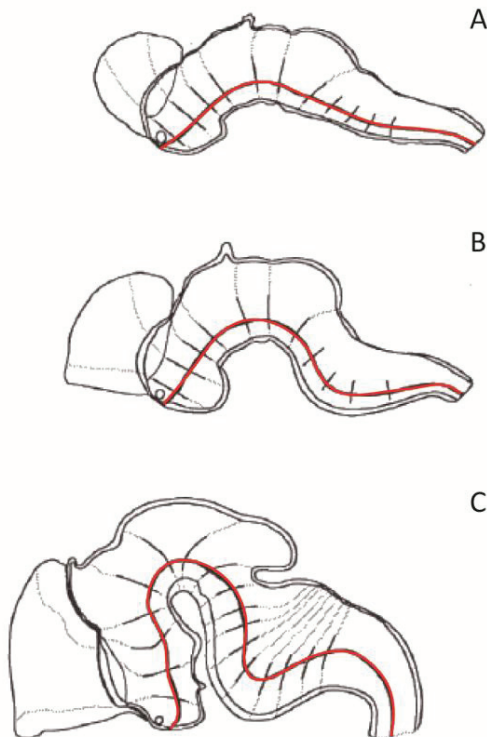
El sistema nervioso central de los vertebrados posee unidades básicas de desarrollo neural equivalentes e identificables tanto en el eje transversal como longitudinal. La comparativa entre éstas subunidades de distintos vertebrados se ve facilitada por el uso del modelo prosomérico por el que se propone que éstas subunidades se refieren de una forma orgánica a las referencias de los ejes internos definidos por el propio desarrollo del sistema nervioso (Puelles and Rubenstein, 1993, 2015; Puelles, 1995) y no sobre ejes externos artificiales y estáticos utilizados por otro tipo de aproximaciones neuroanatómicas (Kuhlenbeck, 1967; Puelles and Rubenstein, 1993).

Este modelo se describe en el establecimiento de estos ejes internos, que ocurre muy temprano en el desarrollo del sistema nervioso. Durante la ontogenia de éste, la placa neural abierta es bilateralmente simétrica, por lo que es fácil identificar el eje de simetría o línea media, que define el eje longitudinal. A medida que el desarrollo progresa, éste eje longitudinal, o suelo, se flexa debido a crecimientos diferenciales en distintos territorios del tubo neural. En cambio, el eje transversal respectivo se define de las relaciones ortogonales al eje longitudinal natural en cada punto del tubo neural ya que la flexión de tubo provoca la deformación de éste (Figura I1). En estadios tempranos, cuando la placa aún está abierta, el eje mediolateral se identifica desde el suelo hasta el límite exterior de ésta que, tras la neurulación, constituirá el techo del tubo neural. Una vez el tubo neural se flexa, cada subunidad, o neurómero, se establece en perpendicular al eje longitudinal respectivo.

La relación entre los ejes intrínsecos del propio sistema nervioso en desarrollo facilita la identificación de territorios diferenciales en el eje longitudinal como los mencionados suelo y techo (de la placa y después del tubo), como también los componentes basales y alares que

Introducción

forman parte de cada neurómero (Figura I3). Es por ello que el modelo prosomérico describe de forma orgánica las unidades básicas de un tejido de morfología altamente cambiante y plástica, facilitando las comparaciones entre neuroanatomías planes corporales equivalentes (Puelles and Rubenstein, 1993, 2015; Puelles, 1995).



A **Figura I1. Diagramas ilustrativos de la variable posicional según el eje longitudinal y su flexión.** Según el modelo prosomérico los planos topológicamente homólogos varían su topografía a medida que incrementa (A-C) la flexión del tubo neural. En rojo se muestra la barrera entre los componentes alar y basal. Los límites intersegmentales se organizan ortogonalmente al eje longitudinal en su respectiva flexión. Esquema adaptado de (Puelles, 1995).

B

C

Durante el desarrollo del sistema nervioso central, distintas regiones de progenitores neuronales se establecen progresivamente por la acción de procesos de especificación y regionalización molecular. La especificación molecular ocurre mediante procesos de señalización celular, genéticos y epigenéticos, que producen características regionales. La selección de la combinatoria de genes que son transcritos será diferencial en un determinado conjunto concreto de células, y además, los procesos dinámicos durante esta especificación producen una identidad posicional en el neuroepitelio que se denomina regionalización o patroneo neural.

Dentro del contexto de la identidad posicional y molecular se delimita el marco de la genoarquitectura, que aprovecha la información diferencial que se plasma en cada región progenitora en el tubo neural para identificar límites naturales que pueden ser correlacionados entre individuos de distintas especies que construyan su sistema nervioso bajo planes corporales, o *bauplan*, comparables (Ferran et al., 2009; Medina et al., 2011; Morona et al., 2011; Puelles and Ferran, 2012).

Introducción

Para conocer el origen y evolución de un sistema tan complejo como el sistema nervioso de vertebrados es necesario conocer su neuroanatomía, como conjunto de derivados terminales con identidades y funciones independientes y definidas, pero también como el resultado del compendio de procesos morfogenéticos por los que se han constituido. Para ello, el estudio genoarquitectónico de la neuroanatomía de vertebrados demuestra tanto la identidad diferencial de los derivados terminales como de los territorios progenitores de los que se constituyen.

La genoarquitectura

Es emergente y abundante la cantidad de datos de patroneo génico usados como marcadores topográficos en el sistema nervioso en desarrollo de los vertebrados. Los patrones de expresión génica proveen de información posicional, y sobre la inducción y el mantenimiento del desarrollo del sistema neural, y además contribuyen a la identificación y descripción de sus redes de regulación. Éstas redes controlan el desarrollo del plan corporal de los metazoos y están ampliamente conservadas (Davidson and Erwin, 2006; Erwin and Davidson, 2002).

Los estudios genoarquitectónicos aplican además el contexto celular y ontogénico dentro de la neuroanatomía descriptiva.

En primer lugar, la identidad molecular que exhiben tanto los neurómeros como los derivados terminales del sistema nervioso central constituye la infraestructura en la que se describe la genoarquitectura (Morona et al., 2011; Puellas and Ferran, 2012). Durante el desarrollo del sistema nervioso, desde el establecimiento del neurectodermo y progresivamente durante el desarrollo de éste, se activan y desactivan un conjunto específico de genes implicados en diferenciación y factores de transcripción que confieren a cada subunidad o región, una identidad molecular única. Además, tanto el estado regulatorio genómico de cada unidad, como los efectos posicionales que afectan a ésta, proporcionan un escenario genómico que determina últimamente su identidad molecular (Puelles and Ferran, 2012). Por tanto, la combinatoria molecular de factores de transcripción y genes de

diferenciación expresados, confieren un estado funcional singular tanto en el espacio (posicionalmente en el tejido neural) como en el tiempo (durante el desarrollo) a cada unidad natural en el desarrollo (Figura I2).

El contexto molecular progresivamente va especificando más y más los territorios del tejido neural resultando en la diferenciación final de derivados concretos a partir del neurectodermo general. Éste código genómico único provoca procesos diferenciados de histogénesis y morfogénesis que son lo que en última instancia identificarán las distintas unidades naturales del tejido neural. Y, además, la identidad molecular de cada neurómero (o unidad básica de desarrollo (Puelles and Rubenstein, 1993; Puelles, 1995)) está claramente ligada a los efectos posicionales que sufre, ya que los dominios topológicos son invariables y existen barreras naturales que constituyen relevancias anatómicas reconocibles en la totalidad de los vertebrados (Puelles and Ferran, 2012).

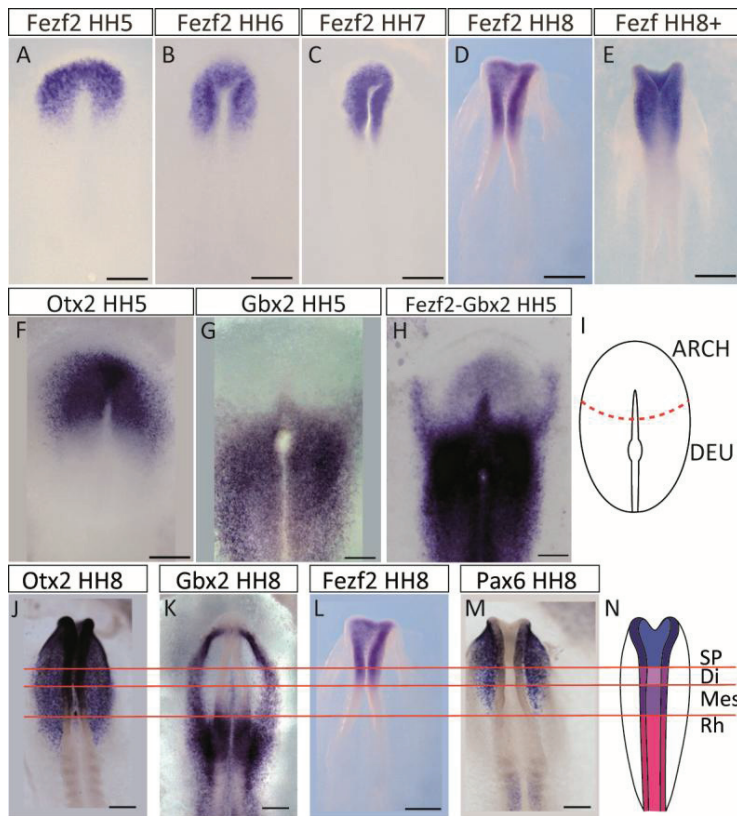


Figura I2. Regionalización de la placa neural de *Gallus gallus*. Patrón de expresión dinámica de Fezf2, A-E. Otx2 y Gbx2 demarcan el ARCH y el DEU respectivamente, F y G en estadio temprano HH5. Los marcadores en HH8: J, Otx2; K, Gbx2; L, Fezf2 y M, Pax6 y un esquema de la regionalización de la placa neural en N, estadio de HH8 y en I para el estadio de HH5. SP, prosencefalo secundario. Di, diencefalo. Mes, mesencefalo. Rh, rombencefalo. ARCH, archencefalo. DEU, deuterencefalo.

Introducción

Por tanto, la genoarquitectura neural es una potente herramienta que describe las singularidades de cada territorio neural o población neuronal en relación a su combinatoria única de patrones de expresión, clarificando la neuroanatomía propia de cada especie y facilitando la comparativa entre las que compartan su bauplan (Morona et al., 2011; Puelles and Ferran, 2012).

En el caso concreto del pretecho, región alar del prosomero p1 en el que se subdivide el diencéfalo en vertebrados (Figura 13), su estudio genoarquitectónico ha definido en su morfología la existencia de tres subunidades internas, los dominios precomisural, juxtacomisural y el comisural. El territorio pretectal está marcado en su límite anterior por la expresión de Pax3 y el posterior por Pax7 y el borde caudal de expresión de Pax6, y esa regionalización anteroposterior concreta está conservada en todos los vertebrados estudiados (aves, anfibios y mamíferos) (Ferran et al., 2009, 2008; Merchán et al., 2011; Morona et al., 2011; Puelles and Rubenstein, 2003).

Para conocer el origen y evolución de un sistema tan complejo como el sistema nervioso de vertebrados es necesario conocer su neuroanatomía. La genoarquitectura como aproximación provee de información tanto de los derivados terminales como de los territorios progenitores que los constituyen. Es en etapas muy tempranas del desarrollo ontogenético del sistema nervioso cuando se especifican estos territorios progenitores y, es por ello que estudiar su genoarquitectura nos permite más accesiblemente hacer comparativas y extrapolaciones.

Ontogenia del sistema nervioso de los vertebrados

La compleja organización anatómica que observamos en el sistema nervioso de los vertebrados adultos es reflejo y se adivina durante el desarrollo embrionario del mismo. La regionalización molecular del neuroectodermo se puede detectar muy pronto durante el desarrollo ontogenético y, en estas primeras fases del desarrollo temprano, está intrínsecamente asociado a la morfogénesis derivada de la gastrulación, donde se especifica el neuroectodermo a partir del ectodermo general por un proceso de inducción neural.

En términos generales, durante la gastrulación se forman y distinguen las tres capas embrionarias gracias a los procesos morfogenéticos que producirán el establecimiento del mesodermo axial, del que se diferenciará la notocorda, que emitirá estímulos implicados en el proceso de inducción neural (De Robertis and Kuroda, 2004; Spemann and Mangold, 1924). Además, según el modelo por defecto, en el embrión temprano, la capa ectodérmica activa su programa “por defecto”, que sucede en la especificación del territorio ectodérmico dorsal en neuroectodermo. En el mismo rango temporal, en la parte ventral de embrión, se activan las señales especificadoras del programa epitelial. Por tanto, en condiciones normales, las señales inhibitoras típicas del programa epidérmico en la parte ventral del embrión, permiten la especificación epitelial del ectodermo ventral y, en ausencia de ellas, en la parte dorsal se activa el programa “por defecto”, que especificará el neuroepitelio (Pera et al., 2014; Solnica-Krezel and Sepich, 2012). Actualmente, este modelo se pone en entredicho debido a la aparición de nuevos datos que sugieren un nivel de complejidad

Introducción

mayor en el que no sólo actores de la vía BMP estarían implicados sino también FGF's, Wnt's, Activin y Nodal parecen tener un rol en la diferenciación entre el ectodermo epidérmico y el neuroectodermo (Stern, 2006).

El desarrollo prosigue mediante una etapa de cambios morfogénéticos denominada neurulación. La neurulación es un proceso conservado en todos los cordados (Colas and Schoenwolf, 2001; Conklin, 1932; Copp et al., 2003; Holland et al., 1996; Nicol and Meinertzhagen, 1988). Una vez se han especificado los precursores neurales, las células que forman el epitelio se compactaran y engrosaran formando la placa neural. Durante la neurulación, la placa se elonga, estrechándose y a la vez plegándose sobre la línea media de manera que sus extremos acaban fusionándose dorsalmente y formando un tubo.

En estadios tempranos, la placa ya esta subdividida en un conjunto de regiones progenitoras molecularmente distintas. Aunque cada una de ellas tenga una combinatoria génica específica, y muchos de los factores de transcripción estén confinados específicamente a subregiones de la placa, muy pocos están restringidos a un único dominio de progenitores.

Todos los eventos de especificación génica se someten al establecimiento de los ejes tanto anteroposterior como mediolateral, en estadios tempranos, que se transformará en la polaridad dorsoventral, cuando se forme el tubo, de manera que las células que eran laterales en la placa serán dorsales en el techo del tubo al cerrarse y las células que eran mediales en la placa serán ventrales en el tubo (Copp et al., 2003; Puellas, 1995) (Figura I3)

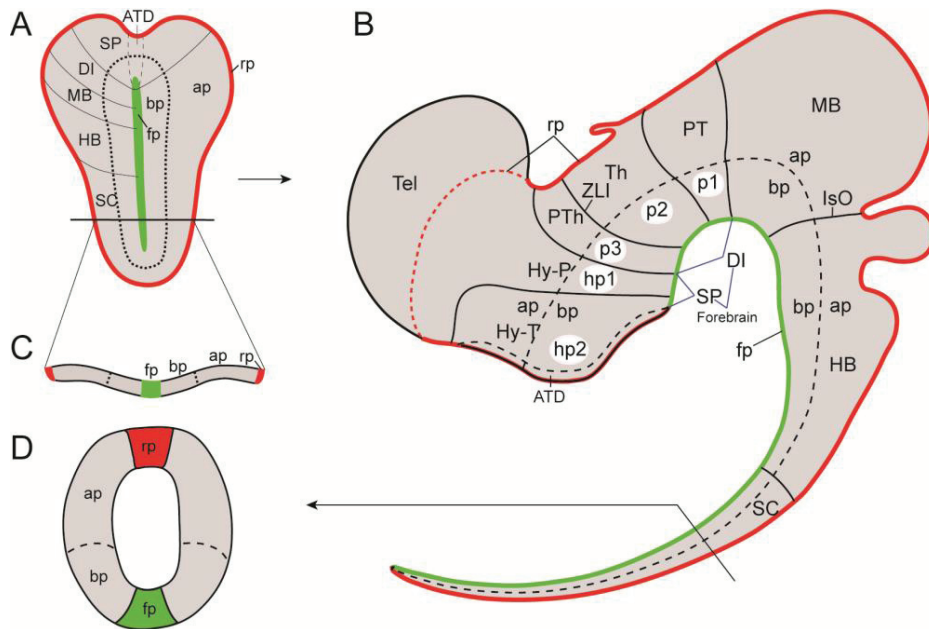


Figura 13. Diagrama del sistema nervioso de vertebrados y su desarrollo. A, Placa neural, vista dorsal; B, Sistema nervioso central adulto, vista lateral; C, Sección de la placa neural mostrando sus componentes mediolaterales; D, Sección de la médula espinal mostrando los componentes dorsoventrales del tubo neural; ap, componente alar; bp, componente basal; DI, diencéfalo; fp, suelo de la placa; HB, rombencéfalo; Hy-T(hp2), hipotálamo terminal; Hy-P(hp1), hipotálamo peduncular; IsO, Organizador Ístmico; MB, mesencéfalo; PT(p1), pretecho; PTh(p3), pretálamo; rp, techo de la placa; SC, Médula espinal; SP, Prosencéfalo secundario; Tel, telencéfalo; Th(p2), tálamo; ZLI, *Zona limitans intrathalamica*.

Establecimiento de los ejes

El establecimiento del eje dorsoventral (De Robertis and Kuroda, 2004; Wilson and Maden, 2005) se constituye por la contraposición de los gradientes de morfógenos Shh, provenientes de la región ventral (notocorda y placa basal), y BMP's emitidos desde la región dorsal (techo del tubo neural y ectodermo que lo superpone). También la relación antagonista de Fgf8 y el ácido retinoico ayuda a establecer la polaridad dorsoventral que se resulta en la activación de genes típicamente ventrales como Nkx6, Nkx2.2, Pax6, Irx3, Dbx1 y Dbx2 y, por contra genes típicamente dorsales como Pax3, Pax7 y Msx en sus respectivas regiones.

Introducción

Paralelamente en el tiempo pero perpendicularmente en el espacio, el eje anteroposterior se establece con un nivel de complejidad mayor que en el caso del eje dorsoventral, debido a la presencia i acción de diversos organizadores locales, o secundarios, que se desarrollan concomitantemente a la propia regionalización molecular que establecen y regulan.

En el estadio de placa neural los patrones de expresión de genes como *Otx2*, *Gbx2*, *Fezf*, *Irx* o *Pax6* muestran la existencia de límites y subdivisiones distintivas, con combinatorias moleculares únicas, a lo largo del eje anteroposterior de ésta (Hidalgo-Sánchez et al., 2005; Rodríguez-Seguel et al., 2009). A medida que el desarrollo avanza, el tubo neural se cierra, se comba y se hacen evidentes morfológicamente las subdivisiones generales, que definen los grandes dominios anteroposteriores: El prosencéfalo, el mesencéfalo, el rombencéfalo y la médula espinal. El prosencéfalo, se subdividirá en el prosencéfalo secundario y el diencéfalo. Además, el prosencéfalo secundario contiene una partición muy relevante en el eje dorsoventral, el telencéfalo evaginará de la parte más dorsal y el hipotálamo se desarrollará en la más ventral. Todas estas regiones diferenciales se subdividirán progresivamente en neurómeros, por ejemplo, el rombencéfalo se metameriza en 11 rombómeros (los neurómeros del rombencéfalo) y el diencéfalo en 3 prosómeros, el pretálamo (p3), el tálamo (p2) y el pretecho (p1), respectivamente de rostral a caudal (Puelles and Rubenstein, 1993; Puelles, 1995). Además cada neurómero (Figura I1 y Figura I3) se regionalizará paulatinamente con el objetivo de delimitar y diferenciar los núcleos funcionales que formaran el cerebro maduro del individuo adulto, mediante la combinatoria específica de genes que definen su genoarquitectura concreta.

Organizadores secundarios

El rol de los organizadores en el patroneo anteroposterior del tubo neural es clave. Un organizador es un dominio celular que libera morfógenos determinados que producen una acción reguladora en los tejidos adyacentes a él. En el tubo neural se han descrito tres, el Organizador del surco Anterior (ANR), que se encuentra en el punto más rostral de la placa neural, la *Zona Limitans Intrathalamica* (ZLI), situado entre el pretálamo y el tálamo, y el

Organizador Ístmico (ISO) que se desarrolla en la barrera entre el mesencéfalo y el rombencéfalo. Cada uno de ellos secreta una combinatoria específica de morfógenos que influirán en el desarrollo de las estructuras adyacentes y cercanas a ellos (Figura I4).

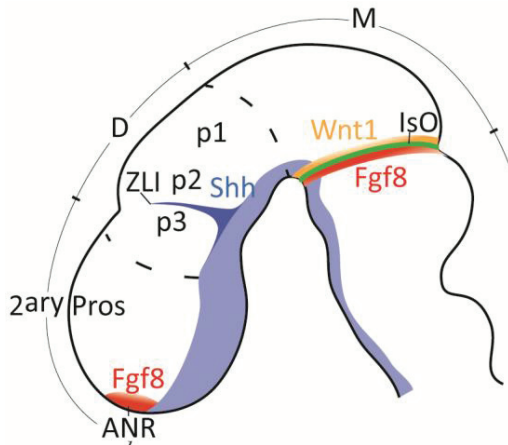


Figura I4. Diagrama ilustrativo mostrando la posición de los organizadores secundarios en el tubo neural de vertebrados y sus principales morfógenos. ANR, Organizador del surco Anterior; ZLI, Zona limitans intrathalamica; ISO, Organizador Ístmico; Pros2ario, prosencéfalo secundario; D, diencefalo; M, mesencéfalo; Rh, rombencéfalo; p3, pretálamo; p2, tálamo; p1, pretecho.

Específicamente, el ANR expresa Fgf8 y es esencial para la correcta regionalización del prosencéfalo, y en concreto para la formación del telencéfalo (Kiecker and Lumsden, 2012; Vieira et al., 2010).

El morfógeno de referencia en la ZLI es Shh, pero su patrón de expresión es dinámico. Empieza expresándose en el epitelio basal diencefálico y progresivamente se extiende dorsalmente desde la parte basal del epitelio de la presuntiva ZLI por un proceso de inducción homogenética, es decir, que el tejido inducido se convierte propiamente en inductor. Finalmente se establece en la porción alar del diencefalo situada entre los tálamos (p3 y p2), territorio donde además aposicionan los patrones de expresión de Fez y Irx, dentro de un dominio Otx2-positivo, que tiene un rol crucial en el establecimiento de la ZLI (Acampora et al., 1997; Kiecker and Lumsden, 2012).

Para el organizador ístmico, Fgf8 vuelve a cobrar relevancia, pero en este caso en conjunción con Wnt1. Uno a cada lado de lo que en el cerebro adulto se corresponderá con la relevancia anatómica denominada constricción ístmica, determinan el límite posterior del mesencéfalo

Introducción

(Wnt1) y el anterior del rombencéfalo (Fgf8). Desde muy pronto en el desarrollo se puede identificar esta región por la aposición de los patrones de expresión de Otx2 y Gbx2 que actúan (antagonísticamente) tanto en el posicionamiento como en la funcionalidad del IS0 y las regiones adyacentes se distinguen del resto del neuroepitelio por la expresión de los genes de la familia Pax y de los factores de transcripción En (Hidalgo-Sánchez et al., 2005; Kiecker and Lumsden, 2012).

Así pues, la especificación y desarrollo de los organizadores secundarios sucede en zonas altamente reguladas y especificadas en etapas muy tempranas del desarrollo.

Sistemas nerviosos en invertebrados No-Deuteróstomos

Artrópodos

El modelo animal por excelencia en el filo *Arthropoda* es *Drosophila melanogaster*. Su sistema nervioso, es centralizado y tripartito (proto- trito- y deutocerebrum) (Hirth et al., 2003; Schmidt-Rhaesa, 2007) y comparte un plan básico anteroposterior en el desarrollo de su sistema neural, aún siendo éste desarrollado en la parte ventral del animal. La red génica que establece las grandes subdivisiones durante el desarrollo es compartida con vertebrados y, más recientemente se ha descrito la presencia de una subdivisión génica extra en el protocerebro que demuestra que los bordes relativos para el posicionamiento de los organizadores en vertebrados (ZLI y IsO) están conservados para bilaterios (Irimia et al., 2010). Las características moleculares del IsO de vertebrados, como el interfaz Otx/Gbx se observan en su equivalente topológico en la barrera entre el deuto- y el tritocerebro con sus genes otrólogos (Hirth et al., 2003). De la misma forma se observa la aposición *Fezf/Irx* de *drosophila* definiendo una subdivisión interna en el protocerebro que corresponde a la posición topológica de la ZLI de vertebrados (Irimia et al., 2010).

Anélidos

El sistema nervioso de los anélidos está fuertemente estructurado por el cuerpo segmental del animal. Está formado por un cerebro dorsal bilateral que conecta con los dos cordones nerviosos ventrales que concentran los somas celulares en ganglios pareados a cada lado de cada segmento que, a su vez, se interconectan a través de plexos. A nivel molecular, el principal organismo modelo es *Platynereis durmeilii*, un anélido poliqueto marino. Este emergente modelo del grupo de los protóstomos presenta similitudes moleculares en su neurogénesis con la de vertebrados. En la especificación del neuroectodermo está involucrado el gen *SoxB* y el neuroectodermo se patronea longitudinalmente en dominios progenitores columnares *nk2.2+/nk6+*, *pax6+/nk6+*, *pax6+/pax3/7+*, y *msx+/pax3/7+* que

Introducción

corresponden con las subdivisiones mediolaterales encontradas en vertebrados (Arendt et al., 2008; Denes et al., 2007). Además el patroneo segmental anteroposterior *otx-gbx-hox* está conservado (Steinmetz et al., 2011). Progresivamente, el neuroectodermo empieza a expresar genes bHLH de determinación neural, como *neurogenina* y *achaete-scute*, (Kerner et al., 2009) determinando los progenitores neurales a partir de lo que se diferenciarán neuronas segregadas según el espacio. De más medial a más lateral se encontrarán neuronas serotoninérgicas, neuronas colinérgicas motoras, interneuronas y finalmente neuronas sensoriales, lo que denota la refinada anatomía molecular mediolateral en anélidos (Arendt et al., 2008; Denes et al., 2007).

Sistemas nerviosos en invertebrados Deuteróstomos

Los subfilos *Hemichordata* y *Echinodermata* forman el filo *Ambulacraria*, deuteróstomos no cordados.

Equinodermos

En equinodermos el sistema nervioso adulto consta de un nervio circumoral y cinco nervios radiales intraepiteliales. En el establecimiento del sistema nervioso contribuyen el compartimento ectoneural, que formara el nervio oral y la parte externa de los nervios radiales, y el compartimento hyponeural que contribuye en la parte interna de los nervios radiales. Los dos compartimentos son de origen ectodérmico y están interconectados. (Mashanov et al., 2007; Schmidt-Rhaesa, 2007) (Figura 15). El sistema nervioso adulto se forma independientemente del larvario (Mashanov et al., 2007) que está constituido por conjuntos de nervios asociados a la banda ciliada, que funciona como órgano motor y alimenticio, y un conjunto de neuronas serotoninérgicas y neuronas que expresan sinaptotagmina asociadas a células que producen largos cilios inmóviles con propiedades sensoriales que se diferencian a partir del neuroectodermo anterior, en el órgano apical. Estudios recientes sobre el desarrollo del sistema nervioso larvario revelan que las redes reguladoras génicas y la señalización celular que controlan el desarrollo neural parecen estar conservadas con otros metazoos, por ejemplo, la implicación del ortólogo de SoxB1 y otros genes bHLH en el establecimiento del ectodermo proneural (revisado en (Burke et al., 2014))

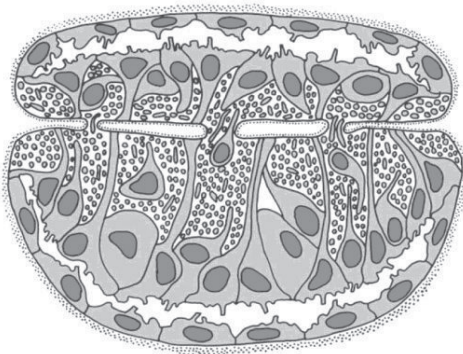


Figura 15. Ilustración del sistema nervioso de un equinodermo adulto. Contribución del sistema ectoneural (parte inferior) e hiponeural (parte superior) a un nervio radial en holoturias. Los dos sistemas se organizan epitelialmente alrededor del lumen. (Esquema adaptado de (Schmidt-Rhaesa, 2007))

Introducción

y la dependencia del establecimiento de los ejes en el desarrollo neural (revisado en (Angerer et al., 2011)). Por otra parte, ésta desconexión entre el sistema nervioso larvario y el adulto ensombrece las relaciones entre el sistema nervioso de los equinodermos y el de otros deuteróstomos, aunque sí existen características compartidas como el órgano apical, que está presente también en hemicordados (Byrne et al., 2007).

Hemicordados

Los hemicordados comparten con los cordados ciertas estructuras homólogas, como por ejemplo las gill slits. Además, el neuroectodermo en desarrollo de los hemicordados recapitula muchos de los patrones de expresión de vertebrados relativos a su eje anteroposterior (Lowe et al., 2003), aunque no en el dorsoventral (Lowe et al., 2006). La expresión ubicua en todo el ectodermo de marcadores de precursores neuronales y de diferenciación neuronal como Sox1/2/3, musashi y Elav indican que la neurogénesis en hemicordados se lleva a cabo de forma generalizada y difusa en toda la extensión del cuerpo del animal (Lowe et al., 2003), lo que concuerda con los patrones circunferenciales envolventes que se observan en marcadores de patroneo anteroposterior. Además, el sistema nervioso del animal adulto no es centralizado sino una red nerviosa difusa basiepitelial intraepidérmica aunque cuenta también con un cordón nervioso ventral, uno ventral y un cordón en el collar.

En el eje anteroposterior, la secuencia de subunidades con una combinatoria molecular conservada con vertebrados se ha descrito definiendo tres territorios coincidentes con relevancias morfológicas en hemicordados. De anterior a posterior, el prosoma, el metasoma y el mesosoma conservan el mapa de dominios que se observa para el prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo de vertebrados y para el protocerebrum, deutocerebrum y tritocerebrum de *Drosophila*, respectivamente. Este mapa de dominios general podría estar conservado desde el ancestro de los bilaterios (Lowe et al., 2006, 2003; Pani et al., 2012). En cambio, en el eje dorsoventral, en hemicordados está conservado el eje BMP/chordin para el establecimiento de la polaridad dorsoventral generalizada y el establecimiento de las tres capas embrionarias, pero el desarrollo de la red nerviosa difusa no está sometida a estos morfógenos; es decir, el ectodermo no responde a la señalización BMP.

El sistema nervioso del individuo adulto está constituido, además de la red nerviosa difusa epitelial, de dos cordones nerviosos uno en la línea media ventral y el otro en la dorsal, y el cordón del cuello situado dorsalmente a éste último (Nomaksteinsky et al., 2009) (Figura I6).

Introducción

Recientemente, se ha descrito el proceso de neurulación en el cordón del cuello, más parecido al de cordados y en forma de tubo. Éste se origina a partir de una porción de neurectodermo que forma un surco donde se acercan y fusionan sus extremos más alares, progresivamente de la parte más posterior a la más anterior, dejando dos neuroporos abiertos en sus extremos (Cunningham and Casey, 2014; Kaul and Stach, 2010). Una de las diferencias entre la neurulación que experimentan los cordados y los hemicordados es que el ectodermo es capaz de neurular en el cordón del cuello en ausencia de las otras capas embrionarias, de la misma forma que ocurre en el ectodermo neural anterior de equinodermos, cuando para cordados es necesaria una inducción neural por parte del organizador (Angerer et al., 2011; Cunningham and Casey, 2014; Kaul and Stach, 2010; Weinstein and Hemmati-brivanlou, 1999).

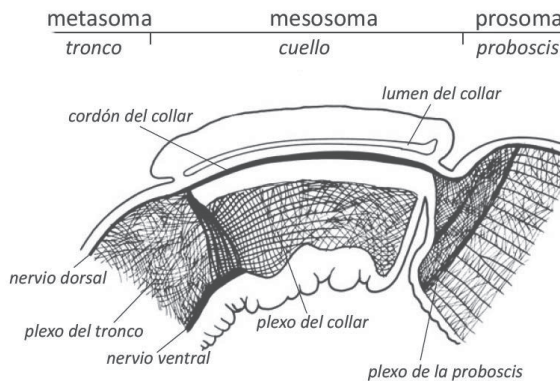


Figura 16. Representación gráfica del sistema nervioso adulto en hemicordados. Detalle del collar y las regiones adyacentes de la proboscis y el tronco. Esquema adaptado de (Schmidt-Rhaesa, 2007).

Además, recientemente se ha descrito la presencia de centros señalizadores en posiciones topológicamente similares o equivalentes a los organizadores secundarios de vertebrados durante el desarrollo de *Saccoglossus kowalevskii* (Pani et al., 2012). En el *ANR-like* se ha descrito la expresión del ortólogo de *fgf8* (*fgf8/17/18*) en el ectodermo de la proboscis. En el límite entre la proboscis y el collar, el *ZLI-like* expresa *hh* y en esa región también lo hacen los

ortólogos de *six3*, *fng*, *otx* y *wnt8* que son característicos en el mesencéfalo, diencéfalo y la ZLI de vertebrados. Y finalmente, el *IsO-like* presenta la aposición típica en vertebrados de sus ortólogos en la misma disposición en el IsO; *wnt1* se expresa anterior a *fgf8/17/18* en la frontera entre el collar y el tronco. Los autores proponen que los programas de los centros señalizadores existían en el ancestro de los bilaterios con la función de demarcar las divisiones ectodérmicas para la organización general del plan corporal, más allá de su implicación en el patroneo del sistema nervioso (Pani et al., 2012).

Introducción

El sistema nervioso de cefalocordados

Los cefalocordados, pertenecen al filo *Chordata* que comprende además, el grupo de los olfactores compuesto por los subfilos *Urochordata* y *Vertebrata* (Delsuc et al., 2006) estimándose el tiempo de divergencia del ancestro común en 550Myr (Blair and Hedges, 2005; Delsuc et al., 2008). (Figura 17)

Las principales características que tienen en común los cordados son la presencia de una notocorda, que se extiende a lo largo de todo su eje longitudinal y, en el caso concreto de los cefalocordados su límite rostral es más anterior que el del tubo neural. El ya mencionado tubo neural, hueco y dorsal a la notocorda, es otra de las características morfológicas que comparten los cordados, además de una faringe perforada con aperturas branquiales, miómeros o bloques musculares segmentados y, finalmente, la cola postanal (Figura 17).

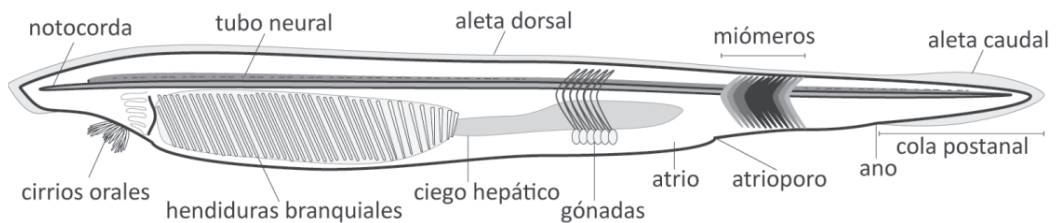


Figura 17. Esquema ilustrativo de las principales características morfológicas del anfioxo adulto. Anterior hacia la izquierda.

El sistema nervioso central (SNC) del anfioxo adulto consiste en un cordón nervioso dorsal, situado justo sobre la notocorda, que se extiende por casi toda la longitud del animal. Rostralmente, la notocorda supera al tubo neural en extensión y éste mantiene su extremo anterior justo por detrás de las cavidades celómicas más anteriores que dan soporte a la aleta rostral. El tubo neural, en su extremo caudal, justo por encima del de la notocorda, forma una protuberancia terminal llamada ámpula caudal, que es identificable en el adulto y respresenta uno de los pocos puntos de referencia a simple vista del tubo neural del anfioxo adulto, donde apenas podemos identificar un pequeño ensanchamiento anterior

correspondiente a la vesícula cerebral, que en estadios larvarios es mucho más manifiesta. Por tanto, en el anfioxo no son reconocibles ni neurómeros ni otras relevancias morfológicas externas que identifiquen organización segmental a parte los identificables puntos de salida, seriados, de los nervios dorsales. Curiosamente, internamente sí es posible caracterizar diferencias citoarquitectónicas tanto en el eje anteroposterior como dorsoventral, en adultos y larvas de anfioxo, que permiten establecer diferencias, o subdivisiones, entre regiones a lo largo del tubo neural (ver secciones siguientes).

El sistema nervioso periférico (PNS) del anfioxo adulto consiste en un set de plexos periféricos y series de nervios dorsales intermioméricos. Los nervios dorsales carecen totalmente de ganglios, a diferencia de vertebrados, y en cambio, los nervios periféricos consisten únicamente en axones que derivan tanto de neuronas centrales como periféricas y unas pocas células del tipo glial como soporte.

Inervación

Los nervios dorsales *per se*, proyectan desde los márgenes dorsolaterales del tubo neural a través de los mioseptos, entre los miómeros, hacia la piel donde se dividen formando una rama dorsal que inerva la parte dorsal del animal y una rama ventral que se ramifica para inervar la parte ventral del animal proyectando ramas viscerales que se subdividen formando a su vez ramas ascendentes y descendentes que conectan con los diversos plexos periféricos, usualmente dispuestos cerca del intestino, en órganos sensitivos y en la piel (Figura I8). Cada par nervioso proyecta respectivamente hacia ambos lados del animal (salvo excepciones) de manera asimétrica, alineándose cada raíz del nervio con el miosepto correspondiente que, como se ha comentado con anterioridad, en el caso del lado izquierdo sufren un avanzamiento respecto a los del lado derecho. Respecto a la inervación periférica general, cabe destacar que los nervios caudales a los que inervan el esfínter anal (51º a 53º) carecen de rama visceral, ya que inervan únicamente la cola postanal.

Introducción

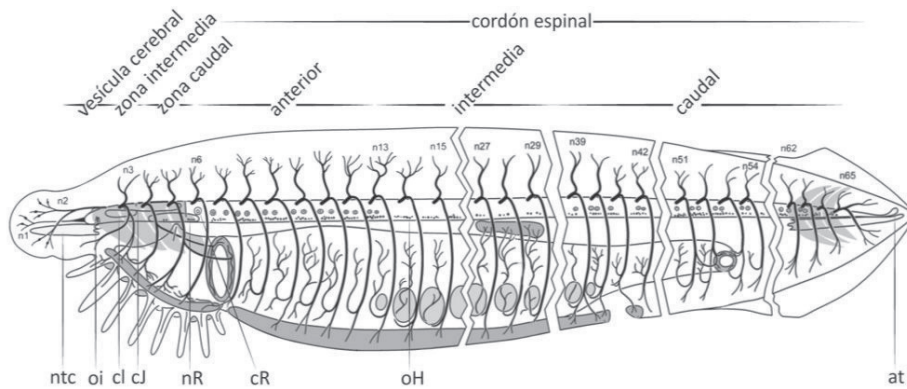


Figura 18. Representación de la inervación del anfióxico adulto. ntc, notocorda; oi, órgano infundibular; cl, cuerpo lamelar; cJ, células de Joseph; nR, núcleo de Rohde; cR, célula de Rohde; oH, ocelos de Hesse; n1-65, pares nerviosos; at, ampolla terminal. Esquema adaptado de (Wicht and Lacalli, 2005).

Existen ciertas diferencias para la inervación periférica de la zona oral y rostral respecto a la del resto del cuerpo debido, en parte, a diferencias intrínsecas del territorio. En la región rostral, el canal central del tubo neural se abre al exterior por el remanente del neuroporo o fosa de *Kölliker*. Dos pares de nervios emergen desde la vesícula cerebral para inervar la región rostral, el nervio rostral y el anterodorsal. Ninguno de los dos proyecta a través de un miosepto, como lo hacen todos los demás nervios dorsales, debido a la ausencia de miómeros en la zona rostral. Los dos primeros pares de nervios proyectan simétricamente dirigidos rostralmente a través del tejido conectivo que engloba el tubo neural y la notocorda. Además, a lo largo de las ramificaciones de los dos primeros pares se pueden identificar pequeñas agrupaciones de células llamadas corpúsculos de *Quatrefages* (Figura 19), a los que se les atribuye funciones mecanosensitivas y que consisten en células sensitivas primarias encapsuladas situadas periféricamente en la piel. Igualmente inusual es el hecho de que el primer par, o par rostral, es el único que no proyecta desde la parte dorsolateral del tubo neural, sino que lo hace desde la parte ventral. Por otra parte, la inervación oral es también excepcional ya que proviene exclusivamente de la ramificación izquierda de los pares 3º al 7º siendo inexistentes las ramificaciones viscerales de los pares correspondientes

del lado derecho. Es decir, la inervación de la boca y el aparato velar tiene un origen enteramente en el lado izquierdo del animal, reflejo de su ontogenia, ya que la boca se abre por primera vez en el lado izquierdo del embrión y las conexiones iniciales se mantienen de manera que los nervios se arrastran con el reposicionamiento de la boca durante la metamorfosis (ver secciones desarrollo larvario y metamorfosis dentro del anexo *Cephalochordata*) (Figura I9)

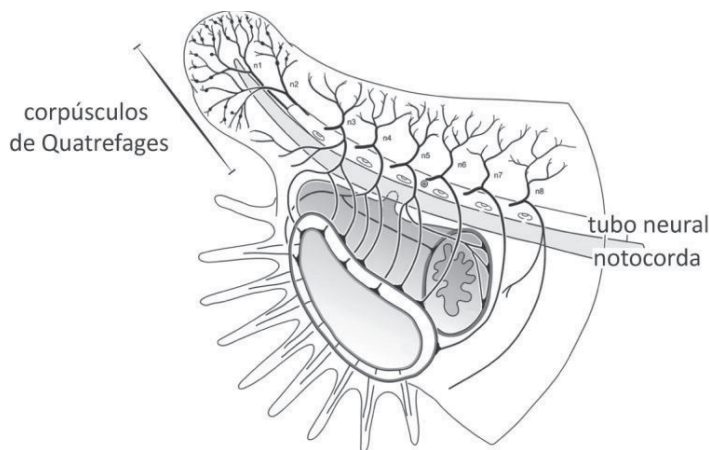


Figura I9. Representación gráfica de la inervación oral del anfioxo adulto. En las ramificaciones anteriores de los primeros pares nerviosos se observan los corpúsculos de Quatrefages. Esquema adaptado de (Wicht and Lacalli, 2005).

Citoarquitectura del tubo neural del anfioxo adulto

Dentro del tubo nervioso podemos diferenciar entre varios tipos celulares y su disposición a lo largo del eje anteroposterior del tubo neural varia definiendo distintas regiones. En general, podemos dividir el tubo neural en 4 grandes porciones. La más anterior que contiene la vesícula cerebral, la zona intermedia o región intercalar según Lacalli, Wicht y Ekhardt (Ekhardt et al., 2003; Wicht and Lacalli, 2005), la zona caudal y el cordón espinal.

1) La vesícula cerebral

La vesícula cerebral, a su vez se subdivide en dos porciones diferenciadas en su citoarquitectura, la más anterior (vesícula anterior), se identifica fácilmente por la presencia del ojo frontal, en la parte más rostral del tubo neural, que posee una acumulación de un

Introducción

pigmento oscuro caracterizado como melanina (Vopalensky et al., 2012). La cavidad ventricular en esta zona es peculiar por su forma de pera, por su alta población de cilios y por abrirse al exterior a través del rudimento del neuroporo. El suelo está compuesto por una matriz compacta de células en disposición columnar, y el techo es mucho más liviano y menos prominente. La parte anterior al límite caudal de la vesícula anterior la marca la presencia de una línea transversa de células inusualmente grandes, ciliadas, con pliegues laterales que hacen contacto con las neuronas adyacentes. La porción basal de éste complejo está completamente embebida en la parte más anterior de la comisura ventral y recibe axones ascendentes desde las células lamelares (células fotoreceptoras ciliares). A esta estructura se le atribuyen funciones de reloj circadiano (Schomerus et al., 2008; Wicht et al., 2010) y órgano de balance (Ekhart et al., 2003; Lacalli et al., 1994). A nivel de la entrada del 2º par de nervios dorsales (el primer par genuinamente dorsal) y coincidiendo con el límite caudal de la vesícula anterior *per se*, en posición ventromedial, se sitúa el órgano infundibular que consiste en varias líneas de células ependimales especializadas que secretan fibra de Reissner que fluye por el canal central del tubo neural hasta la ámpula terminal.

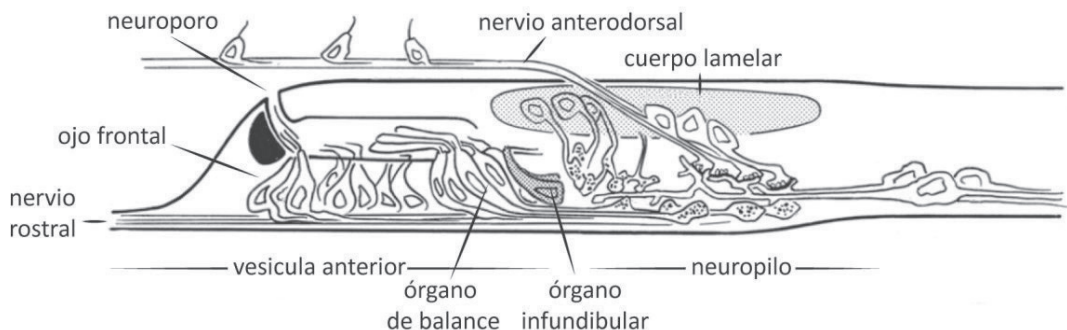


Figura I10. Representación esquemática de la citoarquitectura de la vesícula cerebral de una larva tardía de anfióxico. Adaptado de (Lacalli, 2008).

En la porción posterior a la vesícula anterior, o región de transición según Castro 2015, o subdivisión anterior de la zona intercalar de Ekhart (Ekhart et al., 2003), el ventrículo

empieza a estrecharse y las paredes laterales del tubo neural tienden a encontrarse en la línea media. La parte anterior de esta subdivisión la marca la presencia de una línea transversa de células inusualmente grandes, ciliadas, con pliegues laterales que hacen contacto con las neuronas adyacentes. La porción basal de éste complejo está completamente embebida en la parte más anterior de la comisura ventral y recibe axones ascendentes desde las células lamelares (células fotorreceptoras ciliares). A esta estructura se le atribuyen funciones de reloj circadiano (Schomerus et al., 2008; Wicht et al., 2010) y órgano de balance (Ekhart et al., 2003; Lacalli et al., 1994). En la línea media dorsal de la zona de transición el espacio ventricular está plagado de procesos intraventriculares

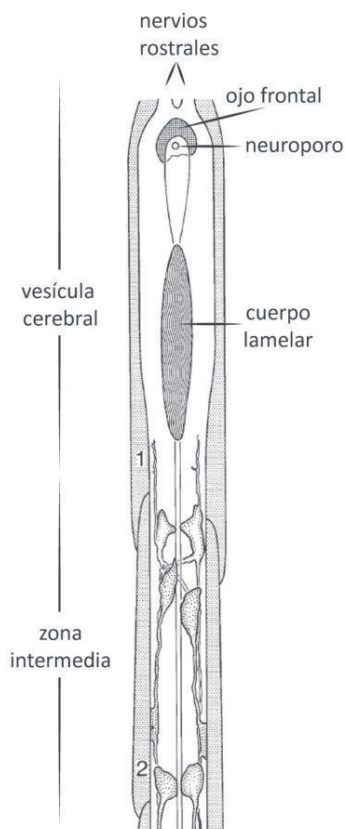


Figura I11. Representación esquemática de la vista dorsal de la vesícula cerebral y la zona intermedia del tubo neural del anfióxico. Adaptado de (Lacalli, 2008).

procedentes de las células fotorreceptoras del cuerpo lamelar. Además aparecen de manera escasa las columnas axiales formadas por células de Joseph que aumentarán en número en regiones más caudales. También empiezan a ser conspicuas en esta zona las células sensoriales primarias de Retzius que se distribuyen mayoritariamente en la región dorsal de ésta, y del resto del tubo neural, en muchos casos situadas justo por debajo de las células de Joseph (Castro et al., 2015). Las células bipolares de Retzius forman bandas dorsales con mayor presencia cerca de las entradas de los nervios dorsales de forma asimétrica, con notable mayor presencia en los pares izquierdos 3º a 7º debido a la asimetría producida por la inervación del aparato oral. Las células bipolares de Retzius del cordón espinal han sido ampliamente comparadas con las células de tipo Rohon-Beard, neuronas

Introducción

sensoriales primarias, presentes en el cordón espinal de larvas de pez, anfibios y lampreas, involucradas en el reflejo sensorimotor, en asociación con neuronas internunciales y motoneuronas, de la misma manera que ha sido descrito en larvas de anfibio (Castro et al., 2015; Thurston C Lacalli and Kelly, 2003; Lacalli, 2003). Además, exclusivamente en esta región del tubo neural existen 2 grupos celulares que se desprenden de la capa que delimita el ventrículo (ependimal) y migran integrándose en la materia blanca. Bajo la expansión del canal central en la región ventral se sitúan las células del grupo migrador anteroventral y, bilateralmente, en las zonas dorsolaterales de la materia blanca encontramos las del grupo migrador anterolateral (avm y alm, respectivamente por Ekhart (2003).

2) Zona intermedia

La zona intermedia se extiende desde la entrada del 3º nervio dorsal izquierdo, en el miosepto que comparten los miómeros 1 y 2 del lado izquierdo, hasta la entrada del 4º nervio dorsal izquierdo, es decir, la extensión del segundo miómero izquierdo trasladada al tubo neural (Figura I11). En esta región, el reminiscente lumen ventricular dorsal desaparece, las células de Joseph se vuelven más numerosas e incluso forman un capuchón en la parte dorsal del tubo neural (Ekhart et al., 2003). Las células de Joseph son las células oclares de los órganos de Hesse, fotorreceptores rabdoméricas sensibles a la depolarización de la luz, que expresan melanopsina y Gq (Koyanagi and Terakita, 2008). Por otra parte, la densidad general en neuronas decrece en esta región pero éstas son más grandes en tamaño, muchas de ellas transluminales, que envían procesos a ambos lados del tubo neural, y otras que no atraviesan el lumen, como las células de Edinger y las motoneuronas que se combinan en un centro sensorimotor denominado centro premotor (CPM) (Lacalli, 1996). Las células de Edinger son interneuronas GABAérgicas que se disponen a nivel ventral del tubo neural y que son muy abundantes en la región caudal (cordón espinal) (Anadón et al., 1998) y más bien escasas pero presentes en la zona intermedia (Castro et al., 2015).

Las motoneuronas somáticas son neuronas que no presentan procesos transluminales y que envían procesos ipsilaterales exclusivamente (T C Lacalli and Kelly, 2003), de la misma manera que en vertebrados. Se originan en la región ventral de la placa neural y en anfibios adultos se posicionan más dorsalmente, a diferencia de las motoneuronas de vertebrados que se encuentran en regiones ventrolaterales como resultado de migraciones y crecimiento secundario del tubo neural (Castro et al., 2015).

3) Zona caudal

La zona caudal se identifica por la aparición del núcleo de Rhode en la región ventral del tubo neural, a la altura del inicio del miómero 3 y se extiende hasta el correspondiente final del miómero 4, extensiones extrapoladas al tubo neural. Además a esta altura, el tubo neural se protruye ventrolateralmente, a la derecha de la notocorda, en una estructura denominada *infundíbulo*, que contacta con la fosa de Hatschek, que es clásicamente propuesta como el homólogo para la adenohipófisis de vertebrados, tanto por su carácter endocrino como por su conexión con el *infundíbulo* que se propone, por extensión, como el homólogo la neurohipófisis de vertebrados al corresponderse con el sitio de liberación de neurohormonas (Gorbman et al., 1999; Nozaki and Gorbman, 1992). El núcleo de Rhode ha sido propuesto como el productor de esas neurohormonas debido a la abundancia de cuerpos de Nissl en sus citoplasmas (Ekhart et al., 2003).

4) Cordón espinal

El inicio del cordón espinal se determina por la presencia de la primera célula gigante de Rhode y podemos subdividir el cordón espinal por su citoarquitectura particular en tres grandes regiones (ver figura 18).

La más anterior equivalente a los miómeros 5 a 11, se caracteriza por la presencia de las previamente mencionadas células de Rhode, cuyos axones forman fibras gigantes y están relacionadas con informaciones de tipo motor, y además en esta zona es también notable la presencia de los órganos fotoreceptores de Hesse. En la zona intermedia, que coincide

Introducción

aproximadamente con la extensión de las gónadas, de los miómeros 12 a 38, no se aprecian células de Rhode y la densidad de los órganos de Hesse decrece notablemente. En la zona posterior del cordón espinal, desde el atrio poro (entre los miómeros 38 y 40) hasta el último par nervioso, el 65º, que sale del tubo neural caudalmente al último miómero (el 63 en *B. lanceolatum*). En ésta zona incrementa el número de órganos de Hesse y reaparecen las células de Rhode.

Neurulación en anfióxico

La neurulación, o formación del tubo neural, empieza con un ligero aplastamiento dorsal de la gástrula. El hundimiento del neuroectodermo, en forma de V, va creciendo en sentido postero-anterior, a la vez que el embrión se va alargando. En la base del surco nervioso de la placa neural, ya determinada, se podrá identificar la parte más ventral del tubo neural, el suelo de la placa, de la misma manera que ocurre en vertebrados. A medida que la neurulación avanza, se produce el cierre del tubo neural, gracias a la extensión de los bordes de la placa neural, que suben hasta encontrarse y fusionarse formando un tubo. Seguidamente una capa de ectodermo empieza a recubrir al tubo nervioso, progresando desde la parte posterior a la anterior, dejando una pequeña abertura en el extremo más anterior llamada neuroporo. En este punto, el blastoporo está cubierto externamente por el ectodermo, permaneciendo como una vía de comunicación del arquenteron, o canal neuroentérico. Solapadamente, la placa cordomesodérmica, que forma el techo del arquenteron, se evagina formando tres interdigitaciones: una central, que dará lugar al primordio de la notocorda y dos laterales, que serán el primordio de los primeros somitas. Estos somitas se forman por un proceso llamado enterocelia, es decir, por la evaginación del arquenteron, mientras que los somitas que se formarán más tarde, y que ocuparán casi la totalidad del cuerpo del embrión, se formarán por esquizocelia, a partir del primordio de la cola (*tail bud*), un proceso más común en vertebrados.

Genoarquitectura del anfióxico en desarrollo

Muchos de los genes implicados en el desarrollo neural en vertebrados parecen estar también implicados en el desarrollo neural de los cefalocordados. Es vasta la literatura que describe patrones moleculares de genes involucrados en el desarrollo neural del anfióxico y expone comparativas y equivalencias respecto a la regionalización de vertebrados. Entre ellos, es destacable el caso de los grandes territorios moleculares conservados entre cefalocordados y vertebrados definidos por la aposición de los patrones de expresión de *Otx*/*Gbx* (Castro et al., 2006; Garda et al., 2000; Hidalgo-Sánchez et al., 2005) y de *Fezf*/*Irx* (Hirata et al., 2006; Irimia et al., 2010; Rodríguez-Seguel et al., 2009) desde muy temprano en la ontogenia (Figura I12 y Figura I13).

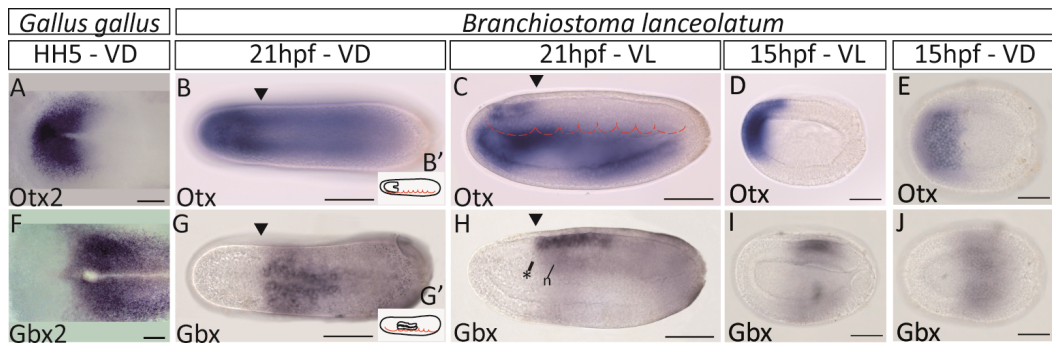


Figura I12. Aposición de los dominios *Otx*/*Gbx* positivos en la placa neural de: (A y F) *Gallus gallus*; *Branchiostoma lanceolatum* (B, C, G y H) neurulas de 21hpf y (D, E, I y J) neurulas tempranas de 15hpf. La punta de flecha indica el límite que se crea en esa aposición. El asterisco indica la placa neural y la (n) indica la notocorda. La línea roja dibuja el contorno de los somitas, que no están en foco. (B' y G') son representaciones gráficas del componente neural de su respectivo patrón de expresión, para comparación.

Introducción

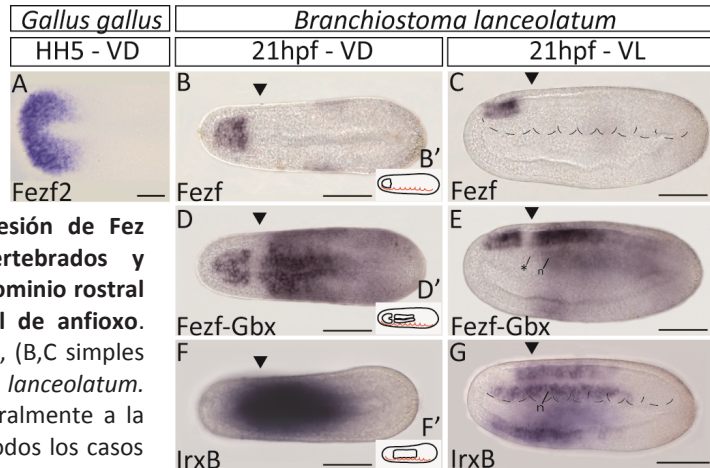


Figura I13. El patrón de expresión de Fez parece conservado entre vertebrados y cefalocordados y subdivide el dominio rostral Otx-positivo en la placa neural de anfibio. Expresión de Fezf en (A) *G.gallus*, (B,C simples y D,E en combinación con Gbx) *B. lanceolatum*. La expresión de IrxB acaba rostralmente a la frontera Otx/Gbx, marcada en todos los casos con la cabeza de flecha.

Cabe destacar que en la literatura se recoge una amplia variabilidad en la metodología y el tipo de análisis de estos genes y factores de transcripción en relación a su expresión, lo que incrementa su dificultad en la comparativa con vertebrados. En la tabla I1 se recoge los datos para el componente neural de los patrones de expresión de casi cincuenta genes previamente descritos que están relacionados con el establecimiento y patroneo del sistema nervioso de vertebrados. En general, éstos son estudios de caracterización realizados por varios autores, en distintos centros de investigación, con metodologías propias y con enfoques específicos para cada análisis concreto.

Por ello, en esta tesis se ha caracterizado los patrones de expresión de éstos genes, con la misma metodología y el mismo enfoque, y con especial cura en realizar un análisis genoarquitectónico profundo y detallado de la placa neural del anfibio con el fin de poder realizar comparativas fiables.

Tabla I1. Compendio de los datos que existen en la literatura sobre los genes mencionados que están implicados en el establecimiento y desarrollo del sistema nervioso de vertebrados y han sido analizados en el sistema nervioso en desarrollo de *B. floridae* y/o *B. lanceolatum*. Se facilitan las referencias, los números de acceso y los datos sobre expresión neural en varios estadios del desarrollo.

Gene	Accession number		Reference <i>B floridae</i>	Reference <i>B lanceolatum</i>	Neural related expression data described previously/primers
	<i>B floridae</i>	<i>B lanceolatum</i>			
Brn1/2/4	AY078995		Candiani et al., 2002		EN: Expression in two transverse patches in the most anterior region of the neural plate. LN: expression restricted to the roof of the anterior region of the cerebral vesicle.
Dach	AF541879		Candiani et al., 2003		EN: No neural expression. LN: expression is restricted to a few ventral cells at the posterior end of the cerebral vesicle
Dlx	U47058		Holland et al., 1996		EN: strong expression in two clusters of cells bilaterally near the neuropore and weak expression in scattered lateral cells of along the AP axis. LN: single median cluster of neural tube cells with strong expression in the anterior part and roof of the neural tube, with the exception of pigment spot, and some scattered ventral cells.
Ebf/COE	AJ580840		Mazet et al., 2004		EN-MN: expression is restricted to the middle AP third of the embryo throughout the DV extent of the neural plate, with the exception of the floor plate. LN: expression is restricted to the same domain that in EN but is periodic and in register with the adjacent somites and these patches of cells lie just posterior to somite boundaries.
En	U82487		Holland et al., 1997		LN: expression is detectable only in the dorsal nervous system in two small groups of cells midway along the rostrocaudal axis just caudal of the first pigment spot.
Fezf	XM_002610573	HM245959	Shimeld, 2008	Irimia et al., 2010	EN to larval stages: expression is highly restricted to the most anterior part of the neural plate.
Fgf8	FJ266460.1	EU606035.1		Bertrand et al., 2011	EN-LN: anterior tip of the neural plate.
FoxA2	D84221		Terazawa and Satoh, 1997		EN: intense signals in the presumptive notochord region but undetectable from the neural plate. LN: expression in the notochord but apparently not in the neural tube in transverse sections.
FoxB	AJ506162		Mazet and Shimeld, 2002		EN-MN: expression was detected in two lateral stripes along the neural plate with an anterior boundary at the level of the first somite. LN: Expression in the nervous system continued in a series of blocks, one opposite each somite with the exception of somite 5.
FoxD	AF512537		Yu et al., 2002		EN-MN: expression is strong in the anterior neural plate. LN: the anterior neural expression becomes localized in a broad ventral domain in the cerebral vesicle, transcripts are also present along the entire dorsal side of the notochord.
Gata1/2/3	FJ615537.1 L FJ615538.1 S	JQ942473.1	Gillis et al., 2009	Pascual-anaya et al., 2013	No neural expression

Gene	Accession number		Reference <i>B floridae</i>	Reference <i>B lanceolatum</i>	Neural related expression data /primers
	<i>B floridae</i>	<i>B lanceolatum</i>			
Gbx	DQ416766.1	HM245960.1	Castro et al., 2006	Irimia et al., 2010	EN to larval stages: expression in the neural plate, excepting the floor plate, posterior to the developing cerebral vesicle and very weakly in the presumptive notochord. EN-LN: expression in the lateral neural plate and paraxial mesoderm.
Gli	AJ252244.1		Shimeld, 2008		EN-LN: expression was never detected outside of the notochord domain at the most posterior extent of the level of somite 8. No expression in neural plate was detected.
Gsc	AF281674		Neidert et al., 2000		EN: intense expression was detected throughout the prospective notochord. MN: Expression was also activated in the neural plate confined to the ventral midline, but excluded from the most anterior region of the plate. LN: expression rapidly disappeared with the exception of discrete areas of expression: the anterior notochord extension that underlies the cerebral vesicle and a few cells in the ventral neural tube.
HH	Y13858.1	EU754743.1	Shimeld, 1999	Somorjai et al., 2008	EN: strong signal is detected in the neural plate with the anterior border of expression that coincides with that in the mesoderm and strongest staining in the neural plate is at the level of somite 4. MN: neural plate expression becomes segmental from the level of mid-s2 to the boundary s5/6 with a periodicity matching the somitic segmentation. LN: expression is observed from the same anterior limit, but now a posterior limit to expression is evident (level of s6/7).
Hox1	AB028206.2	JX088060.1	Wada et al., 1999	Pascual-Anaya et al., 2012	EN: expression in the neural tube has an anterior boundary at the level of s4/5 and by MN this expression limit is at the level of mid-s4.
Hox3	X68045.1	JX088062.1	Holland et al., 1992	Pascual-Anaya et al., 2012	*MN: expression is restricted to a part of the neural plate with very sharp anterior limit at the level of the intersomitic cleft between s5 and s6 and posterior limit was two somites behind.
Hox6	Z35146.1	JX088066.1*	García-Fernández and Holland, 1994	Pascual-Anaya et al., 2012	EN-MN: expression in the neural plate. LN: the neural expression is weakening in the neural tube and at either end of the notochord.
IrxA	FJ167343	EU754744.1	Kaltenbach et al., 2009	Irimia et al., 2008	EN-MN: expression is detected in the neural plate. LN: expression continues in the notochord and in the neural tube, where the neural expression is now limited to a few scattered cell group.
IrxB	EU754748.1	EU754747.1	Kaltenbach et al., 2009	Irimia et al., 2008	EN-MN: expression in the neural plate. LN: the neural expression is weakening in the neural tube and at either end of the notochord.
IrxC	EU754750.1	EU754749.1	Kaltenbach et al., 2009	Irimia et al., 2008	EN-MN: expression in the neural plate. LN: the neural expression is weakening in the neural tube and at either end of the notochord.
Krox	AJ278149.1		Knight et al., 2000	Somorjai et al., 2008	LN: Initial expression is strong in the anterior cerebral vesicle (CV), including the prospective frontal eye region.

Gene	Accession number		Reference <i>B floridae</i>	Reference <i>B lanceolatum</i>	Neural related expression data /primers
	<i>B floridae</i>	<i>B lanceolatum</i>			
Lef	DQ148394.1		Lin et al., 2006		EN: weak expression in the neural plate MN: neural expression restricted to the anterior portion of the neural plate/diencephalon. LN: expression in the cerebral vesicle.
Lfringe	AJ566297.1		Mazet and Shimeld, 2003		EN: expression is visible in the neural plate in a segmented pattern. MN: neural expression in patches adjacent to boundaries between mesodermal segments.
Lhx1/5	DQ399521.1		Langeland et al., 2006		MN: expression far anteriorly in the central nervous system and more posteriorly in segmentally arranged clusters of neural cells, most conspicuously at the levels of somites three through six, these clustered neural cells are located ventrolaterally in the neural tube and are probably differentiating motoneurons.
MinxA	AF308821.1		Ferrier et al., 2001		EN-MN: neuroectodermal expression is extensive and uniform. MN-LN: expression resolves into a series of bilateral pairs of spots, being the most rostral and the largest, opposite s1, just behind the cerebral vesicle. The next three pairs of spots are positioned opposite to the centre of s2 to s4 with the exception of s5 where there is a gap and the subsequent pairs of spots are located opposite to boundaries s5/6 and s6/7.
Msx	AJ130766.1		Sharman et al., 1999		EN-MN: expression confined to the lateral neural plate, excluded from the midline and being most intense adjacent to s5. LN: expression is activated along neural tube but excluded from the extremes.
Nkx2.1	AF077840.1		Venkatesh et al., 1999		EN: expression is limited to floor plate and possibly basal plate. MN: the ventral expression becomes segmented being strongest anteriorly. LN: expression is limited to the anterior end of the nerve cord (cv).
Nkx2.2	AF032999.1		Holland et al., 1998		MN: Detectable expression extends along the middle 3/4 of anteroposterior axis of the cerebral vesicle and is most intense posteriorly. LN: expression domains of Amphihk2-2 remain conspicuous in the cerebral vesicle.
Nova	JF314363.1	JF314355.1		Irimia et al., 2011a	MN-LN: discrete expression was detected in repetitive neural precursors reminiscent of motoneuron markers and consistent with vertebrate expression patterns.
Otx	AF043740.1	EU685295.1	Williams and Holland, 1998	Somorjai et al., 2008	EN: Double labeling for both Otx and Gbx expression in the neural plate, shows a narrow zone of overlap encompassing about 3–4 cells just posterior to the cv. MN: the domains of strong expression of Gbx and Otx in the CNS about just posterior to the cerebral vesicle. (From Castro et al., 2006)
Pax2/5/8	AF053763.1	EU685298.1	Kozmik et al., 1999	Somorjai et al., 2008	EN: expression is detected in a small cluster of neural plate cells on either side of the midline at the level of the S5. MN: neural plate expression spreads anteriorly and posteriorly, except in the midline. LN: Neural expression extends through the anterior half of the nerve cord, excluding the cerebral vesicle; expressing cells can be located anywhere except in the midventral floor plate cells.

Gene	Accession number		Reference <i>B floridae</i>	Reference <i>B lanceolatum</i>	Neural related expression data /primers
	<i>B floridae</i>	<i>B lanceolatum</i>			
Pax3/7	AF165886.1		Holland et al., 1999		EN: expression appears throughout neural plate but remains strong along the lateral edges. MN: expression at the lateral edges of the neural plate is limited to the anterior end of the nerve cord. LN: expression is detected throughout the dorsal third of the nerve cord at the level of the cerebral vesicle.
Pax4/6	AJ223440.1		Glardon et al., 1998		EN: the expression in the anterior neural plate becomes localized in two bilateral spots. MN: near the anterior end of the neural tube, the two spots of <i>Amphipax-6</i> expression merge medially. LN: expression continues in the anterior neural tube, where transcripts are conspicuous in several anteroventral cells of the frontal eye, probably in the type 1 and/or type 2 receptor cells of <i>laccali</i> .
Sim	AJ506161		Mazet and Shimeld, 2002		MN-LN: expression domain restricted to an isolated block of neural cells adjacent to the centre of the first somite.
Six3/6	EF195743		Kozmik et al., 2007		EN to larval stages: expression anteriorly in neural plate and notochord.
Snail	AF081809.1	HMS59129.1	Langeland et al., 1998	Bertrand et al., 2011	EN: expression is extinguished in the developing somites and expands throughout the neural plate. MN: transcripts are located throughout the invaginating neural plate. LN: expression can be detected dorsally along the length of the embryo; snail-expressing cells are confined to the neural tube.
SoxB2	DQ644542.1		Meulemans and Bronner-fraser, 2007		EN to larval stages: coexpression in the developing CNS with <i>SoxB1</i> .
Rx	XM_002609729.1	ABD62780.1	Vopalensky et al., 2012		LN to larval stages: expression demarcates the anterior end of the cerebral vesicle.
Wnt3	AF361013.1	EU685300.1	Schubert et al., 2001	Somorjai et al., 2008	MN: expression appears along the edges of the neural plate. LN: the curling of the neural plate carries the neural signal into the dorsal region of the neural.
Wnt5	AF361014.1	EU685301.1	Schubert et al., 2001	Somorjai et al., 2008	LN: expression commences in the cerebral vesicle.
Wnt7		EU685303.1		Somorjai et al., 2008	MN: Expression in the central neural plate.
Wnt8	AF190470.1		Schubert et al., 2000		Early larvae: neural expression detected in early larvae in the cerebral vesicle at a position that probably corresponds to the posterior diencephalic forebrain.
Zic	AJ252245		Gostling and Shimeld, 2003		EN: expression in the neural plate, posterior expression localized to the lateral regions of the neural plate. MN-LN: As neurulation proceeds, expression is switched off throughout the remaining neural plate.

Bibliografía

- Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Simeone, a, 1997. Genetic control of brain morphogenesis through *Otx* gene dosage requirement. *Development* 124, 3639–3650.
- Anadón, R., Adrio, F., Rodríguez-Moldes, I., 1998. Distribution of GABA immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum* pallas). *J. Comp. Neurol.* 401, 293–307. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19981123)401:3<293::AID-CNE1>3.0.CO;2-F
- Angerer, L.M., Yaguchi, S., Angerer, R.C., Burke, R.D., 2011. The evolution of nervous system patterning: insights from sea urchin development. *Development* 138, 3613–3623. doi:10.1242/dev.058172
- Arendt, D., Denes, A.S., Jékely, G., Tessmar-Raible, K., 2008. The evolution of nervous system centralization. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 1523–1528. doi:10.1098/rstb.2007.2242
- Bertrand, S., Camasses, A., Somorjai, I., Belgacem, M.R., Chabrol, O., Escande, M.-L., Pontarotti, P., Escriva, H., 2011. Amphioxus FGF signaling predicts the acquisition of vertebrate morphological traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9160–5. doi:10.1073/pnas.1014235108
- Blair, J.E., Hedges, S.B., 2005. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2275–2284. doi:10.1093/molbev/msi225
- Burke, R.D., Moller, D.J., Krupke, O. a., Taylor, V.J., 2014. Sea urchin neural development and the metazoan paradigm of neurogenesis. *Genesis* 52, 208–221. doi:10.1002/dvg.22750
- Byrne, M., Nakajima, Y., Chee, F.C., Burke, R.D., 2007. Apical organs in echinoderm larvae: Insights into larval evolution in the Ambulacraria. *Evol. Dev.* 9, 432–445. doi:10.1111/j.1525-142X.2007.00189.x
- Candiani, S., Castagnola, P., Oliveri, D., Pestarino, M., 2002. Cloning and developmental expression of *AmphiBrn1/2/4*, a POU III gene in amphioxus. *Mech. Dev.* 116, 231–4.
- Candiani, S., Kreslova, J., Benes, V., Oliveri, D., Castagnola, P., Pestarino, M., Kozmik, Z., 2003. Cloning and developmental expression of amphioxus *Dachsund*. *Gene Expr. Patterns* 3, 65–69. doi:10.1016/S1567-133X(02)00070-4
- 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*. doi:10.1002/cne.
- Castro, L.F.C., Rasmussen, S.L.K., Holland, P.W.H., Holland, N.D., Holland, L.Z., 2006. A *Gbx* homeobox gene in amphioxus: insights into ancestry of the ANTP class and evolution of the midbrain/hindbrain boundary. *Dev. Biol.* 295, 40–51. doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.003
- Colas, J.F., Schoenwolf, G.C., 2001. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev. Dyn.* 221, 117–145. doi:10.1002/dvdy.1144
- Conklin, E., 1932. The embryology of amphioxus. *J. Morphol.* 54.
- Copp, A.J., Greene, N.D.E., Murdoch, J.N., 2003. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat. Rev. Genet.* 4, 784–793. doi:10.1038/nrg1181
- Cunningham, D., Casey, E.S., 2014. Spatiotemporal development of the embryonic nervous system of *Saccoglossus kowalevskii*. *Dev. Biol.* 386, 252–263. doi:10.1016/j.ydbio.2013.12.001
- Davidson, E.H., Erwin, D.H., 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* 311, 796–800. doi:10.1126/science.1113832
- De Robertis, E.M., Kuroda, H., 2004. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 285–308. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.011403.154124
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D., Philippe, H., 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439, 965–968. doi:10.1038/nature04336

Introducción

- Delsuc, F., Tsagkogeorga, G., Lartillot, N., Philippe, H., 2008. Additional molecular support for the new chordate phylogeny. *Genesis* 46, 592–604. doi:10.1002/dvg.20450
- Denes, A.S., Jékely, G., Steinmetz, P.R.H., Raible, F., Snyman, H., Prud'homme, B., Ferrier, D.E.K., Balavoine, G., Arendt, D., 2007. Molecular Architecture of Annelid Nerve Cord Supports Common Origin of Nervous System Centralization in Bilateria. *Cell* 129, 277–288. doi:10.1016/j.cell.2007.02.040
- Ekhart, D., Korf, H.W., Wicht, H., 2003. Cytoarchitecture, Topography, and Descending Supraspinal Projections in the Anterior Central Nervous System of *Branchiostoma lanceolatum*. *J. Comp. Neurol.* 466, 319–330. doi:10.1002/cne.10803
- Erwin, D.H., Davidson, E.H., 2002. The last common bilaterian ancestor. *Development* 129, 3021–3032.
- Ferran, J.L., de Oliveira, E.D., Merchán, P., Sandoval, J.E., Sánchez-Arrones, L., Martínez-de-la-Torre, M., Puellas, L., 2009. Genoarchitectonic profile of developing nuclear groups in the chicken pretectum. *J. Comp. Neurol.* 517, 405–451. doi:10.1002/cne.22115
- Ferran, J.L., Sánchez-Arrones, L., Bardet, S.M., Sandoval, J.E., Martínez-de-la-Torre, M., Puellas, L., 2008. Early pretectal gene expression pattern shows a conserved anteroposterior tripartition in mouse and chicken. *Brain Res. Bull.* 75, 295–298. doi:10.1016/j.brainresbull.2007.10.039
- Ferrier, D.E.K., Brooke, N.M., Panopoulou, G., Holland, P.W.H., 2001. The Mnx homeobox gene class defined by HB9, MNR2 and amphioxus *AmphiMnx*. *Dev. Genes Evol.* 211, 103–107. doi:10.1007/s004270000124
- García-Fernández, J., Holland, P.W., 1994. Archetypal organization of the amphioxus Hox gene cluster. *Nature* 370, 563–6. doi:10.1038/370563a0
- Garda, A., Echevarría, D., Martínez, S., 2000. Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmic organizer. *Development* 127, 111–118.
- Gillis, W.Q., St John, J., Bowerman, B., Schneider, S.Q., 2009. Whole genome duplications and expansion of the vertebrate GATA transcription factor gene family. *BMC Evol. Biol.* 9, 207. doi:10.1186/1471-2148-9-207
- Glardon, S., Holland, L.Z., Gehring, W.J., Holland, N.D., 1998. Isolation and developmental expression of the amphioxus Pax-6 gene (*AmphiPax-6*): insights into eye and photoreceptor evolution. *Development* 125, 2701–10.
- Gorbman, a, Nozaki, M., Kubokawa, K., 1999. A brain-Hatschek's pit connection in amphioxus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 251–4. doi:10.1006/gcen.1998.7193
- Gostling, N.J., Shimeld, S.M., 2003. Protochordate Zic genes define primitive somite compartments and highlight molecular changes underlying neural crest evolution. *Evol. Dev.* 5, 136–44.
- Hidalgo-Sánchez, M., Millet, S., Bloch-Gallego, E., Alvarado-Mallart, R.-M., 2005. Specification of the meso-isthmo-cerebellar region: the Otx2/Gbx2 boundary. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49, 134–49. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.01.010
- Hirata, T., Nakazawa, M., Muraoka, O., Nakayama, R., Suda, Y., Hibi, M., 2006. Zinc-finger genes Fez and Fez-like function in the establishment of diencephalon subdivisions. *Development* 133, 3993–4004. doi:10.1242/dev.02585
- Hirth, F., Kammermeier, L., Frei, E., Walldorf, U., Noll, M., Reichert, H., 2003. An urbilaterian origin of the tripartite brain: developmental genetic insights from *Drosophila*. *Development* 130, 2365–2373. doi:10.1242/dev.00438
- Holland, L.Z., Kene, M., Williams, N. a, Holland, N.D., 1997. Sequence and embryonic expression of the amphioxus engrailed gene (*AmphiEn*): the metameric pattern of transcription resembles that of its segment-polarity homolog in *Drosophila*. *Development* 124, 1723–32.

- Holland, L.Z., Schubert, M., Kozmik, Z., Holland, N.D., 1999. *AmphiPax3/7*, an amphioxus paired box gene: insights into chordate myogenesis, neurogenesis, and the possible evolutionary precursor of definitive vertebrate neural crest. *Evol. Dev.* 1, 153–65.
- Holland, L.Z., Venkatesh, T. V., Gorlin, a, Bodmer, R., Holland, N.D., 1998. Characterization and developmental expression of *AmphiNk2-2*, an NK2 class homeobox gene from Amphioxus. (Phylum Chordata; Subphylum Cephalochordata). *Dev. Genes Evol.* 208, 100–5.
- Holland, N.D., Panganiban, G., Henyey, E.L., Holland, L.Z., 1996. Sequence and developmental expression of *AmphiDll*, an amphioxus Distal-less gene transcribed in the ectoderm, epidermis and nervous system: insights into evolution of craniate forebrain and neural crest. *Development* 122, 2911–20.
- Holland, P.W., Holland, L.Z., Williams, N. a, Holland, N.D., 1992. An amphioxus homeobox gene: sequence conservation, spatial expression during development and insights into vertebrate evolution. *Development* 116, 653–61.
- Irimia, M., Denuc, A., Burguera, D., Somorjai, I., Martín-Durán, J.M., Genikhovich, G., Jimenez-Delgado, S., Technau, U., Roy, S.W., Marfany, G., Garcia-Fernández, J., 2011. Stepwise assembly of the Nova-regulated alternative splicing network in the vertebrate brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5319–24. doi:10.1073/pnas.1012333108
- Irimia, M., Maeso, I., Garcia-Fernández, J., 2008. Convergent evolution of clustering of Iroquois homeobox genes across metazoans. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1521–1525. doi:10.1093/molbev/msn109
- Irimia, M., Piñeiro, C., Maeso, I., Gómez-Skarmeta, J.L., Casares, F., Garcia-Fernández, J., 2010. Conserved developmental expression of *Fezf* in chordates and *Drosophila* and the origin of the Zona Limitans Intrathalamica (ZLI) brain organizer. *Evodevo* 1, 7. doi:10.1186/2041-9139-1-7
- Kaltenbach, S.L., Holland, L.Z., Holland, N.D., Koop, D., 2009. Developmental expression of the three iroquois genes of amphioxus (*BflrxA*, *BflrxB*, and *BflrxC*) with special attention to the gastrula organizer and anteroposterior boundaries in the central nervous system. *Gene Expr. Patterns* 9, 329–34. doi:10.1016/j.gep.2009.02.003
- Kaul, S., Stach, T., 2010. Ontogeny of the collar cord: neurulation in the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii*. *J. Morphol.* 271, 1240–59. doi:10.1002/jmor.10868
- Kerner, P., Simionato, E., Le Gouar, M., Vervoort, M., 2009. Orthologs of key vertebrate neural genes are expressed during neurogenesis in the annelid *Platynereis dumerilii*. *Evol. Dev.* 11, 513–524. doi:10.1111/j.1525-142X.2009.00359.x
- Kiecker, C., Lumsden, A., 2012. The Role of Organizers in Patterning the Nervous System. doi:10.1146/annurev-neuro-062111
- Knight, R.D., Panopoulou, G.D., Holland, P.W., Shimeld, S.M., 2000. An amphioxus *Krox* gene: insights into vertebrate hindbrain evolution. *Dev. Genes Evol.* 210, 518–21. doi:10.1007/s004270050341
- Koyanagi, M., Terakita, A., 2008. Gq-coupled rhodopsin subfamily composed of invertebrate visual pigment and melanopsin. *Photochem. Photobiol.* 84, 1024–1030. doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00369.x
- Kozmik, Z., Holland, N.D., Kalousova, a, Paces, J., Schubert, M., Holland, L.Z., 1999. Characterization of an amphioxus paired box gene, *AmphiPax2/5/8*: developmental expression patterns in optic support cells, nephridium, thyroid-like structures and pharyngeal gill slits, but not in the midbrain-hindbrain boundary region. *Development* 126, 1295–304.
- Kozmik, Z., Holland, N.D., Kreslova, J., Oliveri, D., Schubert, M., Jonasova, K., Holland, L.Z., Pestarino, M., Benes, V., Candiani, S., 2007. Pax-Six-Eya-Dach network during amphioxus development: conservation in vitro but context specificity in vivo. *Dev. Biol.* 306, 143–59. doi:10.1016/j.ydbio.2007.03.009

Introducción

- Kuhlenbeck, H., 1967. The Central Nervous System of Vertebrates. *Yale J. Biol. Med.* 40, 170. doi:10.1097/00005053-190710000-00021
- Lacalli, T.C., 1996. Frontal Eye Circuitry, Rostral Sensory Pathways and Brain Organization in *Amphioxus* Larvae: Evidence from 3D Reconstructions. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 351, 243–263. doi:10.1098/rstb.1996.0022
- Lacalli, T.C., 2003. Ventral neurons in the anterior nerve cord of amphioxus larvae. II. Further data on the pacemaker circuit. *J. Morphol.* 257, 212–8. doi:10.1002/jmor.10133
- Lacalli, T.C., 2008. Basic features of the ancestral chordate brain: a protochordate perspective. *Brain Res. Bull.* 75, 319–23. doi:10.1016/j.brainresbull.2007.10.038
- Lacalli, T.C., Holland, N.D., West, J.E., 1994. Landmarks in the Anterior Central Nervous System of *Amphioxus* Larvae. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 344, 165–185. doi:10.1098/rstb.1994.0059
- Lacalli, T.C., Kelly, S.J., 2003. Sensory pathways in amphioxus larvae II . Dorsal tracts and transluminal cells 13, 1–13.
- Lacalli, T.C., Kelly, S.J., 2003. Ventral neurons in the anterior nerve cord of amphioxus larvae. I. An inventory of cell types and synaptic patterns. *J. Morphol.* 257, 190–211. doi:10.1002/jmor.10114
- Langeland, J. a., Tomsa, J.M., Jackman Jr., W.R., Kimmel, C.B., 1998. An amphioxus snail gene: Expression in paraxial mesoderm and neural plate suggests a conserved role in patterning the chordate embryo. *Dev. Genes Evol.* 208, 569–577. doi:10.1007/s004270050216
- Langeland, J.A., Holland, L.Z., Chastain, R.A., Holland, N.D., 2006. An amphioxus LIM-homeobox gene, *AmphiLim1/5*, expressed early in the invaginating organizer region and later in differentiating cells of the kidney and central nervous system 2, 110–116.
- Lin, H.-C., Holland, L.Z., Holland, N.D., 2006. Expression of the *AmphiTcf* gene in amphioxus: insights into the evolution of the TCF/LEF gene family during vertebrate evolution. *Dev. Dyn.* 235, 3396–403. doi:10.1002/dvdy.20971
- Lowe, C.J., Terasaki, M., Wu, M., Freeman, R.M., Runft, L., Kwan, K., Haigo, S., Aronowicz, J., Lander, E., Gruber, C., Smith, M., Kirschner, M., Gerhart, J., 2006. Dorsoventral patterning in hemichordates: Insights into early chordate evolution. *PLoS Biol.* 4, 1603–1619. doi:10.1371/journal.pbio.0040291
- Lowe, C.J., Wu, M., Salic, A., Evans, L., Lander, E., Stange-Thomann, N., Gruber, C.E., Gerhart, J., Kirschner, M., 2003. Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* 113, 853–865. doi:10.1016/S0092-8674(03)00469-0
- Mashanov, V.S., Zueva, O.R., Heinzeller, T., Aschauer, B., Dolmatov, I.Y., 2007. Developmental origin of the adult nervous system in a holothurian: An attempt to unravel the enigma of neurogenesis in echinoderms. *Evol. Dev.* 9, 244–256. doi:10.1111/j.1525-142X.2007.00157.x
- Mazet, F., Masood, S., Luke, G.N., Holland, N.D., Shimeld, S.M., 2004. Expression of *AmphiCoe*, an *Amphioxus* COE/EBF Gene, in the Developing Central Nervous System and Epidermal Sensory Neurons. *Genesis* 38, 58–65. doi:10.1002/gene.20006
- Mazet, F., Shimeld, S.M., 2002. The Evolution of Chordate Neural Segmentation. *Dev. Biol.* 251, 258–270. doi:10.1006/dbio.2002.0831
- Mazet, F., Shimeld, S.M., 2003. Characterisation of an amphioxus *Fringe* gene and the evolution of the vertebrate segmentation clock. *Dev. Genes Evol.* 213, 505–9. doi:10.1007/s00427-003-0351-7
- Medina, L., Bupesh, M., Abellán, A., 2011. Contribution of genoarchitecture to understanding forebrain evolution and development, with particular emphasis on the amygdala. *Brain. Behav. Evol.* 78, 216–236. doi:10.1159/000330056
- Merchán, P., Bardet, S.M., Puelles, L., Ferran, J.L., 2011. Comparison of Pretectal Genoarchitectonic Pattern between Quail and Chicken Embryos. *Front. Neuroanat.* 5, 23. doi:10.3389/fnana.2011.00023

- Meulemans, D., Bronner-fraser, M., 2007. The amphioxus SoxB family: implications for the evolution of vertebrate placodes. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 356–64.
- Morona, R., Ferran, J.L., Puelles, L., González, A., 2011. Embryonic genoarchitecture of the pretectum in *Xenopus laevis*: A conserved pattern in tetrapods. *J. Comp. Neurol.* 519, 1024–1050. doi:10.1002/cne.22548
- Neidert, a H., Panopoulou, G., Langeland, J. a, 2000. Amphioxus goosecoid and the evolution of the head organizer and prechordal plate. *Evol. Dev.* 2, 303–10.
- Nicol, D., Meinertzhagen, I.A., 1988. Development of the central nervous system of the larva of the ascidian, *Ciona intestinalis* L. *Dev. Biol.* 130, 737–766. doi:10.1016/0012-1606(88)90364-8
- Nomaksteinsky, M., Röttinger, E., Dufour, H.D., Chettouh, Z., Lowe, C.J., Martindale, M.Q., Brunet, J.F., 2009. Centralization of the Deuterostome Nervous System Predates Chordates. *Curr. Biol.* 19, 1264–1269. doi:10.1016/j.cub.2009.05.063
- Northcutt, R.G., 2012. Evolution of centralized nervous systems: two schools of evolutionary thought. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 Suppl , 10626–33. doi:10.1073/pnas.1201889109
- Nozaki, M., Gorbman, A., 1992. The Question of Functional Homology of Hatschek’s Pit of Amphioxus (*Branchiostoma belcheri*) and the Vertebrate Adenohypophysis(Endocrinology). *Zoolog. Sci.* 9, 387–395.
- Pani, A.M., Mullarkey, E.E., Aronowicz, J., Assimacopoulos, S., Grove, E. a, Lowe, C.J., 2012. Ancient deuterostome origins of vertebrate brain signalling centres. *Nature* 483, 289–94. doi:10.1038/nature10838
- Pascual-Anaya, J., Adachi, N., Alvarez, S., Kuratani, S., D’Aniello, S., Garcia-Fernàndez, J., 2012. Broken colinearity of the amphioxus Hox cluster. *Evodevo* 3, 28. doi:10.1186/2041-9139-3-28
- Pascual-anaya, J., Albuixech-crespo, B., Somorjai, I.M.L., Carmona, R., Oisi, Y., Alvarez, S., Kuratani, S., Muñoz-Chápuli, R., Garcia-Fernàndez, J., Lara, M., Susana, A., 2013. The evolutionary origins of chordate hematopoiesis and vertebrate endothelia. *Dev. Biol.* 375, 182–92. doi:10.1016/j.ydbio.2012.11.015
- Pera, E.M., Acosta, H., Gougnard, N., Climent, M., Arregi, I., 2014. Active signals, gradient formation and regional specificity in neural induction. *Exp. Cell Res.* 321, 25–31. doi:10.1016/j.yexcr.2013.11.018
- Puelles, L., 1995. A segmental morphological paradigmfor understanding vertebrate forebrains. *Brain Behav. Evol.* 319–337.
- Puelles, L., Ferran, J.L., 2012. Concept of neural genoarchitecture and its genomic fundament. *Front. Neuroanat.* 6, 47. doi:10.3389/fnana.2012.00047
- Puelles, L., Rubenstein, J.L., 1993. Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* 16, 472–479. doi:10.1016/0166-2236(93)90080-6
- Puelles, L., Rubenstein, J.L.R., 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 26, 469–76. doi:10.1016/S0166-2236(03)00234-0
- Puelles, L., Rubenstein, J.L.R., 2015. A new scenario of hypothalamic organization: rationale of new hypotheses introduced in the updated prosomeric model. *Front. Neuroanat.* 9, 1–23. doi:10.3389/fnana.2015.00027
- Rodríguez-Seguel, E., Alarcón, P., Gómez-Skarmeta, J.L., 2009. The *Xenopus* *lrx* genes are essential for neural patterning and define the border between prethalamus and thalamus through mutual antagonism with the anterior repressors *Fezf* and *Arx*. *Dev. Biol.* 329, 258–68. doi:10.1016/j.ydbio.2009.02.028
- Schmidt-Rhaesa, A., 2007. The evolution of organ systems, Oxford University Press. doi:10.1093/acprof:oso/9780198566687.001.0001

Introducción

- Schomerus, C., Korf, H.-W., Laedtke, E., Moret, F., Zhang, Q., Wicht, H., 2008. Nocturnal behavior and rhythmic period gene expression in a lancelet, *Branchiostoma lanceolatum*. *J. Biol. Rhythms* 23, 170–181. doi:10.1177/0748730407313363
- Schubert, M., Holland, L.Z., Panopoulou, G.D., Lehrach, H., Holland, N.D., 2000. Characterization of amphioxus *AmphiWnt8*: insights into the evolution of patterning of the embryonic dorsoventral axis. *Evol. Dev.* 2, 85–92.
- Schubert, M., Holland, L.Z., Stokes, M.D., Holland, N.D., 2001. Three amphioxus *Wnt* genes (*AmphiWnt3*, *AmphiWnt5*, and *AmphiWnt6*) associated with the tail bud: the evolution of somitogenesis in chordates. *Dev. Biol.* 240, 262–73. doi:10.1006/dbio.2001.0460
- Sharman, a C., Shimeld, S.M., Holland, P.W., 1999. An amphioxus *Msx* gene expressed predominantly in the dorsal neural tube. *Dev. Genes Evol.* 209, 260–3.
- Shimeld, S.M., 1999. The evolution of the hedgehog gene family in chordates: insights from amphioxus hedgehog. *Dev. Genes Evol.* 209, 40–7.
- Shimeld, S.M., 2008. C2H2 zinc finger genes of the *Gli*, *Zic*, *KLF*, *SP*, Wilms' tumour, *Huckebein*, *Snail*, *Ovo*, *Spalt*, *Odd*, *Blimp-1*, *Fez* and related gene families from *Branchiostoma floridae*. *Dev. Genes Evol.* 218, 639–49. doi:10.1007/s00427-008-0248-6
- Solnica-Krezel, L., Sepich, D.S., 2012. Gastrulation: Making and Shaping Germ Layers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 687–717. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154043
- Somorjai, I., Bertrand, S., Camasses, A., Haguenaer, A., Escriva, H., 2008. Evidence for stasis and not genetic piracy in developmental expression patterns of *Branchiostoma lanceolatum* and *Branchiostoma floridae*, two amphioxus species that have evolved independently over the course of 200 Myr. *Dev. Genes Evol.* 218, 703–13. doi:10.1007/s00427-008-0256-6
- Spemann, H., Mangold, H., 1924. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. *Int. J. Dev. Biol.* 45, 13–38.
- Steinmetz, P.R.H., Kostyuchenko, R.P., Fischer, A., Arendt, D., 2011. The segmental pattern of *otx*, *gbx*, and *Hox* genes in the annelid *Platynereis dumerilii*. *Evol. Dev.* 13, 72–79. doi:10.1111/j.1525-142X.2010.00457.x
- Stern, C.D., 2006. Neural induction: 10 years on since the “default model.” *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 692–697. doi:10.1016/j.ceb.2006.09.002
- Terazawa, K., Satoh, N., 1997. Formation of the chordamesoderm in the amphioxus embryo: Analysis with *Brachyury* and fork head/*HNF-3* genes. *Dev. Genes Evol.* 207, 1–11. doi:10.1007/s004270050086
- Venkatesh, T. V., Holland, N.D., Holland, L.Z., Su, M.T., Bodmer, R., 1999. Sequence and developmental expression of amphioxus *AmphiNk2-1*: insights into the evolutionary origin of the vertebrate thyroid gland and forebrain. *Dev. Genes Evol.* 209, 254–9.
- Vieira, C., Pombero, A., García-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarria, D., Martínez, S., 2010. Molecular mechanisms controlling brain development: An overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 7–20. doi:10.1387/ijdb.092853cv
- Vopalensky, P., Pergner, J., Liegertova, M., Benito-Gutierrez, E., Arendt, D., Kozmik, Z., 2012. Molecular analysis of the amphioxus frontal eye unravels the evolutionary origin of the retina and pigment cells of the vertebrate eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 15383–8. doi:10.1073/pnas.1207580109
- Wada, H., Garcia-Fernández, J., Holland, P.W., 1999. Colinear and segmental expression of amphioxus *Hox* genes. *Dev. Biol.* 213, 131–41. doi:10.1006/dbio.1999.9369
- Weinstein, D.C., Hemmati-brivanlou, A., 1999. Neural induction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 411–33.
- Wicht, H., Lacalli, T.C., 2005. The nervous system of amphioxus: structure, development, and evolutionary significance. *Can. J. Zool.* 83, 122–150. doi:10.1139/z04-163

- Wicht, H., Laedtke, E., Korf, H.W., Schomerus, C., 2010. Spatial and temporal expression patterns of *Bmal* delineate a circadian clock in the nervous system of *Branchiostoma lanceolatum*. *J. Comp. Neurol.* 518, 1837–1846. doi:10.1002/cne.22306
- Williams, N. a, Holland, P.W., 1998. Gene and domain duplication in the chordate *Otx* gene family: insights from amphioxus *Otx*. *Mol. Biol. Evol.* 15, 600–7.
- Wilson, L., Maden, M., 2005. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev. Biol.* 282, 1–13. doi:10.1016/j.ydbio.2005.02.027
- Yu, J.-K., Holland, N.D., Holland, L.Z., 2002. An amphioxus winged helix/forkhead gene, *AmphiFoxD*: insights into vertebrate neural crest evolution. *Dev. Dyn.* 225, 289–97. doi:10.1002/dvdy.10173

Objetivos

El conocimiento sobre el origen y la historia evolutiva de los sistemas nerviosos centrales es clave para comprender en todo su espectro la complejidad y funcionalidad de los sistemas nerviosos hoy existentes. Para ello, la comparativa y el estudio detallado del desarrollo de las estructuras neurales complejas como el de los vertebrados, entre ellos, y con el de otros cordados nos proporciona una idea de qué manera las innovaciones y los cambios evolutivos han actuado en el curso de la evolución.

Por todo ello, los objetivos de esta tesis se pueden resumir en:

1. Caracterizar la genoarquitectura del sistema nervioso del anfioxo durante su establecimiento y desarrollo.
2. Analizar la genoarquitectura de la placa neural del anfioxo y obtener un modelo para comparación.
3. Aplicar del modelo obtenido para comprender e identificar los derivados del tubo neural del anfioxo adulto.
4. Realizar comparativas, con otros modelos de sistemas nerviosos equiparables, como el de vertebrados.
5. Testar las homologías descritas.

Resultados

Tal y como ha sido descrito en la introducción de esta tesis, y con el fin de caracterizar en detalle la genoarquitectura del anfiexo en desarrollo, se han realizado múltiples ISH y FISH simples y dobles en neurulas de 21hpf. Éste estadio del desarrollo del anfiexo nos permite analizar la genoarquitectura de la placa neural del anfiexo cuando aún está abierta.

Analizados todos los patrones de expresión de los cerca de 50 genes seleccionados relacionados con el patroneo y desarrollo neurales en vertebrados, fueron clasificados según la región en la que se demarcaba su expresión utilizándolos como herramienta para definir subdivisiones en la placa neural. Muchos de los genes analizados habían sido previamente descritos en la literatura. En la tabla I1 se mencionan los números de acceso para estos genes, sus referencias correspondientes y los datos de expresión concreta que se facilita en la literatura para comparación.

Los estadios embrionarios analizados en la literatura son muy diversos, lo que dificulta hacer comparativas acuradas, es por ello que en este escaneo nos centramos en momentos concretos de la neurulación del anfiexo y añadimos datos concretos de otros momentos puntuales en la ontogenia para añadir profundidad y coherencia al modelo.

En los siguientes apartados se describen las subdivisiones resultantes del escaneo genoarquitectónico realizado y se nombran arbitrariamente. Dicha nomenclatura será justificada en la discusión.

Nota sobre la nomenclatura: DiMeP: DiMesencéfalo Primordial; HyP: Hipotálamo Primordial; RhSp: Rombo-eSpinal.

Nota sobre las figuras: en todas las figuras que se especifican las vistas (VD: vista dorsal; VL: vista lateral), las barras de escala (50 μ m para anfiexo y 250 μ m para pollo) y los estadios embrionarios (variable) analizados en cada figura.

Resultados

Las principales subdivisiones rostrocaudales

De la misma manera que ocurre en vertebrados, en la placa neural del anfibio la aposición entre la subdivisión Otx positiva (Figura I12; B,C) y la Gbx positiva (Figura I12; G,H), define esta primera frontera entre estos dos grandes territorios o subdivisiones desde muy pronto en el desarrollo. Las neurulas de 15hpf (Figura I12,D,E,I,J), donde apenas se acaba de especificar el neuroectodermo, ya presentan esta aposición entre territorios Gbx/Otx positivos. En la placa neural de *Gallus gallus*, en un estadio equivalente de apertura de placa (HH5), la aposición de los marcadores (A,F) de estas dos grandes subdivisiones se aprecian claramente (Figura I12),

Otros marcadores como Fez parecen tener, de la misma manera, un patrón conservado entre la placa neural de vertebrados y cefalocordados (Figura I13, A, B, C). El dominio de expresión de Fez es rostral pero no abarca todo el territorio Otx-positivo, sino que deja un hueco rostral respecto a la frontera definida por Otx/Gbx (Figura I13. D, E). Además, otros marcadores como IrxB coinciden su límite rostral con el límite caudal de Fez, de esta manera podemos identificar la subdivisión interna dentro del territorio Otx-positivo. Nos referiremos a la subdivisión más rostral como HyP, a la más caudal dentro del territorio Otx-positivo o intermedia respecto a la totalidad de la placa, como DiMeP y, finalmente al territorio Gbx-positivo, nos referimos como RhSp.

El DiMeP

En la Figura R1 se muestran varios marcadores que por su ausencia (Fez-Gbx, Figura R1, A, A', A'') o presencia (Figura R1, B-H, B'-H', B''-H'') en la porción inmediatamente anterior al límite Otx/Gbx definen, *per se*, el dominio intermedio o DiMeP (Figura R1). Después de analizar el conjunto entero de marcadores moleculares seleccionados para el proyecto, cabe remarcar que en el dominio intermedio no aplican subdivisiones moleculares internas en el eje anteroposterior aunque sí incluye su complemento dorsoventral como Pou3f y Sim que se restringen a la zona basal (Figura R1. F, F', F'' y H, H', H''), a diferencia de Pax4/6 que demarca todo el territorio del DiMeP (Figura R1. B, B', B'' y C, C', C'').

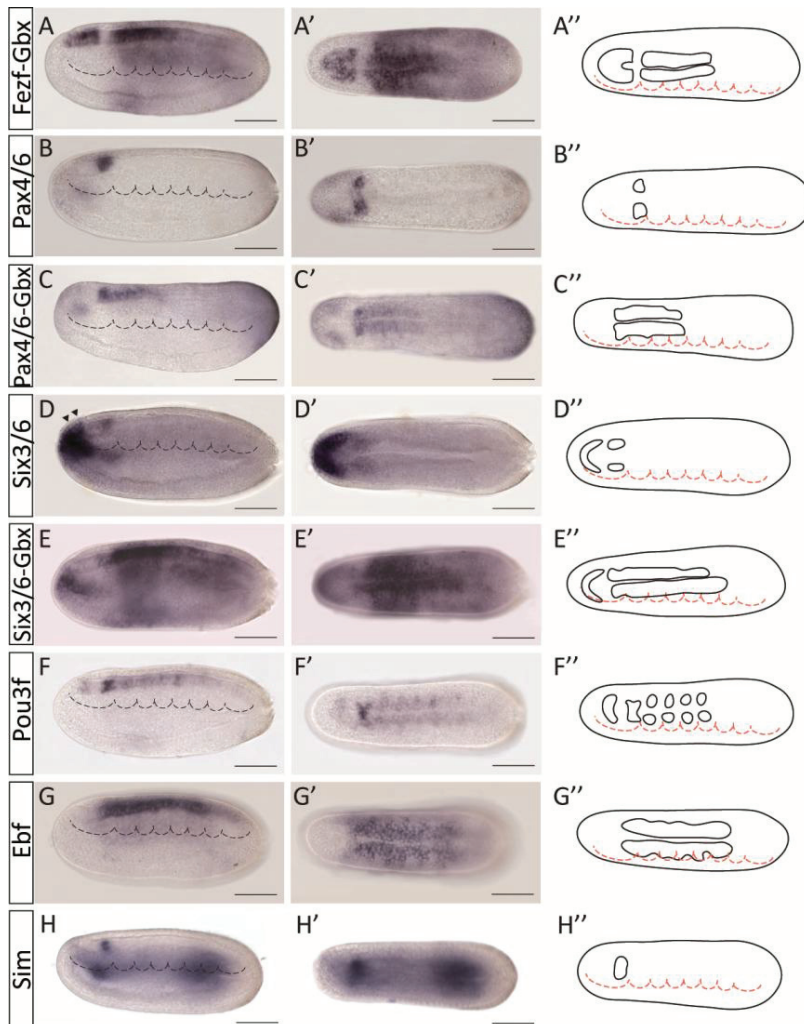


Figura R1. Marcadores que se expresan en el DiMeP. La demarcación del dominio intermedio o DiMeP se caracteriza por el hueco entre los patrones de expresión de Fezf y Gbx (A, A' y A'').

Resultados

El HyP y sus subdivisiones

Por el contrario, en el HyP (porción más anterior del territorio más rostral Otx-positivo de la placa neural) sí podemos definir subdominios internos caracterizados por su determinada combinación molecular concreta de marcadores.

El territorio del HyP está demarcado por la expresión de *Fezf*, aunque con menos intensidad cerca del suelo de la placa, de la misma manera que *Rx* que también se expresa en toda la subunidad rostral como se aprecia en la Figura R2 en ISH colorimétricas (Figura R2. A, A', A''; H, H' y H'' respectivamente). Otros marcadores no cubren la totalidad del territorio del HyP como *Nk2.2* (Figura R2. B-C, B'-C', B''- C'') que se restringe a la parte más rostral. En la FISH combinada de *Nk2.2-IrxB* (Figura R2. E,E', E'') se aprecia un pequeño hueco, correspondiente a una (como mucho dos) fila de células que no expresan *Nk2.2* en la parte más caudal del HyP con respecto a la frontera HyP/DiMeP caracterizada por la expresión de los genes *Irx* (Figura R2. I, I', I'').

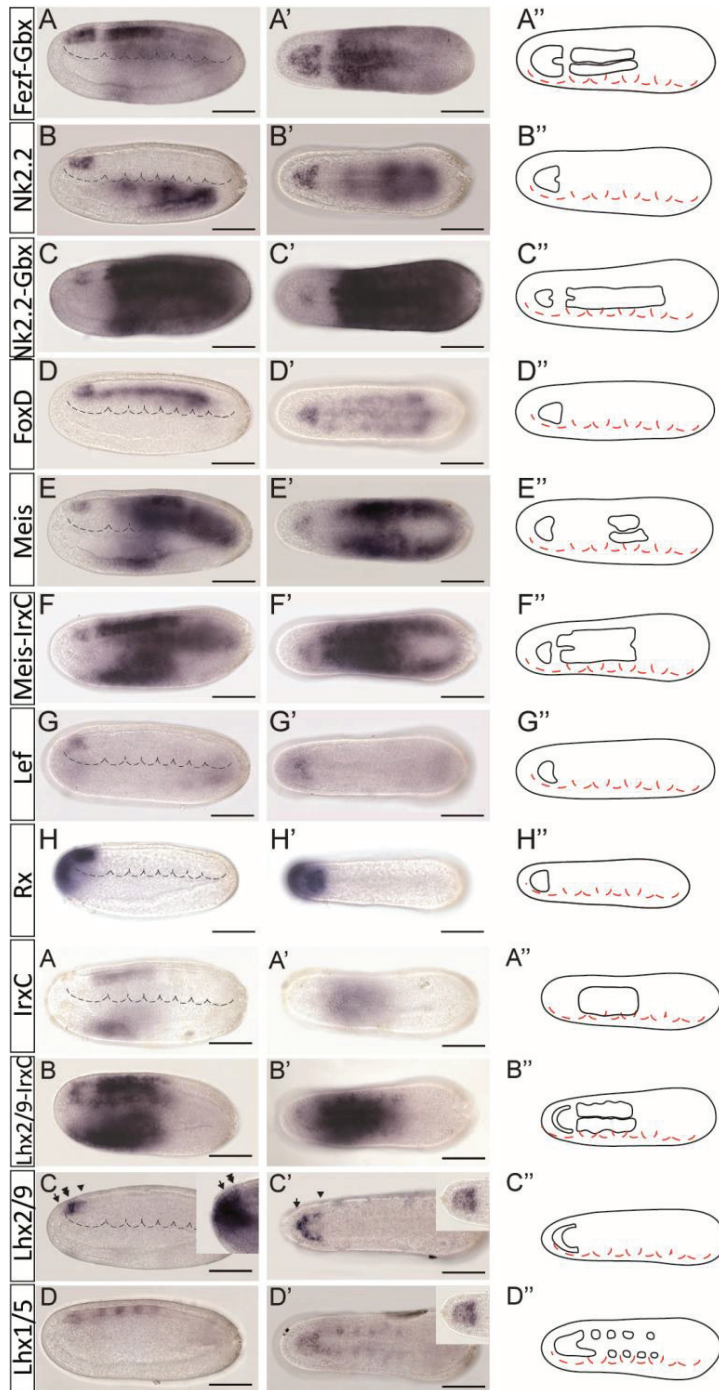


Figura R2. El Hyp y sus subdivisiones internas. (A-H) vista lateral, (A'-H') vista dorsal, (A''-H'') representación gráfica del componente neural del patrón de expresión del gen respectivo.

Resultados

De la misma manera, la combinación de Meis con IrxC deja un hueco en la parte caudal del HyP (Figura R2. E,F,E',F',E'' y F''), pero, a diferencia de Nk2.2, por comparación con otros marcadores rostrales, como Fezf o el propio Nk2.2 se puede apreciar que Meis se expresa en la región basal y que no se expresa en la parte alar de la parte más rostral de la placa. Otros marcadores como Lef y FoxD también se expresan sólo en la zona basal del HyP con distintos límites caudales de expresión. Lef comparte límite posterior de expresión con Meis y FoxD extiende su dominio de expresión hasta la frontera HyP/DiMeP como se observa por su aposición con el marcador del DiMeP, Pax4/6 (Figura R3. F, F' y F''). Lhx1/5 también entra en la categoría de marcador del HyP basal pero además, también se extiende caudalmente también en su componente basal, de la misma manera que lo hace Six3/6 en el DiMeP. Lhx2/9, en contraposición, se expresa selectivamente en el componente alar del subdominio más rostral del HyP, y la fracción neural más anterior de la expresión de Six3/6 también se incluye en el componente alar del HyP, en este caso en una pequeña fracción en la parte más rostral de la placa neural (ver comparativa con la inserción de Six3/6 en la Figura R2. K, K' Las cabezas de flecha y las flechas determinan posiciones equivalentes y relativas entre los patrones de expresión de Six3/6 y Lhx2/9, respecto a la extensión del territorio del HyP demarcado por la inserción de Fezf).

Al analizar en detalle el conjunto de marcadores que determinan el componente alar del HyP cabe destacar que el análisis del componente alar más rostral de Six3/6 nos permite definir la tercera subunidad en el territorio del HyP.

Las Fronteras HyP/DiMeP/RhSp

Como se ha mencionado anteriormente Fezf y Rx son marcadores del HyP como se puede apreciar en la Figura R3. Además, se puede apreciar en FISH combinadas su relación y la frontera con el subdominio adyacente. Fez-Pax4/6-Gbx (Figura R3. A, A' y A'') demarcan, con límites colindantes, definiendo las tres principales subunidades de forma anteroposterior: Hyp, DiMeP y RhSp. Tanto la reconstrucción 3D (Figura R3, B y B') como la magnificación a gran resolución (Figura R3, B'') muestran que los marcadores presentan límites muy definidos y no existe colocalización entre ellos. Por su parte, Rx-IrxB (Figura R3, D, D' y D'')

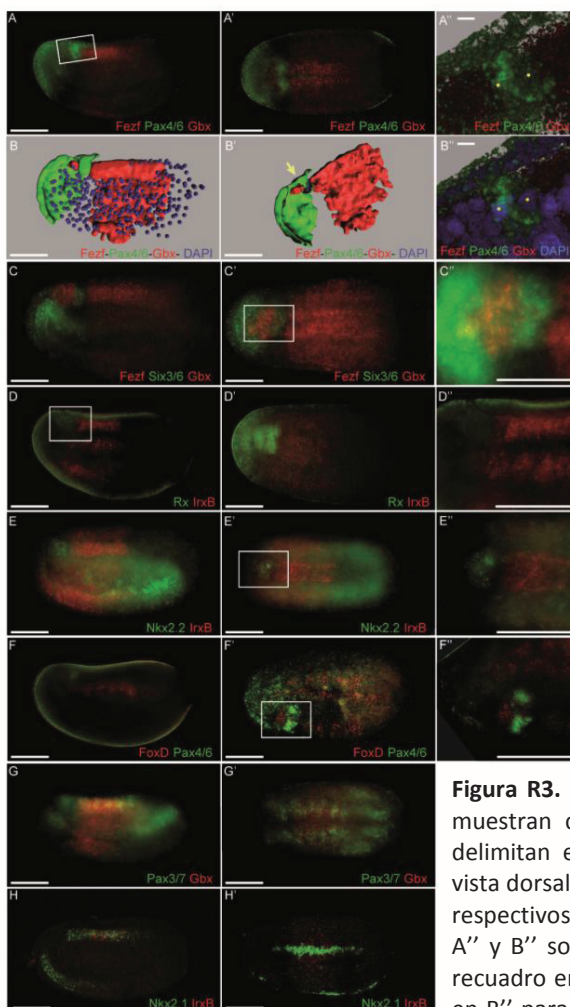


Figura R3. Las fronteras HyP/DiMeP/RhSp. Las FISH muestran combinaciones específicas de genes que delimitan estas barreras. (A-H) vista lateral, (A'-H') vista dorsal, (C''-H'') magnificaciones de los recuadros respectivos. B, B' son reconstrucciones 3D con IMARIS. A'' y B'' son magnificaciones de gran resolución del recuadro en A incluyendo el recuento nuclear (DAPI) en B'' para referencia de tamaño y posición nuclear. Las estrellas representan los núcleos en A''.

también define, sin solapamientos, el límite Hyp/DiMeP. Además, gracias al análisis de la alta magnificación del dominio intermedio DiMeP (Figura R3, A'', B, B', B''), se puede identificar que está compuesto por dos hileras de células en el sentido anteroposterior, pax6-positivas. Se observan dos mesetas (verdes), aunque de intensidades distintas, por encima del valor medio de intensidad inespecífica. (Figura R4).

Resultados

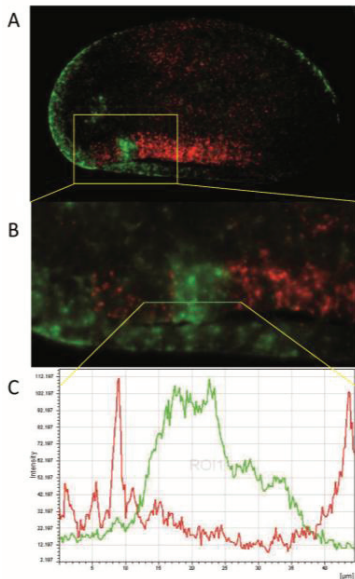


Figura R4. El DiMeP está formado por dos hileras de células que expresan pax6. B es una magnificación del recuadro en A. C es un gráfico de intensidad del área seleccionada por la línea que atraviesa el DiMeP. Tamaño medio de una célula 12µm. Anterior hacia la izquierda. Dorsal hacia abajo.

La metamerización caudal: El RhSp

De la misma manera que el HyP y el DiMeP, en la subunidad más caudal de la placa neural del anfiexo podemos diferenciar sus componentes dorsoventrales. Es fácil observar que marcadores como Hox3, Hox6, FoxB, (Figura R5, F, F' y F'') y Pou3f (Figura R1, F, F' y F'') se expresan selectivamente en la región basal del RhSp. En contraposición, marcadores como Pax2/5/8, Pax3/7, Msx (Figura R5, G-I, G'-I', G''-I'') o Nova (Figura R6, F, F' y F'') restringen su presencia en el RhSp a su porción alar.

Además, de la misma manera que el HyP, el RhSp está regionalizado anteroposteriormente. Podemos distinguir como mínimo 5 particiones A/P asociadas con límites intersomíticos. Wnt3, Wnt7 (Figura R6, D,E,D',E', D'' y E'') y FoxB (Figura R5, F, F' y F'') definen nítidamente la frontera DiMeP/RhSp en sus límites anteriores. Los genes Hox 1, 3 y 6 (Figura R5, C-E, C'-E' y C''-E'') definen bordes intersomíticos S3/4, S4/5 y S5/6 respectivamente. Por otra parte, otros genes tienen patrones de expresión iterativos con periodicidades que se alinean con el centro de cada somita adyacente, como en el caso de Lhx1/5 (Figura R2, L, L' y L') o Pou3f

(Figura R1, F, F' y F''), o que son coincidentes con el propio límite intersomítico como Pax3/7 (Figura R5, H, H' y H''). Nova (Figura R6, F, F' y F''). y Pax2/5/8 (Figura R5, G, G' y G'') tienen patrones de expresión restringidos a la mitad posterior o anterior de cada somita adyacente, respectivamente.

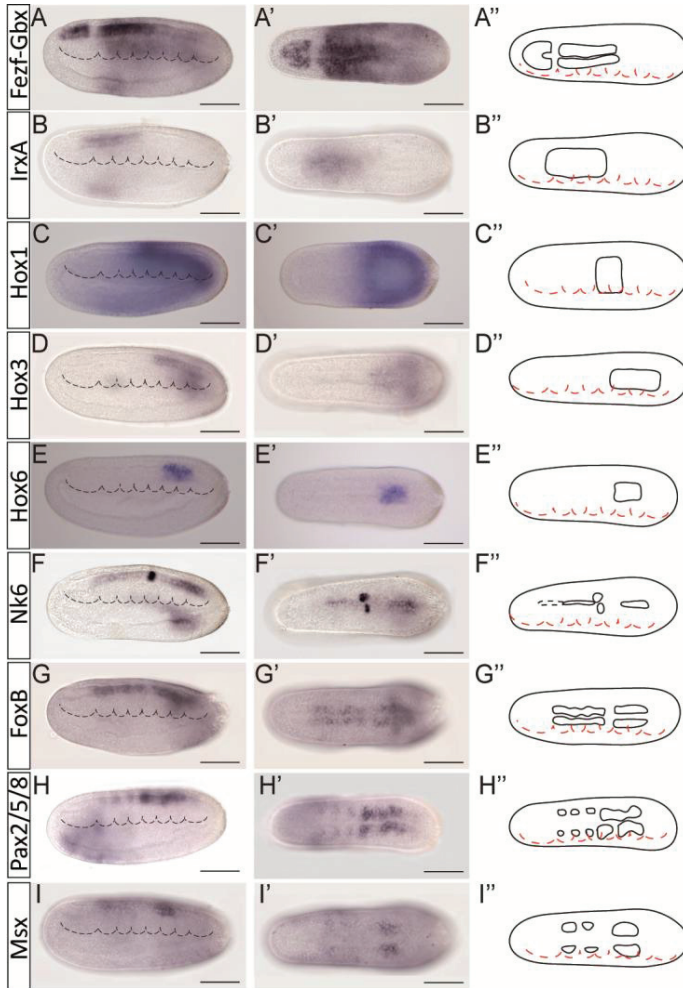


Figura R5. El RhSp y sus subdivisiones internas. (A-H) vista lateral, (A'-H') vista dorsal, (A''-H'') representación gráfica del componente neural del patrón de expresión del gen respectivo.

Curiosamente, al analizar los patrones de expresión de los genes Msx, FoxB, Nkx6, Nova, Meis y Pax2/5/8 se puede observar un cambio común en sus patrones de expresión a lo largo del eje anteroposterior. A nivel del somita 5, al nivel donde el primer *pigment spot* aparecerá en anfibio, los genes FoxB y Nova decrecen en intensidad de expresión mientras que Nkx6 y Otp presentan una clara acumulación de transcritos en este punto exacto.

Resultados

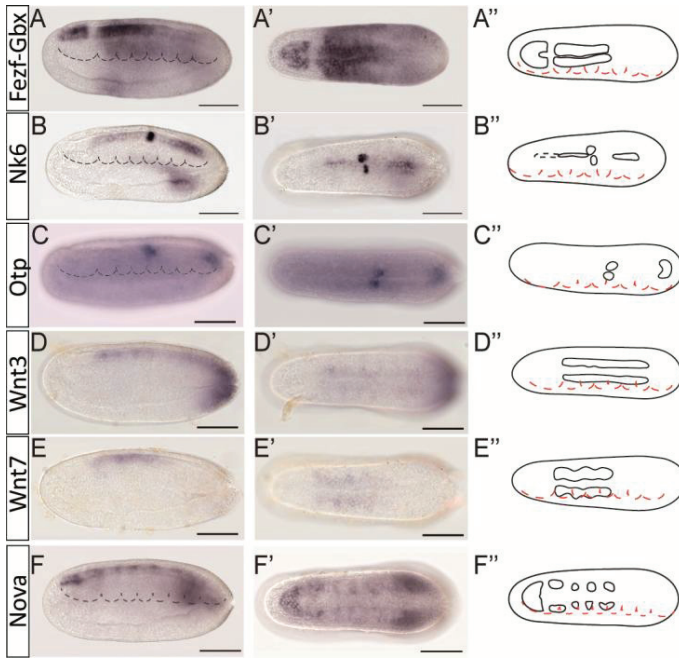


Figura R6. El RhSp y sus subdivisiones internas, otros patrones de expresión que regionalizan caudalmente la placa neural. (A-H) vista lateral, (A'-H') vista dorsal, (A''-H'') representación gráfica del componente neural del patrón de expresión del gen respectivo.

Regionalización del suelo de la placa y la notocorda

En el suelo de la placa neural se expresan varios marcadores que extienden su dominio a éste y el componente basal de la placa o, incluso el alar, como en el caso de los genes *Irx* (*IrxA*, Figura R5, B' y B''; *IrxB*, Figura I13, C, F' y G; *IrxC*, Figura R2,, I, I' y I''). *FoxA2* es un marcador de notocorda, en la Figura R7 se confirma en los cortes histológicos que este gen no se expresa en el suelo de la placa (Figura R7 A, E, I y J), los que sí lo hacen con *Nkx2.1*, *Hh* y *Gsc* (Figura R7. *Nkx2.1*, B, F, K y L; *Hh*, C, G, M y N; *Gsc*, D, H, O y P). El primero de ellos demarca en su patrón de expresión toda la extensión del suelo de la placa. En contra de lo anteriormente sugerido, *Hh* no alcanza el extremo más anterior del suelo sino que su patrón de expresión se extiende rostralmente desde el límite *Hyp/DiMeP* hacia la parte más caudal de la placa.

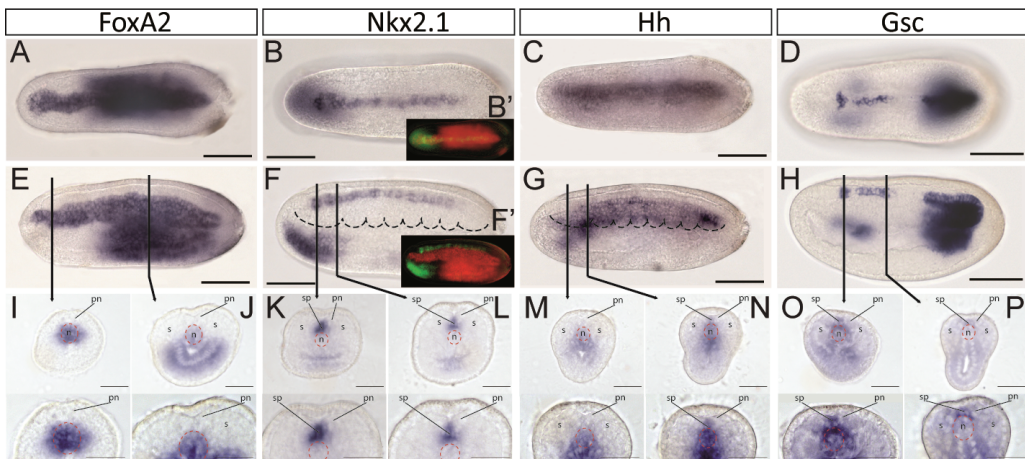


Figura Floorplate. Territorio del suelo de la placa neural. Expresión del marcador mesodérmico *FoxA2*, A, E, I y J. Expresión del marcador *Nkx2.1*, B, F, K y L. Expresión del marcador *Hh*, C, G, M y N. Expresión del marcador *Gsc*, D, H, O y P. B' y F' son sobreposiciones en falso color para los patrones de expresión de *FoxA2* (rojo) y *Nkx2.1* (verde) mostrando la localización diferenciada de ambos. A – D y B' son vistas dorsales; E – H y F' son vistas laterales, I-P son cortes histológicos a la altura de las flechas respectivas con sus magnificaciones correspondientes debajo. pn, placa neural; s, somita; sp, suelo de la placa neural; n, notocorda.

Resultados

Como se ha mencionado anteriormente, Nkx2.1 marca todo el suelo de la placa a diferencia de otros marcadores que exhiben la existencia de diferentes unidades genoarquitectónicas a lo largo del eje anteroposterior, como por ejemplo, Gsc en su patrón dicontinuo a lo largo del suelo. Además Nkx2.1 manifiesta un patrón altamente dinámico durante el desarrollo del anfiexo (Figura R8), demarcando toda la extensión de la placa en estadios tempranos y restringiéndose definitivamente en el suelo del HyP, sugiriendo la existencia de la organización anteroposterior del suelo de la placa de la misma manera que ocurre en el resto de ella.

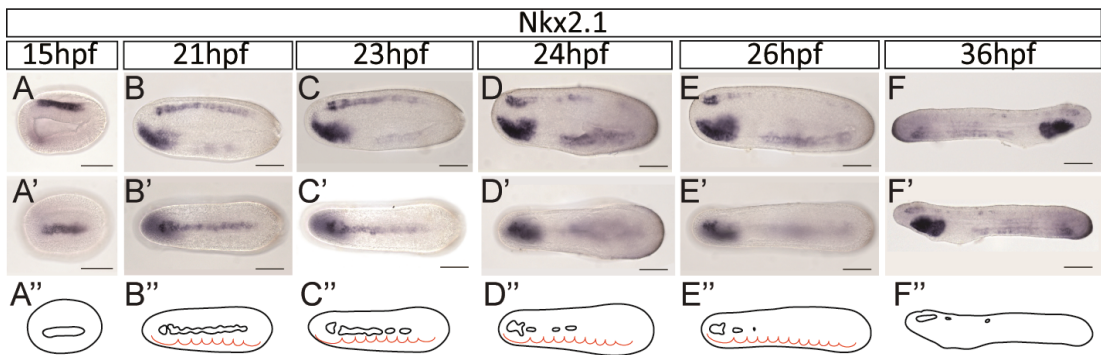


Figura R8. Dinamismo en el patrón de expresión de Nkx2.1 durante el desarrollo embrionario del anfiexo. A-E y F' visión lateral izquierda; A'-E' visión dorsal; F, visión lateral derecha. A''-F'', representaciones gráficas del componente neural del patrón de expresión en el estadio correspondiente. hpf, horas post fertilización.

De la misma manera, parece existir un nivel de organización rostrocaudal en la notocorda evidenciado por la combinatoria diferencial de la porción más anterior de ésta) comparada con el resto, que se establece durante el desarrollo. En la porción más anterior de la notocorda se expresan los genes Six3/6, FoxA2 (Figura R9, B y F, respectivamente), el último extiende su patrón de expresión a la parte más rostral desde el inicio de la ontogenia de la notocorda (Figura R9, A), mientras que la expresión de los genes IrxB, Hh (Figura R9, C-E) se limita a la porción más caudal, desde estadios tempranos.

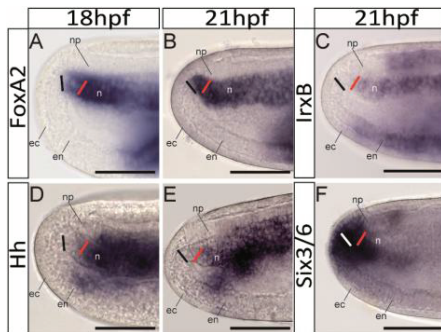


Figura R9. Varios marcadores de la notocorda evidencian su regionalización durante el desarrollo de ésta. Las líneas blanca y roja demarcan los subdominios definidos en la notocorda por la expresión diferencial de marcadores. np, placa neural; ec, ectodermo; en, endodermo; n, notocorda; hpf, horas post fertilización.

Regionalización temprana de la placa neural

Como se había descrito previamente, la regionalización en la placa neural del anfióxico se hace evidente muy temprano en el desarrollo (véase Figura R10 A-F y A'- F'). La mayoría de los marcadores que en estadios más avanzados tienen un patrón más restringido, en este estadio temprano de la neurulación se expresan más extensamente en ésta, como es el caso de Hh, FoxA2, Lhx1/5, MnxA, Sim y FoxB (Figura R10, J- P, J'-P' y T). Aunque no podemos determinar la regionalización en toda su profundidad a este estadio, si se puede observar con la combinatoria de ciertos marcadores como Hh, Nkx2.1, Lhx1/5, Nk6, MnxA, (Figura R10, J-M, P, J'-M' y P') el carácter basal de cierta extensión de la placa, por lo que se puede inferir cierto grado de organización dorsoventral desde estadios tempranos del desarrollo. De la misma forma que ocurre en el eje anteroposterior al observar los patrones no solapantes de Fez-Gbx y Six3/6-Gbx (Figura R10, B, B',D, D', E, E' y F, F'), por ejemplo, que sugieren el establecimiento de las principales subdivisiones ya en este estadio.

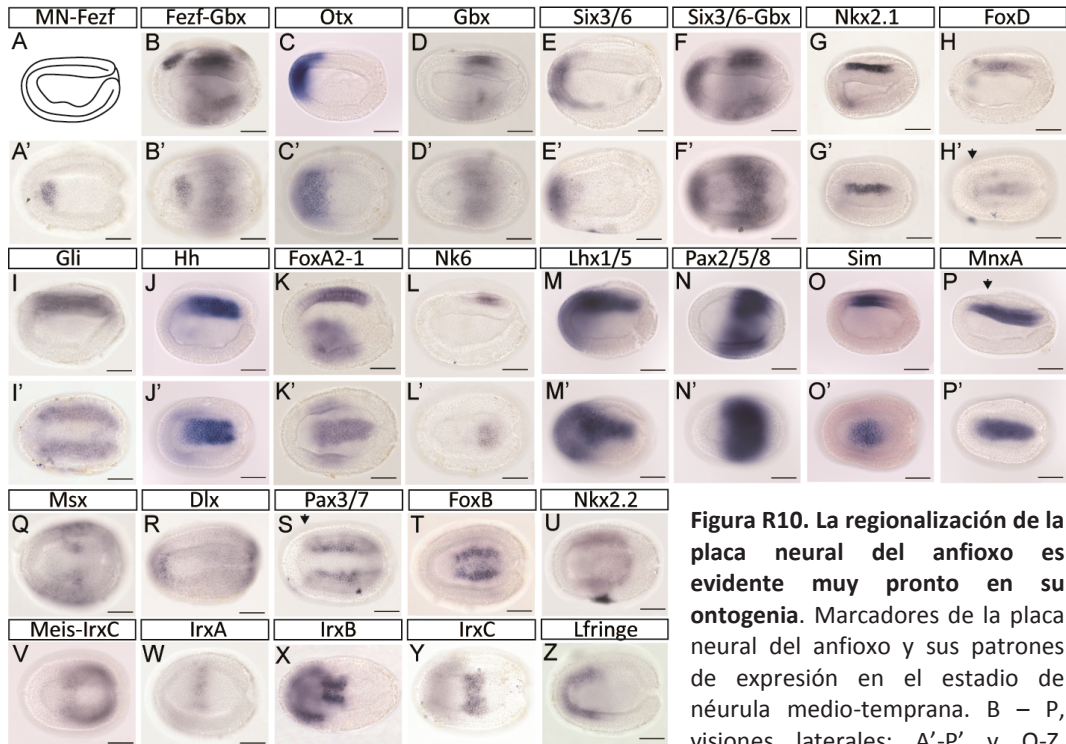


Figura R10. La regionalización de la placa neural del anfiexo es evidente muy pronto en su ontogenia. Marcadores de la placa neural del anfiexo y sus patrones de expresión en el estadio de néurula medio-temprana. B – P, visiones laterales; A'–P' y Q–Z, visiones dorsales; A, representación esquemática de una néurulas de 15hpf, para comparación.

Resultados

Otros marcadores neurales y no neurales

Otros marcadores seleccionados por el rol de sus parálogos involucrados directamente en el desarrollo o establecimiento del sistema nervioso de vertebrados, en anfiexo han demostrado tener patrones de expresión que podrían correlacionar con ese rol como SoxB2, Gli, PCBP, Snail, Zic (Figura R11, A-E, A'- E' y A''- E''). Otros, por el contrario no parecen expresarse en la placa neural de anfiexo en ese estadio como Dach, Gata1/2/3, Wnt3, Wnt8 y Dlx (Figura R11, F- J y F'- J')

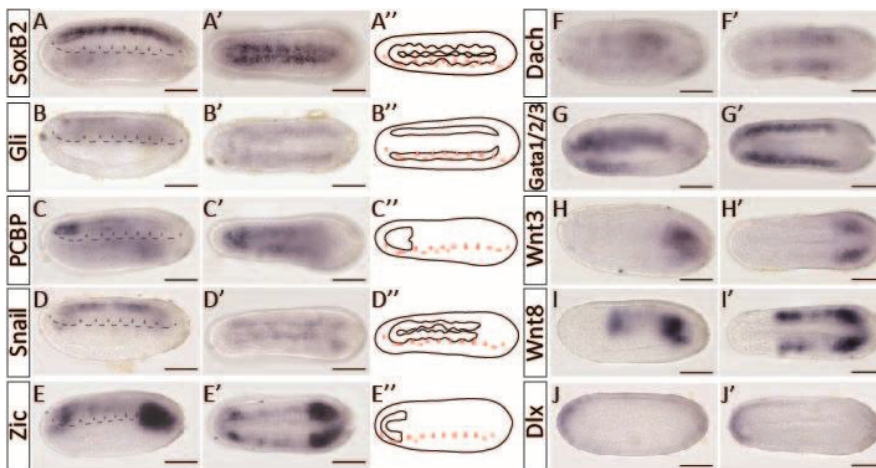


Figura R11. Otros marcadores de anfiexo con expresión neural A- E, A'- E' y A''- E''. Otros marcadores no neurales en anfiexo F- J y F'- J'. A-J, visiones laterales; A' - J', visiones dorsales; A''-E'', representaciones gráficas del componente neural de su respectivo patrón de expresión, para comparación.

Estudio funcional en vertebrados

Como se ha comentado con anterioridad, la regionalización del sistema nervioso en vertebrados es más conocida y los estudios funcionales en pez cebra y en ratón son comunes y relativamente accesibles.

En un estudio realizado por Hirata y colaboradores (Hirata et al., 2006) observan que al invalidar el efecto del organizador intratálámico (zli) (Figura R12, A' y B') el dominio de expresión de Pax6 se extiende rostralmente desde el pretrecho hasta lindar con el dominio natural de expresión anterior en el pretálamo (Figura R12, A, B).

Por otra parte, al invalidar el efecto del organizador ístmico (IsO) mediante el desarrollo de un *knockout* de *fgf8* condicional para engrailed (Figura R12, D y D') hemos podido observar que el territorio mesencefálico varía en identidad. Pax6 y Otx, marcadores típicamente pretectal expande su territorio de expresión hasta lindar con el rombencéfalo. (Figura R12, C, C', D, D').

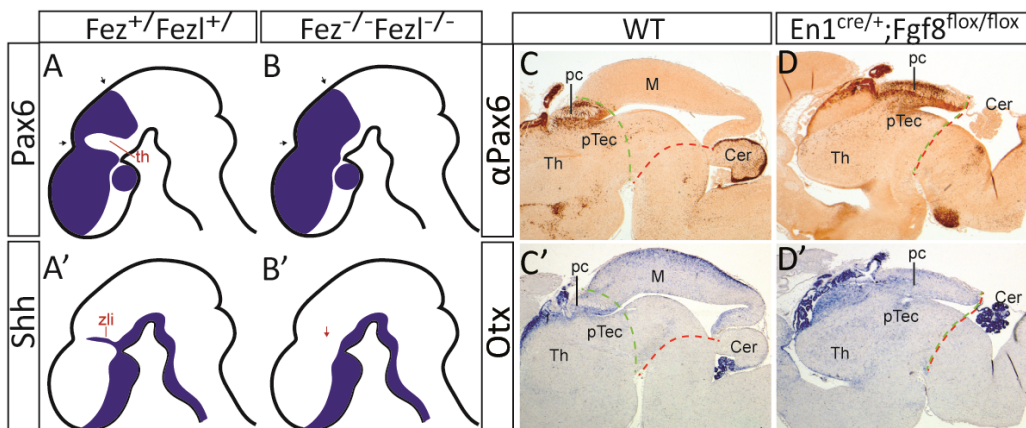


Figura R12, Efecto de la pérdida de función de los organizadores secundarios en *Mus musculus*. A,A',B,B', reproducción esquemática de los resultados publicados por (Hirata et al., 2006); experimento de pérdida de función de la Zli. C,C',D y D', experimento de pérdida de función del IsO, knockdown de *fgf8* condicional para engrailed. Zli, Zona limitans intratálámica; Th, tálamo; pTec, pretecho; pc, comisura posterior; Cer, cerebelo; M; mesencéfalo.

Resultados

Además hemos generado, por primera vez un cuádruple *knockdown* transitorio para inactivar el efecto de los organizadores secundarios en *Danio rerio*. En la Figura R13 se puede apreciar cómo la manipulación mediante morfolinós de la Zli y el IsO producen cambios en los territorios ya definidos por la genoarquitectura intrínseca de ellos. Al inyectar los morfolinós de los genes *eng2,eng3, otx1l* y *otx2* en un cóctel obtenemos un cuádruple morfolino (4MO) donde tanto la Zli (ver Figura R13, Shha en wt y 4MO, D y D', respectivamente) como el IsO (ver Figura R13, Wnt1 en wt y 4MO, E y E', respectivamente) no surten sus efectos especificadores y los *knockdown* transitorios presentan defectos en la especificación del sistema nervioso central.

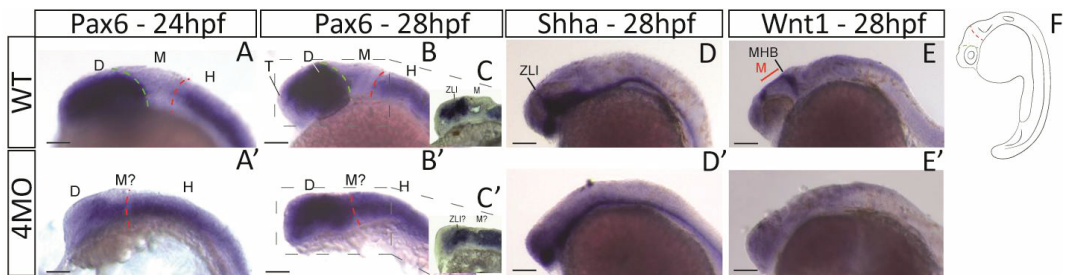


Figura R13. Efecto de la pérdida de función de los organizadores secundarios en *Danio rerio*. A, A', B, B', D y D', son insitus whole mount de los marcadores indicados y C y C' son secciones de B y B' respectivamente. Zli, Zona limitans intratalámica; Th, tálamo; pTec, pretecho; pc, comisura posterior; Cer, cerebelo; M; mesencéfalo; MHB, límite mesencéfalo-romebencefálico. Anterior a la izquierda. Barras de escala 100 μ m.

Otros marcadores que muestran defectos en la especificación del mesencéfalo y el límite mesencéfalo-rombencefálico (MHB) son *Gbx2*, *Meis2b*, *Pax7* y *Pax3a* (Figura R14, B – F, patrones de expresión respectivos en embriones wt; B' – F', patrones de expresión respectivos en embriones 4MO)

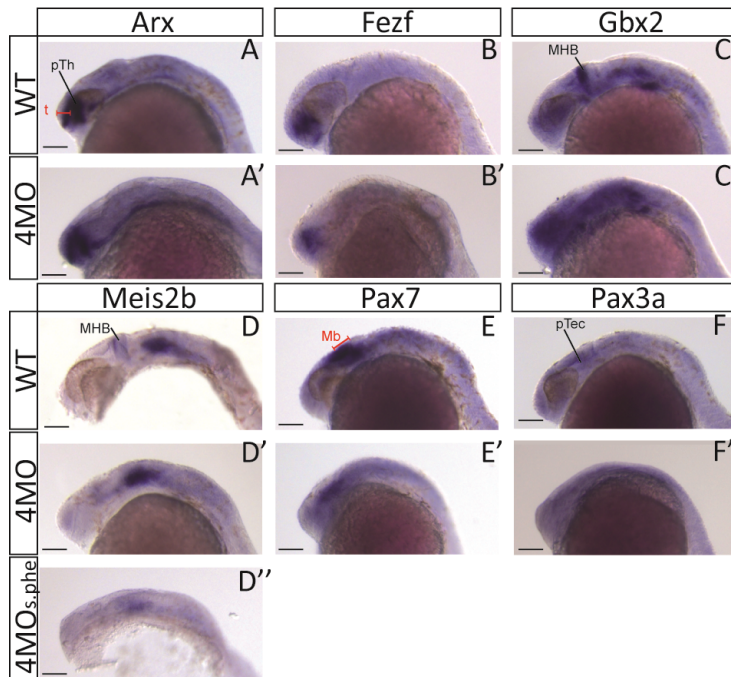


Figura R14. Efecto de la pérdida de función de los organizadores secundarios en *Danio rerio*: otros marcadores. A, A', B, B', C, C', D y D', son insitus whole mount de los marcadores indicados. Zli, Zona limitans intratalámica; pTh, pretálamo; Th, tálamo; pTec, pretecho; pc, comisura posterior; Cer, cerebelo; M; mesencéfalo; MHB, límite mesencéfalo-romebencefálico; sphe, fenotipo severo. Anterior a la izquierda. Barras de escala 100µm.

Resultados

Bibliografía

Hirata, T., Nakazawa, M., Muraoka, O., Nakayama, R., Suda, Y., & Hibi, M. (2006). Zinc-finger genes Fez and Fez-like function in the establishment of diencephalon subdivisions. *Development (Cambridge, England)*, *133*(20), 3993–4004. doi:10.1242/dev.02585

Discusión

La EvoDevo es una disciplina que intenta desvelar cómo los procesos y mecanismos que se dan durante el desarrollo embrionario se modifican durante la evolución y cómo a partir de esos cambios la biodiversidad pasada y presente aparece. En concreto, en el estudio del origen y la evolución de los sistemas nerviosos, la genoarquitectura constituye una aproximación altamente resolutive.

El análisis de la genoarquitectura neural de los cefalocordados hace evidente que los estudios comparativos detallados son necesarios para entender cómo surgieron y cómo se organizan los caracteres complejos que encontramos en la actualidad, como el sistema nervioso de vertebrados. Además, el estudio genoarquitectónico de la placa neural del anfiexo nos permite describir el modelo general de subdivisiones que se dan naturalmente gracias a los patrones de expresión que se inscriben dentro de cada localización y definir por tanto sus barreras naturales.

La placa neural del anfiexo y su genoarquitectura

En este estudio se han analizado cerca de cincuenta ortólogos de genes relacionados con el establecimiento y el patroneo neural en vertebrados en la placa neural abierta del anfiexo en desarrollo. En el anexo A1 se facilita una esquematización de los patrones de expresión que

se inscriben en cada subunidad identificada.

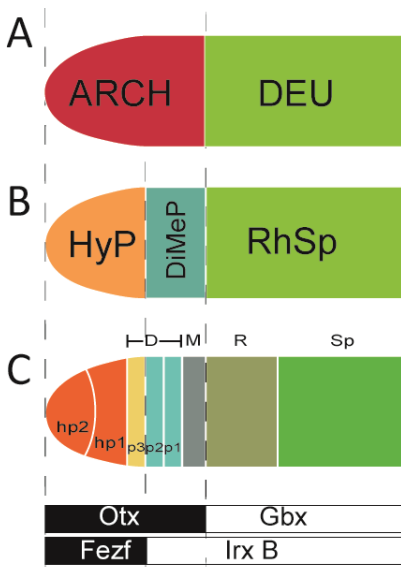


Figura D1. Esquema de las subdivisiones principales de la placa neural de vertebrados (C) y cefalocordados (B) que están molecularmente conservadas entre los mismos. ARCH, arquencéfalo; DEU, deuteroencéfalo; HyP, primordio del Hipotálamo; DiMeP, primordio del DiMesencéfalo; RhSp, primordio del romboencéfalo; hp2, hipotálamo rostral; hp1, hipotálamo caudal; p3, pretálamo; p2, tálamo; p1, pretecho; D, diencéfalo; M, mesencéfalo; R, rombencéfalo; Sp, cordón espinal.

Discusión

La nomenclatura que se ha seleccionado para las particiones identificadas hace referencia a las equivalencias topológicas que se correlacionan de este estudio con la regionalización del sistema nervioso de vertebrados. Como ya se ha mencionado en la introducción, las grandes particiones conservadas entre cefalocordados y vertebrados enmarcan las dos grandes límites, *Otx/Gbx* y *Fezf/Irx* (ver Figura I12 y Figura I13 en el capítulo de introducción). Por tanto, inicialmente se inscriben tres subdivisiones principales conservadas (Figura D1). Por ello, la partición más rostral la denominamos primordio hipotalámico o HyP, la intermedia, primordio dimesencefálico o DiMeP y, caudalmente encontramos el primordio romboespinal o RhSp (Figura D1).

Concordante con el modelo prosomérico descrito para vertebrados, y debido a que el establecimiento del neuroectodermo, elongación y neurulación de éste se produce de forma muy similar a la de vertebrados, en cefalocordados, cada subunidad consta también de todo el complemento dorsoventral. Se pueden identificar, de medial a lateral, el suelo de la placa, el compartimento basal y el alar. Y todos ellos, exceptuando el DiMeP, están regionalizados anteroposteriormente.

En el HyP se pueden identificar tres subunidades que denominaremos: HyP rostral, intermedio y caudal (Figura R2). Además, en el RhSp es posible distinguir al menos 5 subunidades en el eje anteroposterior, que están asociadas a límites intersomíticos (Figuras R5 y R6)

El suelo de la placa está caracterizado por ser un territorio *Nkx2.1*-positivo en toda su extensión, pero otros factores de transcripción se expresan en fracciones del suelo de la placa como *Gsc*, o *Hh* que demarca su territorio de expresión en el suelo de la placa pero no llega a su extremo más rostral, sino que se queda en la frontera entre el HyP y el DiMeP (Figura R7).

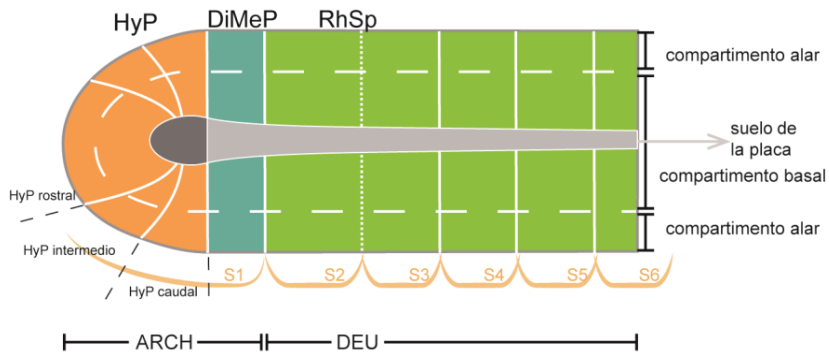


Figura D2. Esquema resumen de las subdivisiones encontradas en la placa neural del anfibio en desarrollo. ARCH, arquencéfalo; DEU, deuteroencéfalo; HyP, primordio del Hipotálamo; DiMeP, primordio del DiMesencéfalo; RhSp, primordio del romboencéfalo.

En resumen, la placa neural del anfibio se subdivide en tres grandes regiones. El HyP está demarcado por la expresión de *Fzef*; el DiMeP, por la de *Pax6* y caudalmente *Gbx* se expresa en el RhSp.

Además, la combinatoria de otros marcadores nos permite definir las tres subdivisiones internas en el HyP que rostro caudalmente son *Six3/6*-positiva, *Nk2.2*-positiva y *Rx*-positiva, en patrones de expresión anidados. Además, *Six3/6* y *Lhx2/9* definen el componente alar del HyP y complementariamente, *Lhx1/5*, *FoxD*, *Lef* y *Meis* definen el componente basal de esta región.

En el DiMeP se expresa selectivamente *Pax6*, y *Sim* en el componente basal y suelo, pero también lo hace *Six3/6* y *Pou3f* de forma no restrictiva.

El RhSp se caracteriza por la expresión anidada de los genes *Hox* y además de varios marcadores con patrones de expresión iterativos y segmentales, que definen al menos cinco subunidades internas expresándose tanto en su componente alar, como *Pax3/7*, *Nova* y *Pax2/5/8*, como basal, como *Pou4f*. Los genes *Wnt3* y *7* demarcan todo el territorio del RhSp de la misma forma que lo hace *Gbx*.

Aplicación del modelo en placa neural para la identificación de derivados del tubo neural del anfibio adulto: correspondencias ontogenéticas

El sistema nervioso del anfibio adulto es relativamente simple, aunque la falta de datos de linaje para la formación de derivados neurales dificulta las extrapolaciones para poblaciones neurales concretas que se encuentran en individuos adultos desde etapas tempranas en el desarrollo. Además, como se ha comentado en la introducción, el tubo neural adulto del anfibio no presenta relevancias anatómicas macroscópicas, es por ello que para facilitar las extrapolaciones de poblaciones progenitoras a sus derivados, en la literatura se usan como referencias internas las medidas de los miómeros, y en etapas tempranas del desarrollo, los somitos. Desafortunadamente, no se ha demostrado que la posición y tamaño de los miómeros sea fija y permanente en relación al tubo neural. Además, los miómeros se expanden dorsoventralmente y anteroposteriormente durante su desarrollo y adquieren su forma de V característica, incrementando además la zona de solapamiento entre ellos. También es influyente la asimetría que presentan los somitos, que se inicia durante la neurulación, y que sufren los miómeros más tarde en el desarrollo (Wicht and Lacalli, 2005). A pesar de todo ello, no se conoce con exactitud si la histogénesis del tubo neural acompaña la de los miómeros, aunque la estructura general del la vesícula cerebral experimenta pocos cambios durante la metamorfosis (Lacalli, 2002), y concordantemente, por lo que respecta a la inervación, es evidente que va acorde a la asimetría miomérica, como indican las raíces de los nervios en el tubo neural del anfibio adulto, posicionadas en los mioseptos, y éstas sí nos sirven de relevancias morfológicas macroscópicas con el fin de identificar posicionalmente los derivados neurales en el adulto.

Las extrapolaciones sobre la correspondencia de los derivados neurales del sistema nervioso del anfibio adulto respecto a sus territorios progenitores en el estadio de placa provienen de comparaciones minuciosas que incluyen informativamente tanto su posición topológica como la combinatoria de patrones de expresión durante la ontogenia neural, siempre teniendo en cuenta que algunos de ellos son dinámicos y que aisladamente no proveen de profundidad informativa de linaje, ya que, en última instancia, no podemos analizar si

ocurren procesos de migración de las poblaciones progenitoras para formar los derivados terminales que identificamos en el tubo neural del anfióxico adulto.

Derivados del HyP: El ojo frontal

Una de las relevancias morfológicas claramente identificables en el anfióxico, desde etapas larvarias tempranas, es el ojo frontal. No sólo es relevante debido a la presencia de la copa pigmentada en la parte más anterior sino por todo el sistema celular que lo acompaña. La posición topológica del ojo frontal sugiere que se desarrolla de la parte más rostral de la placa neural (Lacalli, 1996). La genoarquitectura de esta zona de la placa neural reafirma la sugerencia de que debe estar involucrada con el desarrollo de esta estructura fotorreceptora debido a que expresa genes implicados en desarrollo de ojo en gran número de bilaterios, como *rx*, *six3/6* y *lhx2/9* (Kamijyo et al., 2015; Zuber et al., 2003) desde muy temprano en el desarrollo, aunque el ojo frontal se desarrolla en estadios más tardíos, cuando empiezan a hacerse evidentes la presencia de células con dendritas y cilios que salen por el neuroporo y por la presencia de la copa pigmentaria. En estadios larvarios, cuando el ojo frontal ya es identificable, se mantiene una genoarquitectura característica de la identidad de ojo en los tipos celulares resultantes (Vopalensky et al., 2012). Por posición topológica este ojo frontal es homólogo a la retina de vertebrados. Esta última es una evaginación o prolongación del sistema nervioso central cuyo territorio presuntivo puede ser identificado en estadios tempranos de desarrollo en la placa neural de vertebrados (Sánchez-Arrones et al., 2009). Tanto en anfióxico como en vertebrados, es un derivado alar de la porción más rostral de la placa neural. En vertebrados el territorio destinado al desarrollo del ojo se separa en dos porciones por la acción de las señales emanadas desde el mesodermo precordial (Zuber et al., 2003).

Además, el ojo frontal inerva vía el neuropilo mediante neuronas serotoninérgicas (Vopalensky et al., 2012). El neuropilo se desarrolla justo caudalmente al órgano infundibular que marca la transición entre la vesícula anterior y la región posterior de la vesícula cerebral y proyecta al centro primario motor (CPM) situado caudalmente a éste, en la región inmediatamente

Discusión

posterior al límite entre el primer y segundo miómeros. Toda esa región expresa pax6 en estadios larvarios avanzados (Suzuki et al., 2014), y es topológicamente correspondiente a la zona del DiMeP, pax6-positiva, en la placa neural.

Derivados del DiMeP

Continuando hacia regiones más posteriores, aún a la altura del primer miómero, es relevante la presencia del órgano infundibular que varios autores marcan como el final de la vesícula cerebral tanto en el adulto como en etapas larvarias (Castro et al., 2015; Ekhardt et al., 2003; Lacalli and Kelly, 2000). El órgano infundibular se posiciona ventralmente al límite rostral del cuerpo lamelar, que es dorsal, y que ontogenéticamente corresponde a la subunidad central o DiMeP, debido a su genoarquitectura y topología. La expresión de Pax6 durante el desarrollo sugiere que el cuerpo lamelar se desarrolla y diferencia en estadios larvarios desde el territorio pax6-positivo en toda su extensión (Gardon et al., 1998) y, por tanto, en el compartimento basal el órgano infundibular en el límite anterior del DiMeP, y el neuropilo inmediatamente posterior a éste. El cuerpo lamelar se extiende hasta el límite entre los somitos s1/s2 en estadios larvarios tardíos, extensión que coincide con el territorio Otx-positivo (Wicht and Lacalli, 2005).

Derivados del RhSp

Consecutivamente con el límite intermiométrico m1/m2 se identifica el CPM que es una zona integrativa mecanosensorial con alta confluencia de sinapsis debido a la presencia de interneuronas y motoneuronas. En la barrera que forman los dos primeros miómeros no existe ninguna barrera anatómica identificable para el tubo neural pero si existe un cambio esencial en el tipo neuronal y su comportamiento sináptico. Las neuronas anteriores al CMP, en general son neuronas de transmisión lenta debido a las pocas o nulas sinapsis que contactan sus neuritas basales e irregulares. En cambio, las neuronas del CMP se caracterizan por tener abundantes estructuras dendríticas definidas y sinapsis profusas (Wicht and Lacalli, 2005). Esta barrera citoarquitectónica se corresponde con la

genoarquitectura del territorio ya que es coincidente con el límite Otx/Gbx, o frontera DiMeP/RhSp.

Implicaciones para los derivados neurales en vertebrados: Buscando el plan corporal de cordados.

El ojo frontal y órganos fotoreceptores

El ojo frontal del anfiexo parece estar implicado en fotorecepción y no en formación de imagen. Debido al tipo de fotoreceptores, su topología y que expresa Pax6 se ha considerado homólogo a los ojos pareados de vertebrados (Lacalli, 2004).

En concordancia, el ojo frontal del anfiexo recapitula la expresión de muchos de los genes ortólogos implicados en la red de especificación del campo de ojo en vertebrados, como Rx, Lhx2/9, Six3/6, como se ha analizado en el apartado anterior, y también es coincidente su topología, ya que se especifica en la parte más anterior de la placa neural, tanto anfiexo como en vertebrados (Zuber et al., 2003). Además, ampliando la identidad molecular coincidente entre cefalocordados y vertebrados, Gi y c-opsina se expresan en los fotoreceptores y Mitf y pax2/5/8 en células pigmentarias (Vopalensky et al., 2012).

Además, tanto el ojo frontal del anfiexo como los ojos laterales de la lamprea larvaria proyectan en un centro visual fotoreceptor, otx- y pax6-positivo, situado en el prosencéfalo caudal de lampreas y la parte más posterior de la vesícula cerebral de anfiexo (Suzuki et al., 2014) que topológicamente corresponde al DiMeP en estadio de placa. En este trabajo, Suzuki y colaboradores proponen que las proyecciones ópticas mesencefálicas (retinotectales, pax6-negativo y otx-positivo) son secundarias, y por tanto, propias de vertebrados y implicadas en la visión con formación de imagen. Por tanto, las proyecciones primarias, retino-pretectales, que se dan primero en estadios larvarios en lamprea, serían las más parecidas al estado ancestral de vertebrados proyectando al principal centro visual, pax6-positivo, de la misma forma que ocurre en el DiMeP de anfiexo.

Discusión

Lacalli y colaboradores (Lacalli, 1996) identificaron el centro visual rastreando la inervación mediante microscopía electrónica y lo denominaron *tectum* como un homólogo del mesencéfalo de vertebrados. En contraposición, el ortólogo Dmbx del marcador específico de mesencéfalo en vertebrados no se expresa en el tubo neural del anfióxico, por lo que otros autores propusieron que el homólogo del territorio mesencefálico no existía en cefalocordados (Takahashi and Holland, 2004).

Los resultados presentados en esta tesis y los análisis previamente mencionados apuntan a que el centro visual fotoreceptor en anfióxico, anteriormente denominado *tectum*, es un derivado de la subunidad DiMeP en estadio de placa (que es *pax6*-positivo). Esta zona comparte características propias del diencefalo (concretamente de *p1* y *p2*) y del mesencéfalo de vertebrados, y se sitúa topológicamente en posiciones equivalentes entre vertebrados y cefalocordados.

Estos resultados sugieren que el mesencéfalo de vertebrados podría tener un origen evolutivo compartido con el pretecho y el tálamo, la región comprendida entre los organizadores secundarios, que está conservada topológica y molecularmente con cefalocordados. Esta región ancestral sería similar al DiMeP del anfióxico, un centro visual *pax6*-positivo, de la misma forma que ocurre en los estadios larvarios de lamprea. El tálamo-pretecho-mesencéfalo o DiMeP-like ancestral, al regionalizarse y desarrollarse el mesencéfalo como entidad propia en vertebrados, se subespecializaría como unidad visual del complejo, permitiendo el desarrollo de la visión con formación de imagen.

Órgano de balance/reloj circadiano

La topología, y morfología de las células asociadas al reloj circadiano u órgano de balance del anfióxico adulto, embebidas en la comisura ventral y asociadas al cuerpo lamelar, que es, aparte del ojo frontal, un órgano fotoreceptor; y su inmunoreactividad GABA parece llevar a varios autores a proponer la homología de éste con el núcleo supraquiasmático de mamíferos (Anadón et al., 1998; Castro et al., 2015). También, el órgano de balance del anfióxico larvario expresa genes ortólogos a los relacionados con ritmicidad circadiana en

vertebrados (Schomerus et al., 2008; Wicht et al., 2010). En vertebrados, el núcleo supraquiasmático es un derivado del territorio hipotalámico más rostral y alar (Puelles and Rubenstein, 2015) que es Nkx2.2-positivo. Además Lim1 en vertebrados tiene un rol en el establecimiento y mantenimiento del ritmo circadiano en el núcleo supraquiasmático (Hatori 2014). En este estudio, hemos observado que es concordante también con la genoarquitectura de la parte más rostral de la placa neural en desarrollo del anfibio donde se expresa Nk2.2 (Figura R2) además, en su componente basal se expresa Lhx1/5 (proortólogo de lim1 en vertebrados) reafirmando la sugestiva similitud entre las funciones del núcleo supraquiasmático de vertebrados y el órgano de balance en cefalocordados. Debido a que el órgano supraquiasmático de vertebrados se desarrolla en el territorio alar del hipotálamo, a diferencia del órgano de balance del anfibio que surge del territorio esencialmente basal del HyP, la función de balance de ambos sí parece tener un origen conservado y común en territorios hipotalámicos, pero la homología de los dos derivados no es directa.

El DiMeP y sus derivados: el órgano infundibular

Como se ha comentado en el apartado de correspondencias ontogenéticas, el límite anterior de la subunidad DiMeP se caracteriza por la presencia del órgano infundibular, que se trata de un núcleo que secreta fibra de Reissner al canal central del tubo neural (López-Avalos et al., 1997; Olsson et al., 1994). Ésta, fluye caudalmente y es fagocitada en la ámpula terminal, en el extremo más posterior del tubo neural (Olsson, 1955). No se conoce la función que hace ésta sustancia en anfibio ni en vertebrados, aunque parece estar implicada en la guía de axones y establecimiento de comisuras (Lehmann and Naumann, 2005) coherentemente, tanto el órgano infundibular de anfibio como el subcomisural y flexural de vertebrados se desarrollan en zonas que posteriormente albergaran una comisura (vertebrados) o neuropilo (anfibio) (López-Avalos et al., 1997). El órgano subcomisural, situado en la línea media dorsal del diencefalo caudal, es el principal productor de fibra de reissner en vertebrados, y por ello algunos autores proponen equivalencias con el órgano infundibular de anfibio (Olsson, 1955). Por otra parte, el órgano flexural, está situado en el suelo más rostral, a la altura del

Discusión

diencéfalo, también secreta la fibra de Reissner pero lo hace de forma transitoria a diferencia del carácter secretor permanente del órgano subcomisural (Lichtenfeld et al., 1999). Por su topología, el órgano flexural de vertebrados parece ser el candidato a homólogo con el órgano infundibular de anfibio.

El DiMeP y sus derivados: el cuerpo lamelar

Se ha propuesto profusamente en la literatura la homología entre el cuerpo lamelar del anfibio y la glándula pineal de vertebrados. Ambos se desarrollan desde un territorio progenitor pax6-positivo pero esa parece ser la única correspondencia. El cuerpo lamelar de anfibio sí es un órgano fotoreceptor pero el territorio progenitor del que se desarrolla, el DiMeP, es Rx-negativa y el derivado nunca expresa el gen que parece altamente implicado en el desarrollo de la glándula pineal de vertebrados (Rath et al., 2013; Ruiz and Anadn, 1991; Vopalensky et al., 2012). Además, el cuerpo lamelar no es inmunoreactivo a melatonina y no produce su enzima de síntesis (Falcón et al., 2014; Vernadakis et al., 1998). Finalmente, cabe destacar que se ha descrito la existencia y expresión de genes relacionados con ciclos circadianos en vertebrados para anfibio pero ellos se expresan en el órgano de balance (Schomerus et al., 2008). En conjunto, aunque la topología sugiere que la glándula pineal y el cuerpo lamelar pueden ser homólogos, no existen datos suficientes que apunten a ello.

El RhSp: el final de la vesícula cerebral

Las células de Müller y los fascículos longitudinales mediales, en lamprea y mixinos respectivamente, pertenecen a la parte anterior de sus sistemas reticuloespinales respectivos, centros rombencefálicos, y están implicadas en movimientos natatorios y de escapada, es por ello que varios autores proponen cierta equivalencia con el CPM de anfibio aunque con discrepancias en su topología (Anadón et al., 1998; Lacalli, 1996).

La transición entre los territorios correspondientes a la vesícula cerebral y el cordón espinal no es muy evidente, aunque su citoarquitectura y genoarquitectura denotan ese cambio,

como se ha comentado con anterioridad. El CPM se sitúa inmediatamente posterior a la barrera citoarquitectónica (distintos tipos celulares) y genoarquitectónica (límite *Otx/Gbx*) claramente definidas. Además el carácter integrativo y esencialmente locomotor del centro, sugiere una identidad más parecida a la de las neuronas rombencefálicas de vertebrados por lo que el CPM marca el inicio del RhSp, el final de la vesícula cerebral, lo que constituye en vertebrados el límite meso-rombencefálico.

Así, al analizar los más relevantes derivados del sistema neural del anfiexo y encontrar su correspondencia topológica y funcional con derivados neurales en vertebrados y comparando su origen ontogenético desde territorios genoarquitectónicos equivalentes podemos describir el bauplan para el sistema neural de los cordados (Figura D3).

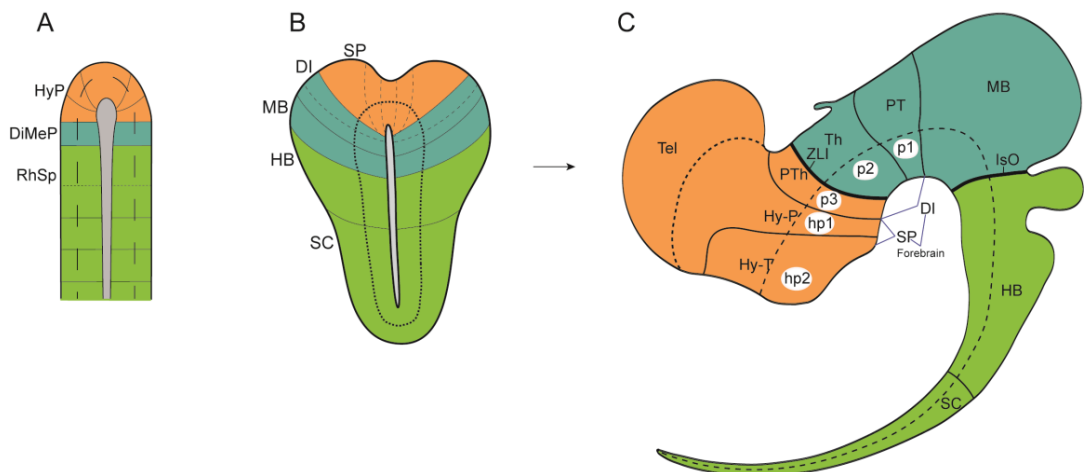


Figura D3. Esquemas de los modelos de organización neural de cefalocordados y vertebrados. Placa neural del anfiexo (A) y de vertebrados (B). Correlación de estructuras y derivados terminales del sistema nervioso adulto de vertebrados (C) según su origen ontogenético.

Bauplan neural de cordados: testando el modelo

En el modelo propuesto, y en una perspectiva más amplia, las subdivisiones moleculares conservadas corresponden en vertebrados a las barreras naturales donde aparecen los organizadores secundarios (Figuras D1 y D3). Al estudiar y comparar la regionalización temprana del sistema nervioso del anfibio con el de los vertebrados se puede comprobar que el modelo general de patroneo se puede extender más allá del clado de vertebrados. En cefalocordados, aunque se ha propuesto la existencia de regiones topológicas homólogas a las de los organizadores secundarios de vertebrados, (Castro et al., 2006; Irimia et al., 2010), no existe la presencia de los morfógenos análogos en esas barreras morfogenéticas (Bertrand et al., 2011; Holland, 2000; Shimeld, 2008, 1999; Takahashi and Holland, 2004).

Sugestivamente, Hirata y colaboradores (Hirata et al., 2006) al generar un ratón transgénico deficiente para los genes *Fezf1* y *Fezf2*, implicados en el posicionamiento correcto de la *zli*, y patroneo rostrocaudal del diencefalo, observan que ambos genes tienen un rol redundante en reprimir el fenotipo de diencefalo caudal, o pretectal, en el prospectivo pretálamo y tálamo, subunidades más rostrales del diencefalo, respectivamente. En el esquema representativo de este experimento (Figura R12, A, A', B y B') se observa, por ejemplo, que el patrón del marcador *pax6*, que en este estadio está excluido del tálamo y es marcador típicamente pretectal en vertebrados, se expande anteriormente al desaparecer el efecto especificador de la *Zli*. Por tanto, el territorio prospectivamente pretectal se expande con la falta del efecto del organizador intratálamico.

Además, en este trabajo hemos realizado el experimento equivalente para el organizador ístmico y hemos podido comprobar un efecto similar. En el transgénico *knockout* de *fgf8* condicional para *engrailed*, abolimos el efecto del organizador ístmico resultando en una expansión caudal del territorio pretectal, apreciándose por los patrones de expresión de *Pax6* y *Otx* (Figura R12, C, C', D y D' y Figura D4). De forma similar, en el doble *knockout* para *pax2* y *pax5* en ratón también se caudaliza el territorio de *pax6* y la comisura posterior aparece más cercana al límite anterior rombencéfálico (Urbánek et al., 1997).

Para confirmar el efecto completo de inhibición de la función de ambos organizadores, desarrollamos un cuádruple *knockdown* mediante morfolinós (4MO's) en pez cebra. Para inhibir la acción de la zli diseñamos MO's contra Otx1l y Otx2 (Scholpp et al., 2007), y para el Iso, diseñamos MO's contra Eng2 y Eng3 (Scholpp and Brand, 2001) que coinyectamos para inhibir la función de ambos organizadores simultáneamente. En las Figuras R13, R14 y D4 se muestra que la pérdida de ambos organizadores resulta en la continuidad del patrón de expresión de pax6, y el cambio de patrón de expresión de otros marcadores, indicando que el territorio que está delimitado por ambos cambia a una identidad más parecida a la pretectal, expresando ubicuamente, el marcador pax6, de forma similar al estado natural del DiMeP de anfióxico.

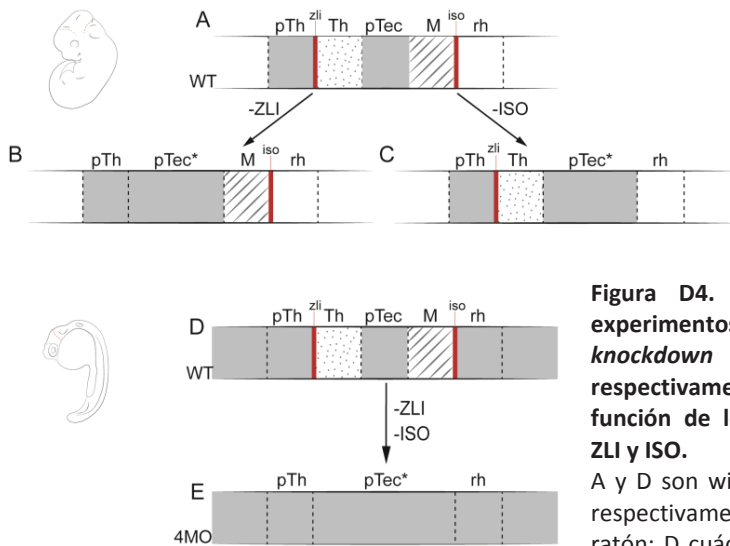


Figura D4. Esquemas resumen de los experimentos con transgénicos y *knockdown* en ratón y pez cebra respectivamente, dirigidos a inhibir la función de los organizadores secundarios, ZLI y ISO.

A y D son wild types de ratón y pez cebra, respectivamente; B y C, transgénicos de ratón; D cuádruple morfolino de pez cebra.

pTh, pretálamo; Th, tálamo; pTec, pretecho; M, mesencéfalo; rh, rombencéfalo; ZLI, *Zona limitans intrathalamica*; Iso, organizador ístmico; pTec*, expansión de la identidad pretectal en la región topológica correspondiente al tálamo o mesencéfalo.

La correspondencia topológica de este territorio, que se encuentra bordeado por los organizadores secundarios en vertebrados, con el DiMeP de anfióxico y estos experimentos de función, sugieren que el tálamo, el pretecho y el mesencéfalo, deben compartir un origen evolutivo común.

Discusión

Por tanto, el bauplan neural de cordados comprende las unidades básicas de construcción de un cerebro tan complejo como el de vertebrados, pero también para el sencillo, o simplificado, sistema nervioso de los cefalocordados.

El modelo de cordados y la actualización del modelo de vertebrados.

Estos resultados llevan a revisar el modelo de comprensión habitual que tenemos para el sistema nervioso de vertebrados. Las comparaciones entre vertebrados han conducido el conocimiento sobre la neuroanatomía de vertebrados hasta encontrar homologías para casi cada núcleo del sistema nervioso de vertebrados. El modelo prosomérico (Puelles, 2001) se ha introducido con el fin (en parte) de romper los moldes preestablecidos de conocimiento clásico. En ese sentido, la aplicación de esta metodología de estudio contribuye a la expansión de la neuroanatomía comparada fuera de los límites del grupo de los vertebrados. De esta manera, las equiparaciones entre *bauplan* comparables como los de anfibio y vertebrados nos ha llevado a describir un modelo que no sólo evidencia la existencia de éste *per se*, sino que pone de manifiesto, por primera vez, las relaciones filogenéticas y ontogenéticas de los sistemas nerviosos de cefalocordados y vertebrados.

Además, la comparativa entre ambas neuroanatomías pone de manifiesto que las relaciones entre las subunidades clásicamente descritas en vertebrados no tienen sentido si lo analizamos desde una perspectiva evolutiva. El diencefalo, comprendiéndolo por la agrupación de pretálamo, tálamo y pretecho, no existe como unidad evolutiva es, en cambio, evidente y orgánica la relación que exhiben el tálamo, pretecho y el mesencefalo (Figuras D1 y D3).

Varios experimentos en vertebrados evidencian la relación que tienen el tálamo, el pretecho y el mesencefalo y las diferencias existentes con el pretálamo.

Los ratones mutantes homocigotos para Pax6 (*Sey/Sey*) carecen de pretecho y expanden los territorios del mesencefalo y el tálamo indicando que pax6 es clave en la identidad pretectal y que el territorio es competente para una identidad tanto mesencefálica como talámica

(Mastick et al., 1997). Los mutantes Sey/Sey recuperan la comisura posterior al inducir la expresión de pax6 (Schwarz et al., 1999).

Los injertos heterólogos (entre aves y entre aves y mamíferos) de tejido ístmico producen un cambio de identidad a mesencefálico en tálamo y pretecho, pero no en el pretálamo ni el el prosencéfalo secundario, que no son competentes para expresar En2, de la misma forma que ocurre por la acción ectópica de fgf8, morfógeno secretado por el IsO (Bally-Cuif et al., 1992; Bloch-Gallego et al., 1996; Crossley et al., 1996; Gardner and Barald, 1991; Martinez et al., 1999).

Por el contrario, la identidad pretalámica en pollo se instaura antes de que la Zli aparezca (Sánchez-Arrones et al., 2009) y además, al afectar la Zli en pez cebra, el tálamo siempre se ve afectado pero nunca el pretálamo, que en caso de sobre expresar Fezfl se expande (Hirata et al., 2006; Jeong et al., 2007).

En conjunto, estos experimentos evidencian la competencia del territorio tálamo-pretecal-mesencefálico para desarrollar cualquiera de estas regiones bajo las condiciones adecuadas, y que el pretálamo, en cambio, es una identidad distinta.

Los organizadores secundarios ejercen un rol especificador y son responsables de la regionalización diferencial de este territorio tálamo-pretecal-mesencefálico (Danielian and McMahon, 1996; Scholpp et al., 2007), que es muy evidente en el caso del gran sobrecrecimiento del mesencéfalo producido por la potente acción mitótica que ejerce el morfógeno Fgf8. Por ello, y según lo postulado en nuestro modelo, en ausencia de los organizadores, el territorio formado por el tálamo, pretecho y mesencéfalo se desarrollaría a partir de un territorio ancestral común, con una identidad única parecida a la pretecal, pax6-positivo, similar al DiMeP del anfiexo.

El origen de los organizadores secundarios. ¿Existe un Bauplan neural en bilaterios?

El origen y la evolución de los organizadores secundarios que especifican el tubo neural de vertebrados es un tema complejo de abordar.

En el caso de *Drosophila*, con un sistema nervioso centralizado, la barrera genética que determina la presencia de la Zli y el IsO, están conservadas con cordados aunque, de la misma forma que ocurre en anfibio, falta su funcionalidad como organizadores, ya que no existe expresión de morfógenos en esas barreras (Hirth et al., 2003; Irimia et al., 2010).

En cambio, en hemicordados, se han descrito programas que implementan los centros de señalización situados en barreras morfológicas y genéticas topológicamente equivalentes entre hemicordados y vertebrados, por lo que se han propuesto como “organizadores” en este invertebrado (Pani et al., 2012). Además la secuencia anteroposterior de subunidades con identidades moleculares entre vertebrados y hemicordados parece estar conservada, exceptuando los patrones de expresión de Fezf y Irx, colindantes y mutuamente excluyentes en vertebrados, y que además posicionan la Zli, en hemicordados muestran patrones de expresión divergentes. Según los autores, esta aproximación a “organizadores”, situados en bordes morfogenéticos conservados, al menos parcialmente, debe tener un rol en la demarcación del territorio ectoneural (Lowe et al., 2003; Pani et al., 2012), ya que su sistema nervioso es basiepitelial y se está regionalizando paralelamente en toda su extensión ectodérmica.

Entonces, en cualquiera de los escenarios, para el caso de hemicordados, el sistema nervioso desarrolla y se organiza de forma tan distinta al bauplan neural de vertebrados que las homologías directas entre sus estructuras se hacen, cuanto menos, complicadas.

En resumen, parece que las barreras morfogenéticas donde se definen en vertebrados los organizadores secundarios podrían estar conservadas desde el ancestro de los bilaterios, entonces se presentan al menos dos escenarios evolutivos:

El ancestro de los cordados poseía un sistema nervioso que se desarrollaba a partir de una placa neural regionalizada según las barreras morfogenéticas conservadas, de forma similar al anfioxo moderno, y los organizadores secundarios se desarrollarían en esas barreras como innovación propia de vertebrados. En este escenario, el caso de los hemicordados resultaría de una convergencia evolutiva al desarrollar unos “organizadores” similares a los de vertebrados por reclutamiento de redes génicas preexistentes.

Alternativamente, el ancestro de los cordados ya poseería esos organizadores en las barreras morfogenéticas conservadas, de manera similar al caso de hemicordados y vertebrados, y el *bauplan* neural del anfioxo moderno sería el resultado de una simplificación secundaria propia de cefalocordados, en el que la región central o DiMeP es simple y no regionalizada por la ausencia de estos organizadores, pero de él se desarrollan estructuras y derivados terminales en el adulto con varias funciones.

Concordante con cualquiera de estos escenarios, hemos demostrado que la ausencia de especificación por parte de los organizadores secundarios en vertebrados resulta en un único territorio topológicamente equivalente tálamo-pretecto-mesencefálico, parecido al DiMeP de anfioxo

Bibliografía

- Anadón, R., Adrio, F., Rodríguez-Moldes, I., 1998. Distribution of GABA immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of amphioxus (*branchiostoma lanceolatum pallas*). *J. Comp. Neurol.* 401, 293–307. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19981123)401:3<293::AID-CNE1>3.0.CO;2-F
- Bally-Cuif, L., Alvarado-Mallart, R.M., Darnell, D.K., Wassef, M., 1992. No Title. *Dev.* .
- Bertrand, S., Camasses, A., Somorjai, I., Belgacem, M.R., Chabrol, O., Escande, M.-L., Pontarotti, P., Escriva, H., 2011. Amphioxus FGF signaling predicts the acquisition of vertebrate morphological traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9160–5. doi:10.1073/pnas.1014235108
- Bloch-Gallego, E., Millet, S., Alvarado-Mallart, R.M., 1996. Further observations on the susceptibility of diencephalic prosomeres to En-2 induction and on the resulting histogenetic capabilities. *Mech. Dev.* 58, 51–63. doi:10.1016/S0925-4773(96)00557-6
- 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*. doi:10.1002/cne.
- Castro, L.F.C., Rasmussen, S.L.K., Holland, P.W.H., Holland, N.D., Holland, L.Z., 2006. A Gbx homeobox gene in amphioxus: insights into ancestry of the ANTP class and evolution of the midbrain/hindbrain boundary. *Dev. Biol.* 295, 40–51. doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.003
- Crossley, P.H., Martinez, S., Martin, G.R., 1996. Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380, 66–8. doi:10.1038/380066a0
- Danielian, P.S., McMahon, A.P., 1996. Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* 383, 332–334.
- Ekhart, D., Korf, H.W., Wicht, H., 2003. Cytoarchitecture, Topography, and Descending Supraspinal Projections in the Anterior Central Nervous System of *Branchiostoma lanceolatum*. *J. Comp. Neurol.* 466, 319–330. doi:10.1002/cne.10803
- Falcón, J., Coon, S.L., Besseau, L., Cazaméa-Catalan, D., Fuentès, M., Magnanou, E., Paulin, C.-H., Boeuf, G., Sauzet, S., Jørgensen, E.H., Mazan, S., Wolf, Y.I., Koonin, E. V., Steinbach, P.J., Hyodo, S., Klein, D.C., 2014. Drastic neofunctionalization associated with evolution of the timezyme AANAT 500 Mya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 314–9. doi:10.1073/pnas.1312634110
- Gardner, C. a, Barald, K.F., 1991. The cellular environment controls the expression of engrailed-like protein in the cranial neuroepithelium of quail-chick chimeric embryos. *Development* 113, 1037–1048.
- Gardon, S., Holland, L.Z., Gehring, W.J., Holland, N.D., 1998. Isolation and developmental expression of the amphioxus Pax-6 gene (*AmphiPax-6*): insights into eye and photoreceptor evolution. *Development* 125, 2701–10.
- Hirata, T., Nakazawa, M., Muraoka, O., Nakayama, R., Suda, Y., Hibi, M., 2006. Zinc-finger genes *Fez* and *Fez-like* function in the establishment of diencephalon subdivisions. *Development* 133, 3993–4004. doi:10.1242/dev.02585
- Hirth, F., Kammermeier, L., Frei, E., Walldorf, U., Noll, M., Reichert, H., 2003. An urbilaterian origin of the tripartite brain: developmental genetic insights from *Drosophila*. *Development* 130, 2365–2373. doi:10.1242/dev.00438
- Holland, P.W., 2000. Embryonic development of heads, skeletons and amphioxus: Edwin S. Goodrich revisited. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 29–34.
- Irimia, M., Piñeiro, C., Maeso, I., Gómez-Skarmeta, J.L., Casares, F., Garcia-Fernández, J., 2010. Conserved developmental expression of *Fezf* in chordates and *Drosophila* and the origin of the Zona Limitans Intrathalamica (ZLI) brain organizer. *Evodevo* 1, 7. doi:10.1186/2041-9139-1-7

- Jeong, J.-Y., Einhorn, Z., Mathur, P., Chen, L., Lee, S., Kawakami, K., Guo, S., 2007. Patterning the zebrafish diencephalon by the conserved zinc-finger protein Fezl. *Development* 134, 127–136. doi:10.1242/dev.02705
- Kamijyo, A., Yura, K., Ogura, A., 2015. Distinct evolutionary rate in the eye field transcription factors found by estimation of ancestral protein structure. *Gene* 555, 73–79. doi:10.1016/j.gene.2014.10.003
- Lacalli, T.C., 1996. Frontal Eye Circuitry, Rostral Sensory Pathways and Brain Organization in Amphioxus Larvae: Evidence from 3D Reconstructions. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 351, 243–263. doi:10.1098/rstb.1996.0022
- Lacalli, T.C., 2002. The dorsal compartment locomotory control system in amphioxus larvae. *J. Morphol.* 252, 227–37. doi:10.1002/jmor.1101
- Lacalli, T.C., 2004. Sensory systems in amphioxus: A window on the ancestral chordate condition. *Brain. Behav. Evol.* 64, 148–162. doi:10.1159/000079744
- Lacalli, T.C., Kelly, S.J., 2000. The infundibular balance organ in amphioxus larvae and related aspects of cerebral vesicle organization. *Acta Zool.* 81, 37–47. doi:10.1046/j.1463-6395.2000.00036.x
- Lehmann, C., Naumann, W.W., 2005. Axon pathfinding and the floor plate factor Reissner's substance in wildtype, cyclops and one-eyed pinhead mutants of *Danio rerio*. *Dev. Brain Res.* 154, 1–14. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.09.009
- Lichtenfeld, J., Viehweg, J., Schützenmeister, J., Naumann, W.W., 1999. Reissner's substance expressed as a transient pattern in vertebrate floor plate. *Anat. Embryol. (Berl.)* 200, 161–174. doi:10.1007/s004290050270
- López-Avalos, M.D., Cifuentes, M., Grondona, J.M., Miranda, E., Pérez, J., Fernández-Llebrez, P., 1997. Rostral floor plate (flexural organ) secretes glycoproteins immunologically similar to subcommissural organ glycoproteins in dogfish (*Scyliorhinus canicula*) embryos. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 102, 69–75.
- Lowe, C.J., Wu, M., Salic, A., Evans, L., Lander, E., Stange-Thomann, N., Gruber, C.E., Gerhart, J., Kirschner, M., 2003. Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* 113, 853–865. doi:10.1016/S0092-8674(03)00469-0
- Martinez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubenstein, J.L.R., Martin, G.R., 1999. FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmo-cerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression 1200, 1189–1200.
- Mastick, G.S., Davis, N.M., Andrew, G.L., Easter, S.S., 1997. Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain. *Development* 124, 1985–1997.
- Olsson, R., 1955. Structure and Development of Reissner's Fibre in the caudal end of amphioxus and some lower vertebrates.
- Olsson, R., Yulis, R., Rodriguez, E.M., 1994. Cell & Tissue The infundibular organ of the lancelet (*Branchiostoma lanceolatum*, Acrania): an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.*
- Pani, A.M., Mullarkey, E.E., Aronowicz, J., Assimacopoulos, S., Grove, E. a, Lowe, C.J., 2012. Ancient deuterostome origins of vertebrate brain signalling centres. *Nature* 483, 289–94. doi:10.1038/nature10838
- Puelles, L., 2001. Evolution of the Nervous System Brain segmentation and forebrain development in amniotes 55, 695–710.
- Puelles, L., Rubenstein, J.L.R., 2015. A new scenario of hypothalamic organization: rationale of new hypotheses introduced in the updated prosomeric model. *Front. Neuroanat.* 9, 1–23. doi:10.3389/fnana.2015.00027
- Rath, M.F., Rohde, K., Klein, D.C., Møller, M., 2013. Homeobox genes in the rodent pineal gland: Roles in development and phenotype maintenance. *Neurochem. Res.* 38, 1100–1112. doi:10.1007/s11064-012-0906-y

Discusión

- Ruiz, S., Anadn, R., 1991. The fine structure of lamellate cells on the brain of amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*, Cephalochordata). *Cell Tissue Res.* 597–600.
- Sánchez-Arrones, L., Ferrán, J.L., Rodríguez-Gallardo, L., Puellas, L., 2009. Incipient forebrain boundaries traced by differential gene expression and fate mapping in the chick neural plate. *Dev. Biol.* 335, 43–65. doi:10.1016/j.ydbio.2009.08.012
- Scholpp, S., Brand, M., 2001. Morpholino-Induced Knockdown of Zebrafish Engrailed Genes *eng2* and *eng3* Reveals Redundant and Unique Functions in Midbrain – Hindbrain Boundary Development 133, 129–133. doi:10.1002/gene.1047
- Scholpp, S., Foucher, I., Staudt, N., Peukert, D., Lumsden, A., Houart, C., 2007. *Otx1*, *Otx2* and *Irx1b* establish and position the ZLI in the diencephalon. *Development* 134, 3167–76. doi:10.1242/dev.001461
- Schomerus, C., Korf, H.-W., Laedtke, E., Moret, F., Zhang, Q., Wicht, H., 2008. Nocturnal behavior and rhythmic period gene expression in a lancelet, *Branchiostoma lanceolatum*. *J. Biol. Rhythms* 23, 170–181. doi:10.1177/0748730407313363
- Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Dressler, G., Urbánek, P., Busslinger, M., Gruss, P., 1999. *Pax2/5* and *Pax6* subdivide the early neural tube into three domains. *Mech. Dev.* 82, 29–39.
- Shimeld, S.M., 1999. The evolution of the hedgehog gene family in chordates: insights from amphioxus hedgehog. *Dev. Genes Evol.* 209, 40–7.
- Shimeld, S.M., 2008. C2H2 zinc finger genes of the *Gli*, *Zic*, *KLF*, *SP*, Wilms' tumour, *Huckebein*, *Snail*, *Ovo*, *Spalt*, *Odd*, *Blimp-1*, *Fez* and related gene families from *Branchiostoma floridae*. *Dev. Genes Evol.* 218, 639–49. doi:10.1007/s00427-008-0248-6
- Suzuki, D.G., Murakami, Y., Escrava, H., Wada, H., 2014. A comparative examination of neural circuit and brain patterning between the lamprey and amphioxus reveals the evolutionary origin of the vertebrate visual center. *J. Comp. Neurol.* 00, 1–11. doi:10.1002/cne.23679
- Takahashi, T., Holland, P.W.H., 2004. Amphioxus and ascidian *Dmbx* homeobox genes give clues to the vertebrate origins of midbrain development. *Development* 131, 3285–3294. doi:10.1242/dev.01201
- Urbánek, P., Fetka, I., Meisler, M.H., Busslinger, M., 1997. Cooperation of *Pax2* and *Pax5* in midbrain and cerebellum development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5703–5708. doi:10.1073/pnas.94.11.5703
- Vernadakis, a J., Bemis, W.E., Bittman, E.L., 1998. Localization and partial characterization of melatonin receptors in amphioxus, hagfish, lamprey, and skate. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110, 67–78. doi:10.1006/gcen.1997.7042
- Vopalensky, P., Pergner, J., Liegertova, M., Benito-Gutierrez, E., Arendt, D., Kozmik, Z., 2012. Molecular analysis of the amphioxus frontal eye unravels the evolutionary origin of the retina and pigment cells of the vertebrate eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 15383–8. doi:10.1073/pnas.1207580109
- Wicht, H., Lacalli, T.C., 2005. The nervous system of amphioxus: structure, development, and evolutionary significance. *Can. J. Zool.* 83, 122–150. doi:10.1139/z04-163
- Wicht, H., Laedtke, E., Korf, H.W., Schomerus, C., 2010. Spatial and temporal expression patterns of *Bmal* delineate a circadian clock in the nervous system of *Branchiostoma lanceolatum*. *J. Comp. Neurol.* 518, 1837–1846. doi:10.1002/cne.22306
- Zuber, M.E., Gestri, G., Viczian, A.S., Barsacchi, G., Harris, W. a, 2003. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* 130, 5155–5167. doi:10.1242/dev.00723

Conclusiones

Las conclusiones de esta tesis son:

1. La genoarquitectura de la placa neural de anfiexo en desarrollo es más compleja que lo previamente antecedido.
2. La placa neural del anfiexo, como la de vertebrados se regionaliza rostrocaudal- y dorsoventralmente y se subdivide en: El Hipotálamo Primordial (HyP), el DiMesencéfalo Primordial (DiMeP) y Rombo eSpinal (RhSp).
3. La genoarquitectura durante la ontogenia del ojo frontal del anfiexo y sus proyecciones sugieren su homología con la retina y las proyecciones retino-tectales del sistema visual de vertebrados.
4. El órgano infundibular, el cuerpo lamelar y el neuropilo son derivados terminales del DiMeP, siendo éste último la proyección principal del ojo frontal.
5. El Centro PreMotor (CPM) de anfiexo, que se sitúa en el RhSp, es topológicamente y funcionalmente coincidente con centros reticuloespinales de lampreas y mixinos.
6. La correspondencia topológica y funcional de algunos derivados de anfiexo y vertebrados permite trazar un modelo que describe el *bauplan* neural de cordados.
7. La función que desarrollan los órganos de balance respectivos de vertebrados y cefalocordados tiene un origen topológico común en el hipotálamo.
8. El órgano infundibular de anfiexo parece ser el candidato homólogo al órgano flexural de vertebrados.
9. Existe correspondencia topológica entre el DiMeP de anfiexo y la región que comprenden el tálamo, pretálamo y mesencéfalo de vertebrados.
10. El diencéfalo de vertebrados no constituye una unidad evolutiva, a diferencia del tálamo, pretecho y mesencéfalo que parecen compartir origen evolutivo.
11. El DiMeP del anfiexo es un equivalente simple o simplificado de la unidad evolutiva tálamo-pretecto-mesencefálica.

***Material
y métodos***

1. Anotación génica y clonajes

Branchiostoma lanceolatum

Para todos los genes previamente anotados se diseñaron *primers* para clonar, siempre que fuese posible, la mayor parte de secuencia codificante del gen. Se inspeccionó una librería de *cDNA* líquido proveniente de distintos estadios del desarrollo embrionario del anfibio europeo (*Branchiostoma lanceolatum*) mediante PCR usando *primers* diseñados para la especie hermana americana (*Branchiostoma floridae*). Para todos los genes no publicados previamente, se realizó una búsqueda de las secuencias en el genoma de *B. floridae* JGI v1.0 por medio de tBLASTN en base a la secuencia aminoacídica de sus putativos homólogos en vertebrados. Las resultantes secuencias genómicas fueron la base para los modelos génicos predichos gracias a GeneWise2 (Birney et al., 2004) y GeneScan (Burge and Karlin, 1997) de la misma manera que fue usado por D’Aniello y colaboradores (D’Aniello et al., 2008). Los clones resultantes fueron secuenciados y comparados , en los casos posibles, con los submitidos previamente a NCBI con los números de acceso que se recogen en la tablaM1.

Gen	Accession number		Gen	Accession number	
	<i>B floridae</i>	<i>B lanceolatum</i>		<i>B floridae</i>	<i>B lanceolatum</i>
Brn1/2/4	AY078995		Lhx1/5	DQ399521.1	
Dach	AF541879		Lhx2/9a	XM_002592438.1	
Dlx	U47058		Meis	F:GGTCAGATGGCGCAAAGGTA; R:GACCAGTCAAACCGTGCACT	
Ebf/COE	AJ580840		MnxA	AF308821.1	
En	U82487		Msx	AJ130766.1	
Fezf	XM_002610573	HM245959	Nkx2.1	AF077840.1	
Fgf8	FJ266460.1	EU606035.1	Nkx2.2	AF032999.1	
FoxA2	D84221		Nkx6	EEN65080.1	
FoxB	AJ506162		Nova	JF314363.1	JF314355.1
FoxD	AF512537		Otx	AF043740.1	EU685295.1
Gata1/2/3	FJ615537.1 L FJ615538.1 S	JQ942473.1	Pax2/5/8	AF053763.1	EU685298.1
Gbx	DQ416766.1	HM245960.1	Pax3/7	AF165886.1	
Gli	AJ252244.1		Pax4/6	AJ223440.1	
Gsc	AF281674		PCBP	F:ATGGACATCTCTTTGACGACG; R:TTACAACAGACTGGTGTGATAAG	
HH	Y13858.1	EU754743.1	Sim	AJ506161	
Hox1	AB028206.2	JX088060.1	Six3/6	EF195743	
Hox3	X68045.1	JX088062.1	Snail	AF081809.1	HM359129.1
Hox6	Z35146.1	JX088066.1 *	SoxB2	DQ644542.1	
IrxA	FJ167343	EU754744.1	Rx	XM_002609729.1	ABD62780.1
IrxB	EU754748.1	EU754747.1	Wnt3	AF361013.1	EU685300.1
IrxC	EU754750.1	EU754749.1	Wnt5	AF361014.1	EU685301.1
Krox	AJ278149.1		Wnt7		EU685303.1
Lef	DQ148394.1		Wnt8	AF190470.1	
Lfringe	AJ566297.1		Zic	AJ252245	

Tabla M1: Genes analizados en *Branchiostoma lanceolatum* con sus números de acceso y los *primers* utilizados en caso de que no exista un numero de acceso.

Danio rerio

Los genes incluidos en la tabla M2 fueron clonados para posterior análisis de los *knock down* transitorios. Se diseñaron los *primers* en base a las anotaciones y secuencias de sus respectivos accesos en la base de datos NCBI.

Gene	Reference Number
Arxa	NM_131384.1
Dmbxa	NM_152977.1
Eng1a	NM_131045.1
Eng2a	NM_131044.2
Eng2b	NM_131040.1
Fezf1	NM_001114348.1
Fezf2	NM_131636.1
Fgf8a	NM_131281.2
Gbx2	NM_152964.1
Meis2b	NM_130910.1
Otx1a	NM_131215.3
Otx2	NM_131251.1

Gene	Reference Number
Pax2a	NM_131184.2
Pax2b	NM_131640.1
Pax3a	NM_131277.1
Pax5	NM_131638.1
Pax6a	NM_131304.1
Pax7a	NM_131326.1
Pou2	NM_131112.1
Shha	NM_131063.1
Shhb	NM_131199.2
Tcf4	XM_003200806.1
Wnt1	NM_001201398.1

Tabla M2: Genes analizados en Danio rerio con sus números de acceso.

2. Modelos animales

Branchiostoma lanceolatum

La recolección de los individuos adultos de la especie *B. lanceolatum* se realiza en Argelès-sur-Mer (Francia) anualmente, unos meses antes de la temporada de reproducción del animal en la naturaleza, que se extiende desde principios del mes de mayo a julio, gracias a la intendencia de la institución oceanográfica del Laboratoire Aragó en Banyuls sur mer, de la Universidad Marie-Curie de París. Los adultos se mantienen a una temperatura constante de 17-18°C en contenedores de vidrio con agua marina y son alimentados con una mezcla de algas disponible comercialmente (*Phytoplankton-Julian Sprung's formula* de la marca TwoLittleFishies, Inc.).

La liberación de gametos en el laboratorio se realiza por choque térmico (incremento en 4 °C respecto de la temperatura de mantenimiento) durante 36h donde los individuos de ambos sexos permanecen juntos las 24 primeras y son separados individualmente en las últimas 12. Poco después del inicio del periodo de oscuridad de su ciclo diario, liberan los gametos y, al estar aislados machos y hembras, se puede proceder a la fertilización *in vitro* controlada. De esta manera el desarrollo es sincrónico y se pueden realizar fijaciones de lotes de embriones a distintos tiempos post-fertilización, o estadios distintos de desarrollo.

Material y métodos

Danio rerio

Los individuos en edad de cría establecidos (UB, estabulario húmedo de la Facultat de Biologia), se mantienen a 28°C en un ciclo de 14 horas de luz/ 10 horas de oscuridad y se cruzan según *The Zebrafish Book* (Westerfield, 2000).

Se desarrollaron *knock down* transitorios cuádruples mediante la inyección de cuatro morfolinós antisentido (MO's) como previamente describieron Scholpp y colaboradores (2007) para la combinación de MO's Otx1l y Otx2; y para la combinación de MO's eng2 y eng3 como en Scholpp (2001). Los cuatro morfolinós fueron inyectados a la vez, en el estadio de una célula, muy cerca del blastómero. Los embriones inyectados fueron procesados para su validación a través de PCR y parte de ellos fueron fijados en PFA 4% a 4º toda la noche para analizar los fenotipos a través de ISH.

Mus musculus

En colaboración con el laboratorio de Eduardo Puelles en el Instituto de Neurociencias, UMH-CSIC, Alicante, y dentro del marco de su proyecto, se desarrollaron transgénicos de ratón condicionales para *engrailed* y *nulos* para *fgf8* y se realizaron las ISH correspondientes. El trabajo fue desarrollado por José Antonio Moreno Bravo siguiendo el protocolo para ISH y IHC descritos en los capítulos 4 y 5 de *In Situ Hybridization Methods* (Ferran et al., 2015a, 2015b)

Gallus gallus

En colaboración con el laboratorio de Paola Bovolenta en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid dentro del marco de su proyecto, se realizaron las ISH correspondientes en embriones de pollo. El trabajo fue desarrollado por Luisa Sánchez Arrones siguiendo el protocolo para ISH y IHC descritos en el capítulo 4 de *In Situ Hybridization Methods* (Ferran et al., 2015b).

3. Hibridaciones *in situ in toto* y histología

Se realizaron fijaciones a distintos tiempos de desarrollo en 4% PFA, 0.5M NaCl, 0,1M MOPS a pH 8 a temperatura ambiente durante 2 horas y fueron almacenados en etanol 70% a -20°C.

ISH (in situ hybridisation)

El protocolo que se siguió para realizar detecciones *in situ* de RNA mensajeros fue descrito por Yu y Holland (Yu and Holland, 2009) para anfibio y por Thisse y Thisse (Thisse and Thisse, 2008) para pez cebra. Los revelados colorimétricos se realizaron con BMPurple como sustrato para la fosfatasa alcalina.

Las sondas *antisense* fueron sintetizadas usando el kit *DIG RNA labelling mix* (Roche).

FISH (fluorescent in situ hybridisation)

Las hibridaciones *in situ in toto* fluorescentes fueron realizadas esencialmente como las no-fluorescentes añadiendo las siguientes modificaciones:

Tratamiento mucolítico con 5% N-acetilcisteína y tratamiento detergente 1%NP40, 0.5% SDS en PBS antes de prehibridar los embriones.

Las sondas DIG antisense fueron sintetizadas usando el kit *DIG RNA labelling mix* (Roche) y las sondas antisense DNP, añadiendo el análogo de uracilo marcado con DNP, DNP-11-UTP (PerkinElmer). Los anticuerpos utilizados para detectar los marcajes fueron α DIG-POD (Roche) y α DNP-HRP (PerkinElmer) y fueron revelados usando los kits TSA-plus fluorescein y TMR (PerkinElmer).

Criosecciones

Para determinadas ISH *in toto* en anfibio y pez cebra se realizaron criosecciones adaptando el protocolo de ratón descrito en los capítulos 4 y 5 de *In Situ Hybridization Methods* (Ferran et al., 2015b). Brevemente, se criopreservaron los embriones en sacarosa 20% previamente

Material y métodos

a la inclusión en gelatina15%-sacarosa20% de la que se construyeron los bloques que se congelaron en un baño de isopentano y hielo seco y fueron crio seccionados 12-14µm de grosor en un Criostato.

Secciones en parafina

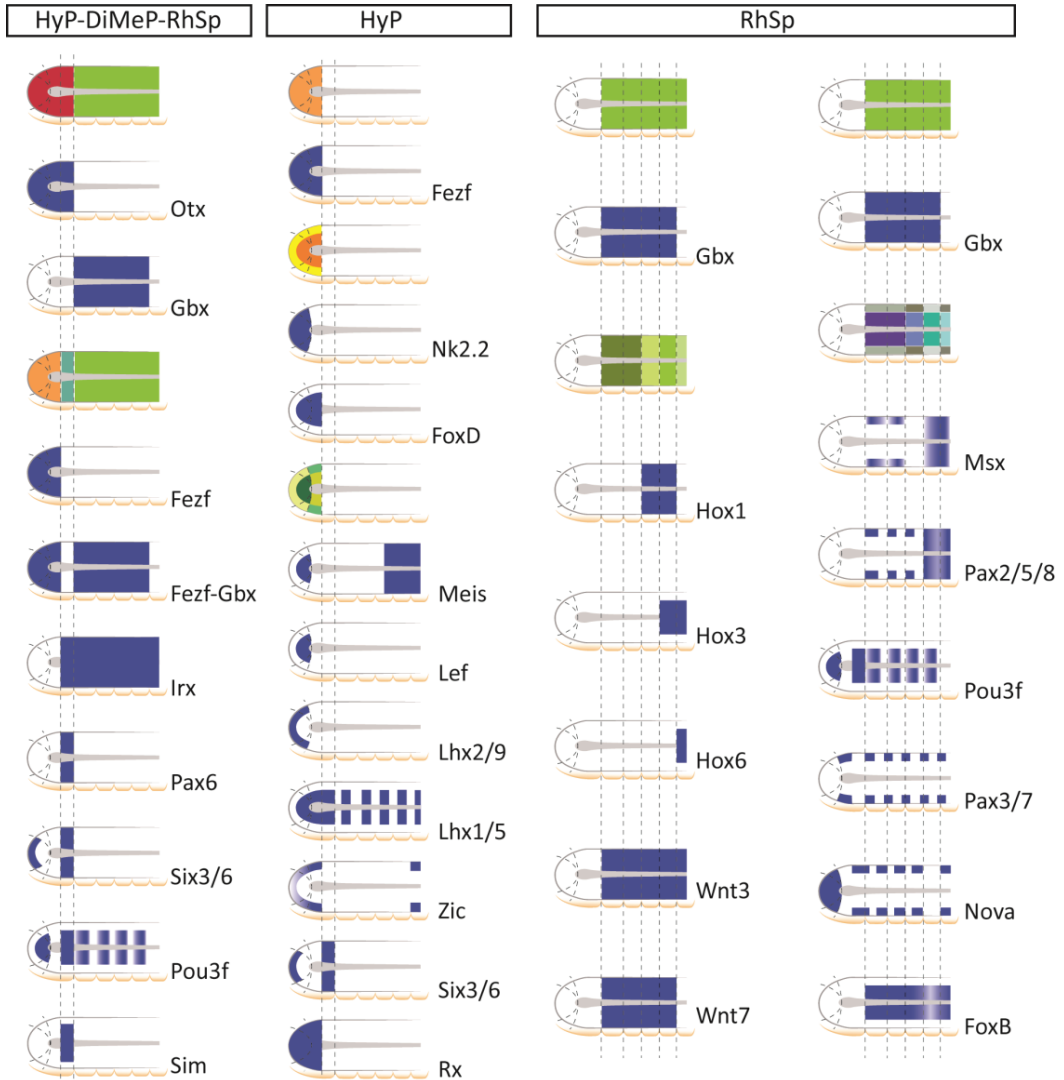
Para determinadas ISH in toto en anfiexo se realizaron secciones embebiendo previamente los embriones en parafina. Se realizó previamente una contra tinción en Ponceau-S 1% en 1% ácido acético glacial como en Candiani y colaboradores (Candiani et al., 2012).

Bibliografía

- Birney, E., Clamp, M., Durbin, R., 2004. GeneWise and Genomewise. *Genome Res.* 14, 988–995. doi:10.1101/gr.1865504
- Burge, C., Karlin, S., 1997. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.* 268, 78–94. doi:10.1006/jmbi.1997.0951
- Candiani, S., Moronti, L., Ramoino, P., Schubert, M., Pestarino, M., 2012. A neurochemical map of the developing amphioxus nervous system. *BMC Neurosci.* 13, 59. doi:10.1186/1471-2202-13-59
- D’Aniello, S., Irimia, M., Maeso, I., Pascual-Anaya, J., Jiménez-Delgado, S., Bertrand, S., García-Fernández, J., 2008. Gene expansion and retention leads to a diverse tyrosine kinase superfamily in amphioxus. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1841–54. doi:10.1093/molbev/msn132
- Ferran, J.L., Ayad, A., Merchán, P., Delgado, M., Sánchez-arrones, L., Alonso, A., Sandoval, J.E., Bardet, S.M., Miguel, R.C., Sánchez-guardado, L.Ó., Hidalgo-sánchez, M., Martínez-de-la-torre, M., Puellas, L., 2015a. Exploring Brain Genoarchitecture by Single and Double Chromogenic In Situ Hybridization (ISH) and Immunohistochemistry (IHC) on Cryostat, Paraffin, or Floating Sections, in: Hauptmann, G. (Ed.), *In Situ Hybridization Methods. Neuromethods.* doi:10.1007/978-1-4939-2303-8
- Ferran, J.L., Ayad, A., Merchán, P., Delgado, N.M., Sánchez-arrones, L., Alonso, A., Sandoval, J.E., Bardet, S.M., Corral-san-, R., Sánchez-guardado, L.Ó., Hidalgo-sánchez, M., Martínez-de-la-torre, M., Puellas, L., 2015b. Exploring Brain Genoarchitecture by Single and Double Chromogenic In Situ Hybridization (ISH) and Immunohistochemistry (IHC) in Whole-Mount Embryos, in: Hauptmann, G. (Ed.), *In Situ Hybridization Methods. Neuromethods.* doi:10.1007/978-1-4939-2303-8
- Thisse, C., Thisse, B., 2008. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat. Protoc.* 3, 59–69. doi:10.1038/nprot.2007.514
- Westerfield, M., 2000. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, 4th ed. Univ. of Oregon Press.
- Yu, J.K.S., Holland, L.Z., 2009. Amphioxus whole-mount in situ hybridization. *Cold Spring Harb. Protoc.* 4, 1–7. doi:10.1101/pdb.prot5286

Anexos

Anexo A1. Esquematzación de algunos patrones de expresión analizados.



Anexo A2 Cefalocordados. En este anexo se describen los cefalocordados como modelo animal, en toda su extensión. Algunas de las secciones que se incluyen en la Introducción de esta tesis se repiten aquí para su cohesión y coherencia.

***Cephalochordata*: hábitat y taxonomía**

Cephalochordata, del griego κεφαλή, *kephalé* que significa cabeza y χορδή, *khordé* que se



Figura Anfioxo. Individuos adultos de la especie *Branchiostoma lanceolatum*

traduce como cuerda, debido a la forma lanceolada de todo su cuerpo, desde el extremo más rostral hasta el caudal, también son denominados peces lanceta. Además, los cefalocordados son también apodados acranios, debido a la ausencia de estructuras craneales, o anfioxos, haciendo referencia a sus extremos puntiagudos (Figura A2.2).

Son animales invertebrados marinos, filtradores bentónicos en su fase adulta. Viven enterrados parcialmente, mostrando la boca por donde captan el agua de la que filtrarán las partículas alimenticias, y están presentes en el fondo de mares de aguas templadas siendo su distribución fundamentalmente determinada por el tipo de sedimento del fondo marino. Las fases larvianas, por el contrario, son planctónicas.

Dentro del subfilo *Cephalochordata*, además del género *Branchiostoma*, existen otros dos, *Asymmetron* y *Epigonichthys*. Entre los tres géneros engloban unas 30 especies perteneciendo la gran mayoría al género *Branchiostoma*.

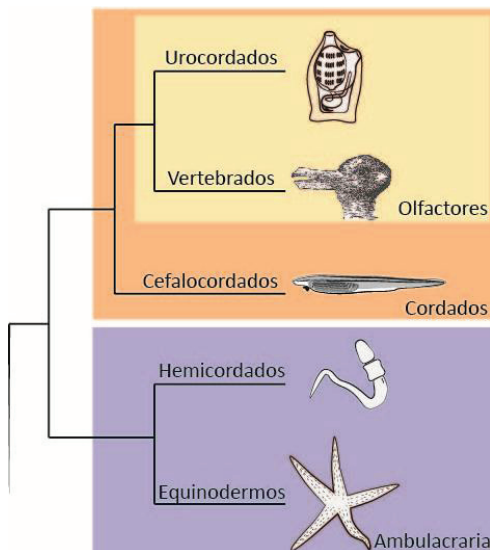
Entre ellas, las especies más utilizadas en investigación (EvoDevo) son *Branchiostoma lanceolatum* (especie europea), *Branchiostoma floridae* (especie americana) y *Branchiostoma belcheri* (especie asiática). Aunque los tiempos de divergencia se estiman entre 100 y 200 Myr (Nohara et al., 2004; Somorjai et al., 2008), las tres especies muestran un alto grado de conservación tanto a nivel morfológico como a niveles de expresión génica. La especie americana (Florida-Caribeña) fue la primera en disponer de la secuencia completa del genoma (Holland et al., 2008; Putnam et al., 2008) además de gran número de EST (Yu et

Anexo A2

al., 2008). El genoma de la especie subtropical asiática está también disponible junto con 14 transcriptomas tanto de varios estadios embrionarios como de tejidos adultos para comparación (Huang et al., 2014). Para la especie mediterránea, el genoma estará disponible en un futuro próximo, entretanto su transcriptoma sí lo está (Oulion et al., 2012). A pesar de la falta de datos genómicos cabe destacar que ésta última es de fácil manipulación en el laboratorio gracias a las mejoras técnicas en mantenimiento e inducción de liberación de gametos en cautividad durante la época de reproducción (Fuentes et al., 2007).

Los cefalocordados, pertenecen al filo *Chordata* que comprende además, el grupo de los olfactores compuesto por los subfilos *Urochordata* y *Vertebrata* (Delsuc et al., 2006) estimándose el tiempo de divergencia del ancestro común en 550Myr (Blair and Hedges, 2005; Delsuc et al., 2008). (Figura A2.1)

Las principales características que tienen en común los cordados son la presencia de una notocorda, que se extiende a lo largo de todo su eje longitudinal y, en el caso concreto de los cefalocordados su límite rostral es más anterior que el del tubo neural. El ya mencionado el tubo neural, hueco y dorsal a la notocorda, es otra de las características morfológicas que



comparten los cordados, además de una faringe perforada con aperturas branquiales, miómeros o bloques musculares segmentados y, finalmente, la cola postanal. (Figura A2.2)

Figura A2.1. Posición filogenética de los cefalocordados en relación con los cordados.

Morfología del anfiexo adulto

En los cefalocordados, concretamente, además son característicos otros rasgos morfológicos como la cavidad bucal rodeada de cirrios que rodean la boca y la aleta dorsal que es continua desde el punto más rostral del animal hasta ensancharse formando la aleta caudal. Otros detalles de la morfología del anfiexo adulto se detallan a continuación.

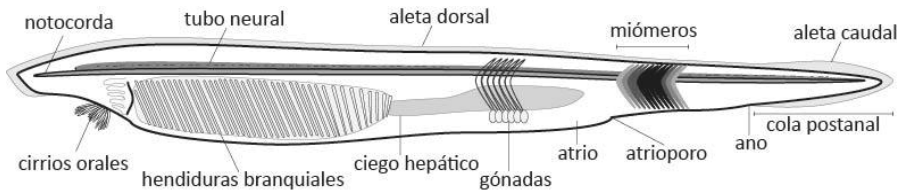


Figura A2.2. Representación gráfica de las principales características del anfiexo como cordado y algunas de las características morfológicas propias de cefalocordados. Anterior hacia la izquierda.

Bloques musculares

Los bloques musculares, o miómeros, están segmentados en forma de V. Se distribuyen de forma seriada y paralela a lo largo del eje antero-posterior del animal en ambos lados del cuerpo, pero no de forma simétrica, sino con un desfase de la medida de medio bloque muscular, de manera que para un bloque de la derecha coinciden medio segmento anterior y posterior de los respectivos bloques de la izquierda, este fenómeno es debido al desfase que experimentan los somitas durante el desarrollo. Los miómeros están separados entre sí por tejido conectivo, o mioseptos, y cada bloque muscular conecta con el tubo neural mediante las denominadas *colas musculares*.

Notocorda

La notocorda es también una estructura identificable a simple vista con ciertas peculiaridades. Como se ha mencionado anteriormente, la notocorda alcanza el extremo más rostral del animal por delante del tubo neural. Está formada por placas notocordales constituidas por una o varias células musculares rodeadas por tejido conectivo, que es perforado dorsalmente en los puntos donde las placas se extienden para conectar con el

Anexo A2

tubo neural, a través de las colas musculares, de la misma manera que ocurre en los miómeros.

Reproducción

En los márgenes ventrales de las series de bloques musculares, se encuentran las gónadas, seriadas y blanquecinas, cada una coincidente con el miómero correspondiente, en ambos lados del animal, a excepción del género *Asymmetron* que sólo posee la serie de gónadas correspondiente al lado derecho. No existen diferencias obvias a simple vista entre sexos, por lo que es necesario observar las gónadas directamente bajo la lupa para diferenciar el tipo de gametos que contienen. En la parte ventral del animal se identifican dos aperturas, la más rostral corresponde al atrioporo que es el orificio de salida del atrio, por donde sale la corriente de agua que entra por la boca y por donde también son liberados los gametos en su época de reproducción. En el caso de la especie europea, la época de reproducción se expande desde mediados de mayo hasta principios de julio tanto en la naturaleza como en cautividad y uno de los factores principales en desencadenar el desove de los individuos maduros es el incremento de la temperatura (3-4°C) aunque parece no ser el factor más crítico en la naturaleza (Fuentes et al., 2007, 2004). Los recientes avances en el cultivo e inducción de desove del anfióxico en cautividad permiten la obtención de embriones continuamente durante el año en *B. belcheri* (Li et al., 2013, 2012) y *B. lanceolatum* (Benito-Gutiérrez et al., 2013), acercándolo cada vez más a los modelos animales de laboratorio estándar.

Alimentación

El sistema digestivo del anfióxico es relativamente simple. El agua marina entra inicialmente por la boca, que es ventroterminal y que está rodeada de cirrios y constituye la apertura a la cavidad bucal, revestida por un tejido ciliado denominado *Wheel organ*, y que se delimita posteriormente por el *velum* donde se abre la boca velar constituida por tentáculos que, de la misma manera que los cirrios, y cilios bucales facilitan y provocan las corrientes de entrada de agua marina cargada de partículas alimenticias. Detrás del velum y la boca velar, se abre

la faringe que es una cámara elongada, que se extiende casi hasta la altura del atrioporo, y está horadada por entre 80 y 90 pares de hendiduras branquiales laterales, paralelas y pareadas, asimétricamente, de la misma manera que ocurre con los miotomos y las gónadas, a cada lado del animal. Las hendiduras branquiales no se abren directamente al exterior sino que lo hacen dentro del atrio, por donde circula el agua marina que ha entrado por la boca. En la línea media formada por la convergencia de las hendiduras branquiales del lado izquierdo con las del derecho, o en la parte más dorsal y ventral de la faringe, encontramos respectivamente, la hendidura epifaríngea y el endostilo, que se encargan del filtrado del alimento. Progresando en el sistema digestivo, aparece el estómago que es diverticulado, el ciego hepático, el iliocolon y finalmente, el intestino que conecta con el ano ventroterminal y ligeramente desplazado a la izquierda. La digestión se da mayoritariamente en el estómago e iliocolon y la absorción en el ciego hepático.

Respiración

Las hendiduras branquiales parecen estar relacionadas con la captación de oxígeno del agua circulante ya que en se aumenta el flujo de agua marina en circulación cuando la saturación de oxígeno es baja (Azariah, 1974), y con el sistema excretor a través de las barras faríngeas.

Las barras faríngeas que rodean las hendiduras branquiales pueden ser de dos tipos según su origen ontogenético y son distinguibles anatómicamente en el adulto. Cuando las primeras hendiduras faríngeas aparecen en el embrión son circulares y se separan por las barras primordiales, a medida que se avanza en el desarrollo aparecen las barras secundarias que atraviesan la hendidura faríngea desde la parte dorsal fusionándose con la parte ventral de la hendidura branquial primaria. Gracias a éstas barras secundarias el flujo circulatorio accede a las hendiduras branquiales mientras que las barras primarias son las que darán soporte a los nefridios.

Excreción

El sistema excretor del anfióxico está formado por nefridios, de dos tipos: el nefridio de *Hatschek*, y los nefridios branquiales. El primero es una estructura tubular simple y ciega que se sitúa en la parte anterior, a la altura del *velum* y a la izquierda de la notocorda, y que se abre en la parte dorsal de la faringe. Los nefridios branquiales se encuentran asociados a cada barra faríngea primaria, como ya se ha mencionado, y cada uno presenta un brazo que circula hacia la parte dorsal de una barra secundaria y se abre al atrio, y otro ciego que recorre la barra faríngea. El lumen de todos los nefridios es un epitelio monocapa ciliado y además están altamente asociados con los celomas que los rodean y además con los plexos del sistema circulatorio. Por ejemplo, el nefridio de *Hatschek* se encuentra paralelo a la porción anterior de la aorta dorsal y se encuentra separado de ella por un espacio celómico.

Circulatorio

La mayor parte del conocimiento sobre el sistema circulatorio del anfióxico proviene de estudios que datan de las décadas de los 70 y 80 (Moller and Philpott, 1973; Rähr, 1981). El sistema hemal del anfióxico es semi-abierto ya que posee características tanto de sistemas circulatorios abiertos como de sistemas cerrados. Por una parte la circulación del fluido hemal es direccionada, pero reversible e irregular y, en general, presumiendo una cierta homología con los vasos principales de los vertebrados, se habla de una parte venosa y una arterial, que se encuentran interconectadas por plexos. Por otra parte, y en favor de las similitudes con sistemas circulatorios abiertos, no existe un límite definido para los vasos ya que forman parte de la cavidad blastocélica y están delimitados por la lámina basal del epitelio adyacente o por tejido conectivo, por lo que el fluido puede estar en contacto con los tejidos circundantes. El anfióxico no posee un verdadero corazón, pero tiene vasos contráctiles que se encargan de tal función. Los filamentos contráctiles de estos vasos están situados en la parte basal o rodeando el epitelio celómico que rodea el vaso en cuestión. Además, la presencia de células mioepiteliales contribuye al movimiento del fluido, en combinación con dichos filamentos o independientemente. La arteria endostilar parece ser

la más contráctil, debido sobre todo a una gran cantidad de este tipo de células presentes en el celoma endostilar, por donde se extiende dicho vaso. De la misma forma los vasos hemales branquiales bañan la base de las barras faríngeas retornando la circulación hacia la aorta dorsal. De esta manera el fluido hemal circula por todo el sistema de forma principalmente direccionada.

Aunque los individuos adultos no poseen un corazón centralizado, al asumir la probabilidad de que la condición ancestral para un corazón o órgano bombeante centralizado debía parecerse a un tubo simple y contráctil con espacios hemales y conexiones entre los epitelios de los celomas endodérmicos y viscerales (Xavier-Neto et al., 2007), estudios en estadios embrionarios de anfibio, y gracias al uso de marcadores moleculares como los genes *BfCsx* (Holland et al 2003) y *BfTbx4/5* (Minguillón et al 2009), se han propuesto homologías con el corazón de vertebrados para la arteria endostilar y para el vaso subintestinal, respectivamente.

La red génica reguladora del desarrollo temprano del corazón de vertebrados y otros órganos pulsátiles de invertebrados está muy conservada (Davidson and Erwin, 2006). Los genes ortólogos pertenecientes a las familias génicas Hand, Nkx2-5 and Tbx tienen roles cruciales en la formación de éstos órganos, y aunque similaridad entre expresión génica no significa necesariamente homología de función, la colocalización durante el desarrollo de marcadores cardíacos como *Csx* (*Nkx2.5*), *Hand*, y *Tbx4/5* en anfibio en el epitelio celómico bajo el intestino y en el mesodermo faríngeo sugiere que existe especificación de un dominio cardiogénico no restringido, y como ya ha sido mencionado, probablemente especificando tanto las arterias faríngeas (endostilar) como los vasos intestinales, es decir, un dominio cardiogénico ‘descentralizado’ que incluye, y del que desarrollaran en el adulto, todos los principales vasos contráctiles (*ver anexo A3 de esta tesis*)(Pascual-anaya et al., 2013).

Como se ha comentado anteriormente, el sistema circulatorio del anfibio no posee un verdadero endotelio que delimite sus vasos aunque se ha observado la presencia de células tipo amebocito (hemocitos), citológicamente simples. Éstas forman parte del fluido hemal

Anexo A2

aunque en algunos casos se encuentran en contacto con el límite del vaso en forma de cúmulos. Estos cúmulos nunca forman complejos de unión ni se les observa lámina basal propia. Evolutivamente se ha asociado estos amebocitos con el tipo celular del que se originaron las células endoteliales de vertebrados (Muñoz-Chápuli et al., 2005).

Además, se ha observado en larvas tempranas de anfiexo que sus hemocitos tienen capacidad fagocítica y proteolítica y comparten similitudes funcionales con los macrófagos de los vertebrados (Hartenstein, 2006). Kučera y colaboradores observaron que para *B. lanceolatum*, en zonas ricas en hemocitos, la matriz extracelular de la lámina basal del epitelio adyacente está reducida y sólo existe un alto contenido en laminina, mientras que en zonas con ausencia de hemocitos se mantiene la matriz extracelular, también con un alto contenido en laminina (Kučera et al., 2009). En el caso de los vertebrados, las células endoteliales, derivadas del mesodermo, se desarrollan entre dos superficies de láminas basales aislando el lumen vascular que quedará en su interior.

El estudio ontogenético de marcadores hematopoyéticos como *Scl* y *Pdvegfr* y su colocalización con el marcador del nefridio de *Hatschek*, *Pax2/5/8*, apuntan a que la hematopoyesis en anfiexo se da en una área homóloga al AGM (aorta-gonad-mesonefros) de vertebrados (Weinstein, 1999) y además los amebocitos circulantes que se forman en esta AGM area, que tienen un rol crucial en la formación de los vasos del anfiexo (Kučera et al., 2009) bien podrían ser similares a los progenitores evolutivos del endotelio de los vertebrados (Pascual-anaya et al., 2013).

Nervioso

El sistema nervioso central (SNC) del anfiexo adulto consiste en un cordón nervioso dorsal, situado justo sobre la notocorda, que se extiende por casi toda la longitud del animal. Rostralmente, la notocorda supera al tubo neural en extensión y éste mantiene su extremo anterior justo por detrás de las cavidades celómicas más anteriores que dan soporte a la aleta rostral. El tubo neural, en su extremo caudal, justo por encima del de la notocorda, forma una protuberancia terminal llamada ámpula caudal, que es identificable en el adulto y

representa uno de los pocos puntos de referencia a simple vista del tubo neural del anfióxico adulto, donde apenas podemos identificar un pequeño ensanchamiento anterior correspondiente a la vesícula cerebral, que en estadios larvarios es mucho más manifiesta. Por tanto, en el anfióxico no son reconocibles ni neurómeros ni otras relevancias morfológicas externas que identifiquen organización segmental a parte los identificables puntos de salida, seriados, de los nervios dorsales. Curiosamente, internamente sí es posible caracterizar diferencias citoarquitectónicas tanto en el eje anteroposterior como dorsoventral, en adultos y larvas de anfióxico, que permiten establecer diferencias, o subdivisiones, entre regiones a lo largo del tubo neural.

El sistema nervioso periférico (PNS) del anfióxico adulto consiste en un set de plexos periféricos y series de nervios dorsales intermioméricos. Los nervios dorsales carecen totalmente de ganglios, a diferencia de vertebrados, y en cambio, los nervios periféricos consisten únicamente en axones que derivan tanto de neuronas centrales como periféricas y unas pocas células del tipo glial como soporte.

Inervación

Los nervios dorsales *per se*, proyectan desde los márgenes dorsolaterales del tubo neural a través de los mioseptos, entre los miómeros, hacia la piel donde se dividen formando una rama dorsal que inerva la parte dorsal del animal y una rama ventral que se ramifica para inervar la parte ventral del animal proyectando ramas viscerales que se subdividen formando a su vez ramas ascendentes y descendentes que conectan con los diversos plexos periféricos, usualmente dispuestos cerca del intestino, en órganos sensitivos y en la piel. Cada par nervioso proyecta respectivamente hacia ambos lados del animal (salvo excepciones) de manera asimétrica, alineándose cada raíz del nervio con el miosepto correspondiente que, como se ha comentado con anterioridad, en el caso del lado izquierdo sufren un avanzamiento respecto a los del lado derecho. Respecto a la inervación periférica general, cabe destacar que los nervios caudales a los que inervan el esfínter anal (51º a 53º) carecen de rama visceral, ya que inervan únicamente la cola postanal.

Anexo A2

Existen ciertas diferencias para la inervación periférica de la zona oral y rostral respecto a la del resto del cuerpo debido, en parte, a diferencias intrínsecas del territorio. En la región rostral, el canal central del tubo neural se abre al exterior por el remanente del neuroporo o fosa de *Kölliker*. Dos pares de nervios emergen desde la vesícula cerebral para inervar la región rostral, el nervio rostral y el anterodorsal. Ninguno de los dos proyecta a través de un miosepto, como lo hacen todos los demás nervios dorsales, debido a la ausencia de miómeros en la zona rostral. Los dos primeros pares de nervios proyectan simétricamente dirigidos rostralmente a través del tejido conectivo que engloba el tubo neural y la notocorda. Además, a lo largo de las ramificaciones de los dos primeros pares se pueden identificar pequeñas agrupaciones de células llamadas corpúsculos de *Quatrefages*, a los que se les atribuye funciones mecanosensitivas y consisten en células sensitivas primarias encapsuladas situadas periféricamente en la piel. Igualmente inusual es el hecho de que el primer par, o par rostral, es el único que no proyecta desde la parte dorsolateral del tubo neural, sino que lo hace desde la parte ventral. Por otra parte, la inervación oral es también excepcional ya que proviene exclusivamente de la ramificación izquierda de los pares 3º al 7º siendo inexistentes las ramificaciones viscerales de los pares correspondientes del lado derecho. Es decir, la inervación de la boca y el aparato velar tiene un origen enteramente en el lado izquierdo del animal, reflejo de su ontogenia, ya que la boca se abre por primera vez en el lado izquierdo del embrión y las conexiones iniciales se mantienen de manera que los nervios se arrastran con el reposicionamiento de la boca durante la metamorfosis (*ver secciones desarrollo larvario y metamorfosis dentro del apartado desarrollo embrionario*).

Citoarquitectura del tubo neural del anfibio adulto

Dentro del tubo nervioso podemos diferenciar entre varios tipos celulares y su disposición a lo largo del eje anteroposterior del tubo neural varia definiendo distintas regiones. En general, podemos dividir el tubo neural en 4 grandes porciones. La más anterior que contiene la vesícula cerebral, la zona intermedia o región intercalar según Lacalli i Wicht, la zona caudal y el cordón espinal.

5) La vesícula cerebral

La vesícula cerebral, a su vez se subdivide en dos porciones diferenciadas en su citoarquitectura, la más anterior (vesícula anterior), se identifica fácilmente por la presencia del ojo frontal, en la parte más rostral del tubo neural, que posee una acumulación de un pigmento oscuro caracterizado como melanina (Vopalensky et al., 2012). La cavidad ventricular en esta zona es peculiar por su forma de pera, por su alta población de cilios y por abrirse al exterior a través del rudimento del neuroporo. El suelo está compuesto por una matriz compacta de células en disposición columnar, y el techo es mucho más liviano y menos prominente. A nivel de la entrada del 2º par de nervios dorsales (el primer par genuinamente dorsal) y coincidiendo con el límite caudal de la vesícula cerebral *per se*, en posición ventromedial, se sitúa el órgano infundibular que consiste en varias líneas de células endodimales especializadas que secretan fibra de Reissner que fluye por el canal central del tubo neural hasta la ámpula terminal.

En la porción posterior a la vesícula anterior, o región de transición según Castro 2015, o subdivisión anterior de la zona intercalar de Ekhart, el ventrículo empieza a estrecharse y las paredes laterales del tubo neural tienden a encontrarse en la línea media. La parte anterior de esta subdivisión la marca la presencia de una línea transversa de células inusualmente grandes, ciliadas, con pliegues laterales que hacen contacto con las neuronas adyacentes. La porción basal de éste complejo está completamente embebida en la parte más anterior de la comisura ventral y recibe axones ascendentes desde las células lamelares (células fotoreceptoras ciliares). A esta estructura se le atribuyen funciones de reloj circadiano (Schomerus et al., 2008; Wicht et al., 2010) y órgano de balance (Ekhart et al., 2003; Lacalli et al., 1994). En la línea media dorsal de la zona de transición el espacio ventricular está plagado de procesos intraventriculares procedentes de las células fotoreceptoras del cuerpo lamelar. Además aparecen de manera escasa las columnas axiales formadas por células de Joseph que aumentarán en número en regiones más caudales. También empiezan a ser conspicuas en esta zona las células sensoriales primarias de Retzius que se distribuyen mayoritariamente en la región dorsal de ésta, y del resto del tubo neural,

Anexo A2

en muchos casos situadas justo por debajo de las células de Joseph (Castro et al., 2015). Las células bipolares de Retzius forman bandas dorsales con mayor presencia cerca de las entradas de los nervios dorsales de forma asimétrica, con notable mayor presencia en los pares izquierdos 3º a 7º debido a la asimetría producida por la inervación del aparato oral. Las células bipolares de Retzius del cordón espinal han sido ampliamente comparadas con las células de tipo Rohon-Beard, neuronas sensoriales primarias, presentes en el cordón espinal de larvas de pez, anfibios y lampreas, involucradas en el reflejo sensorimotor, en asociación con neuronas internunciales y motoneuronas, de la misma manera que ha sido descrito en larvas de anfibio (Castro et al., 2015; Thurston C Lacalli and Kelly, 2003; Lacalli, 2003). Además, exclusivamente en esta región del tubo neural existen 2 grupos celulares que se desprenden de la capa que delimita el ventrículo (ependimal) y migran integrándose en la materia blanca. Bajo la expansión del canal central en la región ventral se sitúan las células del grupo migrador anteroventral y, bilateralmente, en las zonas dorsolaterales de la materia blanca encontramos las del grupo migrador anterolateral (avm y alm, respectivamente por Ekhardt (2003).

6) Zona intermedia

La zona intermedia se extiende desde la entrada del 3º nervio dorsal izquierdo, en el miosepto que comparten los miómeros 1 y 2 del lado izquierdo, hasta la entrada del 4º nervio dorsal izquierdo, es decir, la extensión del segundo miómero izquierdo trasladada al tubo neural. En esta región, el reminiscente lumen ventricular dorsal desaparece, las células de Joseph se vuelven más numerosas e incluso forman un capuchón en la parte dorsal del tubo neural (Ekhardt et al., 2003). Las células de Joseph son las células ocelares de los órganos de Hesse, fotorreceptores rhabdoméricas sensibles a la depolarización de la luz, que expresan melanopsina y Gq (Koyanagi and Terakita, 2008). Por otra parte, la densidad general en neuronas decrece en esta región pero éstas son más grandes en tamaño, muchas de ellas transluminales, que envían procesos a ambos lados del tubo neural, y otras que no

atraviesan el lumen, como las células de Edinger y las motoneuronas. Las células de Edinger son interneuronas GABAérgicas que se disponen a nivel ventral del tubo neural y que son muy abundantes en la región caudal (cordón espinal) (Anadón et al., 1998) y más bien escasas pero presentes en la zona intermedia (Castro et al., 2015).

Las motoneuronas somáticas son neuronas que no presentan procesos transluminales y que envían procesos ipsilaterales exclusivamente (T C Lacalli and Kelly, 2003), de la misma manera que en vertebrados. Se originan en la región ventral de la placa neural y en anfibios adultos se posicionan más dorsalmente, a diferencia de las motoneuronas de vertebrados que se encuentran en regiones ventrolaterales como resultado de migraciones y crecimiento secundario del tubo neural (Castro et al., 2015).

7) Zona caudal

La zona caudal se identifica por la aparición del núcleo de Rhode en la región ventral del tubo neural, a la altura del inicio del miómero 3 y se extiende hasta el correspondiente final del miómero 4, extensiones extrapoladas al tubo neural. Además a esta altura, el tubo neural se protruye ventrolateralmente, a la derecha de la notocorda, en una estructura denominada *infundíbulo*, que contacta con la fosa de Hatschek, que es clásicamente propuesta como el homólogo para la adenohipófisis de vertebrados, tanto por su carácter endocrino como por su conexión con el *infundíbulo* que se propone, por extensión, como el homólogo a la neurohipófisis de vertebrados al corresponderse con el sitio de liberación de neurohormonas (Gorbman et al., 1999; Nozaki and Gorbman, 1992). El núcleo de Rhode ha sido propuesto como el productor de esas neurohormonas debido a la abundancia de cuerpos de Nissl en sus citoplasmas (Ekhart et al., 2003).

8) Cordón espinal

El inicio del cordón espinal se determina por la presencia de la primera célula gigante de Rhode y podemos subdividir el cordón espinal por su citoarquitectura particular en tres grandes regiones.

Anexo A2

La más anterior equivalente a los miómeros 5 a 11, se caracteriza por la presencia de las previamente mencionadas células de Rhode, cuyos axones forman fibras gigantes y están relacionadas con informaciones de tipo motor, y además en esta zona es también notable la presencia de los órganos fotoreceptores de Hesse. En la zona intermedia, que coincide aproximadamente con la extensión de las gónadas, de los miómeros 12 a 38, no se aprecian células de Rhode y la densidad de los órganos de Hesse decrece notablemente. En la zona posterior del cordón espinal, desde el atrio poro (entre los miómeros 38 y 40) hasta el último par nervioso, el 65º, que sale del tubo neural caudalmente al último miómero (el 63 en *B. lanceolatum*). En ésta zona incrementa el número de órganos de Hesse y reaparecen las células de Rhode.

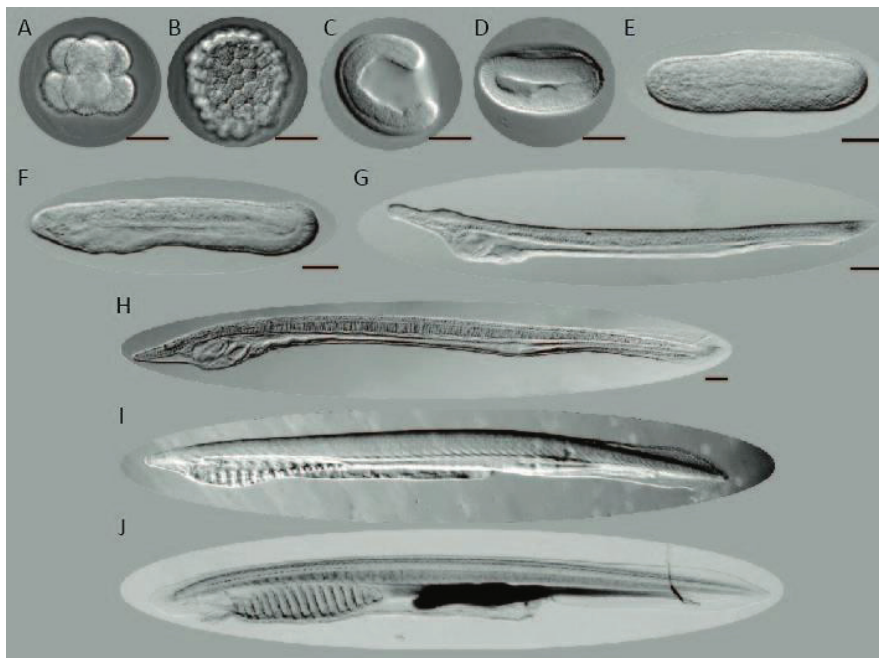
Desarrollo embrionario

Referencias generales: (Jefferies, 1986)(Bertrand and Escrivà, 2011)

Segmentación y gastrulación

La fecundación en el anfioxo sucede al anochecer, en días señalados de su época reproductiva, cuando se induce el desove. El huevo del anfioxo mide entre 100 y 120µm y es isolecítico. La membrana vitelina del oocito, el córion, se hincha al ser fecundado, indicando la correcta formación del cigoto. Las primeras divisiones son holoblásticas, o divisiones totales, y hasta el estadio de 128 células, en la séptima división, la segmentación es radial y sincrónica, de la misma forma que se da en equinodermos. A partir de la octava división empieza la blastulación, formándose una blástula esférica y hueca, donde la capa celular que rodea la cavidad blastocélica es monoepitelial. Al iniciarse la gastrulación, la blástula pierde su forma esférica y se aplana ligeramente por uno de sus polos, el vegetal, que empieza a invaginar progresivamente formándose la gástrula. La capa invaginada va creciendo hacia el interior de la cavidad blastocélica a medida que ésta desaparece. Al final de la gastrulación el embrión consta de dos capas celulares íntimamente unidas, dejando una cavidad central denominada arquéteron, futuro sistema digestivo, que se comunica con el exterior a través del pequeño blastoporo que, además, determina la parte posterior del embrión. La capa

interna de la gástrula o mesendodermo se diferenciará en: el mesodermo, que formarán la notocorda y los somitas; y el endodermo. Las células de la capa externa desarrollan cilios que le permiten a la gástrula tardía moverse, girando sobre sí misma, dentro del corion. Hasta el estadio de gástrula, el desarrollo del anfióxico es en términos generales, típico de deuteróstomos invertebrados. Sin embargo, a partir de la neurulación el desarrollo pasa a ser más similar al de los vertebrados, con la aparición de un cordón nervioso dorsal, una notocorda y bloques musculares segmentados o somitas (Holland and Holland, 1999).



Neurulación

La rotura del corion y la eclosión del embrión le permite empezar a nadar libremente gracias a los cilios que

posee en la epidermis. La neurulación, o formación del tubo

FiguraA2.3. Desarrollo embrionario de *Branchiostoma lanceolatum*. A, estadio 8 células, 2hpf. B, Blástula, 5hpf. C, Gástrula, 10hpf. D, Néurula temprana, 15hpf. E, Néurula tardía, 24hpf. F, Larva pre-apertura de boca, 36hpf. G, Larva con una hendidura faríngea, 72hpf. H, Larva con cuatro hendiduras faríngeas, 4-5 spf. I, Larva empezando la metamorfosis, 10-12spf. J, Larva al finalizar la metamorfosis 12-13spf. hpf: horas post fertilización. spf: semanas post fertilización. Barras de escala = 50µm. Modificado de (Bertrand and Escrivà, 2011).

neural, empieza con un ligero aplastamiento dorsal de la gástrula. El hundimiento del neuroectodermo, en forma de V, va creciendo en sentido postero-anterior, a la vez que el embrión se va alargando. En la base del surco nervioso de la placa neural, ya determinada, se podrá identificar la parte más ventral del tubo neural, el suelo de la placa, de la misma manera que ocurre en vertebrados. A medida

Anexo A2

que la neurulación avanza, se produce el cierre del tubo neural, gracias a la extensión de los bordes de la placa neural, que suben hasta encontrarse y fusionarse formando un tubo. Seguidamente una capa de ectodermo empieza a recubrir al tubo nervioso, progresando desde la parte posterior a la anterior, dejando una pequeña abertura en el extremo más anterior llamada neuroporo. En este punto, el blastoporo está cubierto externamente por el ectodermo, permaneciendo como una vía de comunicación del arquenteron, o canal neuroentérico. Solapadamente, la placa cordomesodérmica, que forma el techo del arquenteron, se evagina formando tres interdigitaciones: una central, que dará lugar al primordio de la notocorda y dos laterales, que serán el primordio de los primeros somitas. Estos somitas se forman por un proceso llamado enterocelia, es decir, por la evaginación del arquenteron, mientras que los somitas que se formarán más tarde, y que ocuparán casi la totalidad del cuerpo del embrión, se formarán por esquizocelia, a partir del primordio de la cola (*tail bud*), un proceso más común en vertebrados. La parte más ventral del epitelio del arquenteron se dobla sobre sí misma para formar el tubo digestivo, incluyendo la faringe y otros derivados endodérmicos.

Desarrollo larvario

En el estadio de larva en el anfibio son destacables la forma corporal alargada, cilíndrica y comprimida lateralmente; el cuerpo claramente regionalizado en cabeza, área faríngea, tronco y cola; y la posesión de cuatro epitelios potencialmente formadores de órganos, el epidérmico, el neural, el mesodérmico y el endodérmico, todos ellos situados alrededor de un eje destacado, la notocorda.

Curiosamente, las larvas de anfibio son asimétricas en el eje derecha-izquierda. La boca se abre por primera vez en el lado izquierdo, producto del engrosamiento en la parte ventral de la pared izquierda del arquenteron que se fusiona con el epitelio subyacente. Además, los somitas del lado izquierdo están adelantados aproximadamente medio somita de medida respecto al lado derecho (Minguillón y García-Fernández, 2002), lo que provocará que los miotomos del adulto estén también desfasados. El engrosamiento de la parte ventral

derecha del arquéteron da lugar a la glándula *cup-shaped*, que aunque se desarrolla en el lado derecho, se abre al exterior por el lado izquierdo de la larva. Anterior a ésta se forma el endostilo, debido a un sobrecrecimiento de la parte anterior de la región faríngea. Es en esta etapa del desarrollo que se forman también los primordios de la fosa de *Hatschek* y del *wheel organ*, que en el adulto se encuentran localizados en el interior del espacio bucal. Además se forman las hendiduras branquiales primarias, por el engrosamiento de la línea media ventral del arquéteron a la altura del tercer par de somitas. En la línea media, la notocorda se elonga hasta alcanzar su posición definitiva en el extremo más rostral del cuerpo, y el tubo neural se ensancha progresivamente en su parte más rostral para formar la vesícula cerebral.

Metamorfosis

Durante la metamorfosis tiene lugar la redistribución de gran parte de los órganos y resulta en un individuo juvenil prácticamente simétrico. La aparición de las hendiduras branquiales secundarias, marca el inicio de la metamorfosis. Ya en el adulto se forman las hendiduras branquiales terciarias, que se sitúan a ambos lados del animal, manteniendo la simetría. El reposicionamiento de la boca, que migra desde el lado izquierdo a una posición medioventral, es otro de los fenómenos más destacables de la metamorfosis del anfiexo. También el ano migra desde el lado derecho situándose también en un plano ventral medio. La larva postmetamórfica es totalmente simétrica, a excepción de los miotomos y las inserciones de los nervios en el tubo neural (ver sección: nervioso).

Bibliografía

- Anadón, R., Adrio, F., Rodríguez-Moldes, I., 1998. Distribution of GABA immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of amphioxus (*branchiostoma lanceolatum pallas*). *J. Comp. Neurol.* 401, 293–307. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19981123)401:3<293::AID-CNE1>3.0.CO;2-F
- Azariah, J., 1974. Studies on the cephalochordates of the Madras coast. 16. A theory of structural stabilization. *Acta Histochem.* 50, 62–74.
- Benito-Gutiérrez, E., Weber, H., Bryant, D.V., Arendt, D., 2013. Methods for generating year-round access to amphioxus in the laboratory. *PLoS One* 8, e71599. doi:10.1371/journal.pone.0071599
- Bertrand, S., Escrivà, H., 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: amphioxus. *Development* 138, 2639–2648. doi:10.1242/dev.085464
- Blair, J.E., Hedges, S.B., 2005. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2275–2284. doi:10.1093/molbev/msi225
- 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*. doi:10.1002/cne.
- Davidson, E.H., Erwin, D.H., 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* 311, 796–800. doi:10.1126/science.1113832
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D., Philippe, H., 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439, 965–968. doi:10.1038/nature04336
- Delsuc, F., Tsagkogeorga, G., Lartillot, N., Philippe, H., 2008. Additional molecular support for the new chordate phylogeny. *Genesis* 46, 592–604. doi:10.1002/dvg.20450
- Ekhart, D., Korf, H.W., Wicht, H., 2003. Cytoarchitecture, Topography, and Descending Supraspinal Projections in the Anterior Central Nervous System of *Branchiostoma lanceolatum*. *J. Comp. Neurol.* 466, 319–330. doi:10.1002/cne.10803
- Fuentes, M., BENITO, E., BERTRAND, S., PARIS, M., MIGNARDOT, A., GODOY, L., JIMENEZ-DELGADO, S., OLIVERI, D., CANDIANI, S., HIRSINGER, E., D'ANIELLO, S., PASCUAL-ANAYA, J., MAESO, I., PESTARINO, M., Vernier, P., NICOLAS, J., SCHUBERT, M., LAUDET, V., GENEVIERE, A.M., ALBALAT, R., GARCIA, J., HOLLAND, N.D., ESCRIVA, H., 2007. Insights Into Spawning Behavior and Development of the European Amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 308, 484–493. doi:10.1002/jez.b.
- Fuentes, M., Schubert, M., Dalfo, D., Candiani, S., Benito, E., Gardenyes, J., Godoy, L., Moret, F., Illas, M., Patten, I., Permanyer, J., Oliveri, D., Boeuf, G., Falcon, J., Pestarino, M., Fernandez, J.G., Albalat, R., Laudet, V., Vernier, P., Escrivà, H., 2004. Preliminary observations on the spawning conditions of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) in captivity. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 302, 384–391. doi:10.1002/jez.b.20025
- Gorbman, a, Nozaki, M., Kubokawa, K., 1999. A brain-Hatschek's pit connection in amphioxus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 251–4. doi:10.1006/gcen.1998.7193
- Hartenstein, V., 2006. Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 677–712. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093317
- Holland, L.Z., Albalat, R., Azumi, K., Benito-Gutiérrez, E., Blow, M.J., Bronner-Fraser, M., Brunet, F., Butts, T., Candiani, S., Dishaw, L.J., Ferrier, D.E.K., García-Fernández, J., Gibson-Brown, J.J., Gissi, C., Godzik, A., Hallböök, F., Hirose, D., Hosomichi, K., Ikuta, T., Inoko, H., Kasahara, M., Kasamatsu, J., Kawashima, T., Kimura, A., Kobayashi, M., Kozmik, Z., Kubokawa, K., Laudet, V., Litman, G.W., McHardy, A.C., Meulemans, D., Nonaka, M., Oliński, R.P., Pancer, Z., Pennacchio, L.A., Pestarino, M., Rast, J.P., Rigoutsos, I., Robinson-Rechavi, M., Roch, G., Saiga, H., Sasakura, Y., Satake, M., Satou, Y., Schubert, M., Sherwood, N., Shiina, T., Takatori, N., Tello, J., Vopalensky, P., Wada, S., Xu, A., Ye, Y., Yoshida, K., Yoshizaki, F., Yu, J.-K., Zhang, Q., Zmasek, C.M., de Jong, P.J., Osoegawa, K., Putnam, N.H., Rokhsar, D.S., Satoh, N., Holland, P.W.H., 2008. The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res.* 18, 1100–11. doi:10.1101/gr.073676.107
- Holland, L.Z., Holland, N.D., 1999. Chordate origins of the vertebrate central nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 596–602. doi:10.1016/S0959-4388(99)00003-3
- Huang, S., Chen, Z., Yan, X., Yu, T., Huang, G., Yan, Q., Pontarotti, P.A., Zhao, H., Li, J., Yang, P., Wang, R., Li, R., Tao, X., Deng, T., Wang, Y., Li, G., Zhang, Q., Zhou, S., You, L., Yuan, S., Fu, Y., Wu, F., Dong, M., Chen, S., Xu, A., 2014. Decelerated genome evolution in modern vertebrates revealed by analysis of multiple lancelet genomes. *Nat. Commun.* 5, 5896. doi:10.1038/ncomms6896
- Jefferies, R.P.S. 1932-, 1986. *The ancestry of the vertebrates* /. Cambridge University Press.
- Koyanagi, M., Terakita, A., 2008. Gq-coupled rhodopsin subfamily composed of invertebrate visual pigment and melanopsin. *Photochem. Photobiol.* 84, 1024–1030. doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00369.x
- Kučera, T., Strilić, B., Regener, K., Schubert, M., Laudet, V., Lammert, E., 2009. Ancestral vascular lumen formation via basal cell surfaces. *PLoS One* 4. doi:10.1371/journal.pone.0004132

- Lacalli, T.C., 2003. Ventral neurons in the anterior nerve cord of amphioxus larvae. II. Further data on the pacemaker circuit. *J. Morphol.* 257, 212–8. doi:10.1002/jmor.10133
- Lacalli, T.C., Holland, N.D., West, J.E., 1994. Landmarks in the Anterior Central Nervous System of Amphioxus Larvae. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 344, 165–185. doi:10.1098/rstb.1994.0059
- Lacalli, T.C., Kelly, S.J., 2003. Sensory pathways in amphioxus larvae II . Dorsal tracts and transluminal cells 13, 1–13.
- Lacalli, T.C., Kelly, S.J., 2003. Ventral neurons in the anterior nerve cord of amphioxus larvae. I. An inventory of cell types and synaptic patterns. *J. Morphol.* 257, 190–211. doi:10.1002/jmor.10114
- Li, G., Shu, Z., Wang, Y., 2013. Year-Round Reproduction and Induced Spawning of Chinese Amphioxus, *Branchiostoma belcheri*, in Laboratory. *PLoS One* 8, e75461. doi:10.1371/journal.pone.0075461
- Li, G., Yang, X., Shu, Z., Chen, X., Wang, Y., 2012. Consecutive spawnings of Chinese amphioxus, *Branchiostoma belcheri*, in captivity. *PLoS One* 7, e50838. doi:10.1371/journal.pone.0050838
- Moller, P.C., Philpott, C.W., 1973. The circulatory system of Amphioxus (*Branchiostoma floridae*). I. Morphology of the major vessels of the pharyngeal area. *J. Morphol.* 139, 389–406. doi:10.1002/jmor.1051390403
- Muñoz-Chápuli, R., Carmona, R., Guadix, J. a., Macías, D., Pérez-Pomares, J.M., 2005. The origin of the endothelial cells: An evo-devo approach for the invertebrate/vertebrate transition of the circulatory system. *Evol. Dev.* 7, 351–358. doi:10.1111/j.1525-142X.2005.05040.x
- Nohara, M., Nishida, M., Mantchacitra, V., Nishikawa, T., 2004. Ancient phylogenetic separation between Pacific and Atlantic cephalochordates as revealed by mitochondrial genome analysis. *Zoolog. Sci.* 21, 203–210. doi:10.2108/zsj.21.203
- Nozaki, M., Gorbman, A., 1992. The Question of Functional Homology of Hatschek's Pit of Amphioxus (*Branchiostoma belcheri*) and the Vertebrate Adenohypophysis (Endocrinology). *Zoolog. Sci.* 9, 387–395.
- Oulion, S., Bertrand, S., Belgacem, M.R., Le Petillon, Y., Escriva, H., 2012. Sequencing and analysis of the mediterranean amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) transcriptome. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0036554
- Pascual-anaya, J., Albuixech-crespo, B., Somorjai, I.M.L., Carmona, R., Oisi, Y., Alvarez, S., Kuratani, S., Muñoz-Chápuli, R., Garcia-Fernández, J., Lara, M., Susana, A., 2013. The evolutionary origins of chordate hematopoiesis and vertebrate endothelia. *Dev. Biol.* 375, 182–92. doi:10.1016/j.ydbio.2012.11.015
- Putnam, N.H., Butts, T., Ferrier, D.E.K., Furlong, R.F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J.-K., Benito-Gutiérrez, E.L., Dubchak, I., Garcia-Fernández, J., Gibson-Brown, J.J., Grigoriev, I. V., Horton, A.C., de Jong, P.J., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kohara, Y., Kuroki, Y., Lindquist, E., Lucas, S., Osoegawa, K., Pennacchio, L. a., Salamov, A. a, Satou, Y., Sauka-Spengler, T., Schmutz, J., Shin-I, T., Toyoda, A., Bronner-Fraser, M., Fujiyama, A., Holland, L.Z., Holland, P.W.H., Satoh, N., Rokhsar, D.S., 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453, 1064–71. doi:10.1038/nature06967
- Rähr, H., 1981. The ultrastructure of the blood vessels of *Branchiostoma lanceolatum* (Pallas) (Cephalochordata) - II. Blood vessels of the caudal region. *Zoomorphology* 97, 297–308. doi:10.1007/BF00310282
- Schomerus, C., Korf, H.-W., Laedtke, E., Moret, F., Zhang, Q., Wicht, H., 2008. Nocturnal behavior and rhythmic period gene expression in a lancelet, *Branchiostoma lanceolatum*. *J. Biol. Rhythms* 23, 170–181. doi:10.1177/0748730407313363
- Somorjai, I., Bertrand, S., Camasses, A., Haguenaer, A., Escriva, H., 2008. Evidence for stasis and not genetic piracy in developmental expression patterns of *Branchiostoma lanceolatum* and *Branchiostoma floridae*, two amphioxus species that have evolved independently over the course of 200 Myr. *Dev. Genes Evol.* 218, 703–13. doi:10.1007/s00427-008-0256-6
- Vopalensky, P., Pergner, J., Liegertova, M., Benito-Gutierrez, E., Arendt, D., Kozmik, Z., 2012. Molecular analysis of the amphioxus frontal eye unravels the evolutionary origin of the retina and pigment cells of the vertebrate eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 15383–8. doi:10.1073/pnas.1207580109
- Weinstein, B.M., 1999. A PEER REVIEWED FORUM What Guides Early Embryonic Blood Vessel Formation ? *Dev. Dyn.* 11, 2–11.
- Wicht, H., Laedtke, E., Korf, H.W., Schomerus, C., 2010. Spatial and temporal expression patterns of *Bmal* delineate a circadian clock in the nervous system of *Branchiostoma lanceolatum*. *J. Comp. Neurol.* 518, 1837–1846. doi:10.1002/cne.22306
- Xavier-Neto, J., Castro, R. a., Sampaio, a. C., Azambuja, a. P., Castillo, H. a., Cravo, R.M., Simões-Costa, M.S., 2007. Parallel avenues in the evolution of hearts and pumping organs. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 719–734. doi:10.1007/s00018-007-6524-1
- Yu, J.K., Wang, M.C., Shin-I, T., Kohara, Y., Holland, L.Z., Satoh, N., Satou, Y., 2008. A cDNA resource for the cephalochordate amphioxus *Branchiostoma floridae*. *Dev. Genes Evol.* 218, 723–727. doi:10.1007/s00427-008-0228-x



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/developmentalbiology

The evolutionary origins of chordate hematopoiesis and vertebrate endothelia

Juan Pascual-Anaya^{a,b,*}, Beatriz Albuixech-Crespo^a, Ildikó Maureen Lara Somorjai^{a,1}, Rita Carmona^c, Yasuhiro Oishi^{b,d}, Susana Álvarez^e, Shigeru Kuratani^b, Ramón Muñoz-Chápuli^c, Jordi Garcia-Fernández^{a,**}

^a *Departament de Genètica and Institut de Biomedicina (IBUB), University of Barcelona, Av. Diagonal, 643, 08028 Barcelona, Spain*

^b *Laboratory for Evolutionary Morphology, RIKEN Center for Developmental Biology, 2-2-3 Minatojima-minamimachi, 650-0047 Kobe, Japan*

^c *Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, University of Málaga, Campus de Teatinos, s/n, 29071 Málaga, Spain*

^d *Department of Biology, Graduate School of Science, Kobe University, Kobe, Japan*

^e *Department of Organic Chemistry, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, Pontevedra, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2012

Received in revised form

16 November 2012

Accepted 19 November 2012

Keywords:

Amphioxus
Hematopoiesis
Evo-devo
Endothelium
VEGFR-2/Flk-1
Scf/Tal-1

ABSTRACT

The vertebrate circulatory system is the most complex vascular system among those of metazoans, with key innovations including a multi-chambered heart and highly specialized blood cells. Invertebrate vessels, on the other hand, consist of hemal spaces between the basal laminae of epithelia. How the evolutionary transition from an invertebrate-type system to the complex vertebrate one occurred is, however, poorly understood. We investigate here the development of the cardiovascular system of the cephalochordate amphioxus *Branchiostoma lanceolatum* in order to gain insight into the origin of the vertebrate cardiovascular system. The cardiac markers *Hand*, *Csx* (*Nkx2-5*) and *Tbx4/5* reveal a broad cardiac-like domain in amphioxus; such a decentral organization during development parallels that seen in the adult anatomy. Our data therefore support the hypothesis that amphioxus never possessed a proper heart, even transiently during development. We also define a putative hematopoietic domain, supported by the expression of the hematopoietic markers *Scf* and *Pdvegrf*. We show that this area is closed to the dorsal aorta anlagen, partially linked to excretory tissues, and that its development is regulated by retinoic acid, thus recalling the aorta-gonads-mesonephros (AGM) area of vertebrates. This region probably produces *Pdvegrf*⁺ hemal cells, with an important role in amphioxus vessel formation, since treatments with an inhibitor of PDGFR/VEGFR lead to a decrease of Laminin in the basal laminae of developing vessels. Our results point to a chordate origin of hematopoiesis in an AGM-like area from where hemal *Pdvegrf*⁺ cells are produced. These *Pdvegrf*⁺ cells probably resemble the ancestral chordate blood cells from which the vertebrate endothelium later originated.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The vertebrate circulatory system, despite its high level of specialization and physiological relevance, nevertheless remains poorly understood, both in terms of its origin and its evolutionary transition from invertebrate hemal systems. Invertebrate hemal systems are usually composed of a network of cavities located

between the basal laminae of epithelia (Ruppert and Carle, 1983). Frequently, these epithelia contain myofilaments and are contractile, contributing to the circulation of the hemal fluid. In these animals, the pumping organ is a specialized peristaltic vessel composed of myoepithelial cells. However, in vertebrates the endothelial cells delimit the vascular lumen and the heart is a multilayered and multi-chambered muscular organ. Although there exist important differences between the cellular elements involved in cardiovascular development of vertebrate and invertebrate phyla, a common basic gene network has been identified (Davidson and Erwin, 2006), suggesting that the extant circulatory systems and pumping organs of very diverged animals share a common evolutionary origin (Xavier-Neto et al., 2007). However, the evolutionary steps leading to the acquisition of complex vertebrate cardiovascular systems remain to be elucidated (Muñoz-Chápuli and Pérez-Pomares, 2010; Pérez-Pomares et al., 2009; Simões-Costa et al., 2005).

* Corresponding author at: RIKEN Center for Developmental Biology, Laboratory for Evolutionary Morphology, Minatojima-minami 2-2-3, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan. Fax: +81 78 306 3064.

** Corresponding author. Fax: +34 93 403 4420.
E-mail addresses: jpascualanaya@gmail.com (J. Pascual-Anaya), jordigarcia@ub.edu (J. Garcia-Fernández).

¹ Present address: The Scottish Oceans Institute, University of St. Andrews, East Sands, St Andrews, Fife, KY16 8LB Scotland, UK.

0012-1606/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.11.015>

Please cite this article as: Pascual-Anaya, J., et al., The evolutionary origins of chordate hematopoiesis and vertebrate endothelia. Dev. Biol. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.11.015>



Evolution of Developmental Control Mechanisms

The evolutionary origins of chordate hematopoiesis and vertebrate endothelia

Juan Pascual-Anaya^{a,b,*}, Beatriz Albuixech-Crespo^a, Ildikó Mauren Lara Somorjai^{a,1}, Rita Carmona^c, Yasuhiro Oisi^{b,d}, Susana Álvarez^e, Shigeru Kuratani^b, Ramón Muñoz-Chápuli^c, Jordi García-Fernández^{a,**}

^a Departament de Genètica and Institut de Biomedicina (IBUB), University of Barcelona, Av. Diagonal, 643, 08028 Barcelona, Spain

^b Laboratory for Evolutionary Morphology, RIKEN Center for Developmental Biology, 2-2-3 Minatogima-minamimachi, 650-0047 Kobe, Japan

^c Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, University of Málaga, Campus de Teatinos, s/n, 29071 Málaga, Spain

^d Department of Biology, Graduate School of Science, Kobe University, Kobe, Japan

^e Department of Organic Chemistry, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, Pontevedra, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2012

Received in revised form

16 November 2012

Accepted 19 November 2012

Available online 27 November 2012

Keywords:

Amphioxus
Hematopoiesis
Evo-devo
Endothelium
VEGFR-2/Flk-1
Scl/Tal-1

ABSTRACT

The vertebrate circulatory system is the most complex vascular system among those of metazoans, with key innovations including a multi-chambered heart and highly specialized blood cells. Invertebrate vessels, on the other hand, consist of hemal spaces between the basal laminae of epithelia. How the evolutionary transition from an invertebrate-type system to the complex vertebrate one occurred is, however, poorly understood. We investigate here the development of the cardiovascular system of the cephalochordate amphioxus *Branchiostoma lanceolatum* in order to gain insight into the origin of the vertebrate cardiovascular system. The cardiac markers *Hand*, *Csx* (*Nkx2-5*) and *Tbx4/5* reveal a broad cardiac-like domain in amphioxus; such a decentralized organization during development parallels that seen in the adult anatomy. Our data therefore support the hypothesis that amphioxus never possessed a proper heart, even transiently during development. We also define a putative hematopoietic domain, supported by the expression of the hematopoietic markers *Scl* and *Pdvegfr*. We show that this area is closed to the dorsal aorta anlagen, partially linked to excretory tissues, and that its development is regulated by retinoic acid, thus recalling the aorta-gonads-mesonephros (AGM) area of vertebrates. This region probably produces *Pdvegfr*⁺ hemal cells, with an important role in amphioxus vessel formation, since treatments with an inhibitor of PDGFR/VEGFR lead to a decrease of Laminin in the basal laminae of developing vessels. Our results point to a chordate origin of hematopoiesis in an AGM-like area from where hemal *Pdvegfr*⁺ cells are produced. These *Pdvegfr*⁺ cells probably resemble the ancestral chordate blood cells from which the vertebrate endothelium later originated.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The vertebrate circulatory system, despite its high level of specialization and physiological relevance, nevertheless remains poorly understood, both in terms of its origin and its evolutionary transition from invertebrate hemal systems. Invertebrate hemal systems are usually composed of a network of cavities located

between the basal laminae of epithelia (Ruppert and Carle, 1983). Frequently, these epithelia contain myofilaments and are contractile, contributing to the circulation of the hemal fluid. In these animals, the pumping organ is a specialized peristaltic vessel composed of myoepithelial cells. However, in vertebrates the endothelial cells delimit the vascular lumen and the heart is a multilayered and multi-chambered muscular organ. Although there exist important differences between the cellular elements involved in cardiovascular development of vertebrate and invertebrate phyla, a common basic gene network has been identified (Davidson and Erwin, 2006), suggesting that the extant circulatory systems and pumping organs of very diverged animals share a common evolutionary origin (Xavier-Neto et al., 2007). However, the evolutionary steps leading to the acquisition of complex vertebrate cardiovascular systems remain to be elucidated (Muñoz-Chápuli and Pérez-Pomares, 2010; Pérez-Pomares et al., 2009; Simões-Costa et al., 2005).

* Corresponding author at: RIKEN Center for Developmental Biology, Laboratory for Evolutionary Morphology, Minatogima-minami 2-2-3, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan. Fax: +81 78 306 3064.

** Corresponding author. Fax: +34 93 403 4420.

E-mail addresses: jpascualanaya@gmail.com (J. Pascual-Anaya), jordigarcia@ub.edu (J. García-Fernández).

¹ Present address: The Scottish Oceans Institute, University of St. Andrews, East Sands, St Andrews, Fife, KY16 8LB Scotland, UK.

Hematopoiesis, the process that gives rise to the different blood cell lineages from hematopoietic stem cells (HSCs), generally takes place concomitantly with cardiovascular development. HSCs are responsible for maintenance and self-renewal of all blood cells in vertebrates (reviewed by Orkin and Zon 2008). During vertebrate ontogeny, hematopoiesis occurs first in the so-called blood islands (Galloway and Zon, 2003), situated in the extraembryonic tissues surrounding the yolk sac (or equivalent regions depending on the animal group), whereas in the embryo proper it occurs first in the aorta-gonads-mesonephros (AGM) region (Godin and Cumano, 2002; Robin et al., 2003). Members of the PDGFR/VEGFR (especially *VEGFR-2/Flk-1*) (Kattman et al., 2006) subfamily, as well as other tyrosine kinase receptors and the transcription factors SCL/TAL-1 and GATA1-3 (Gering et al., 1998; Pimanda et al., 2007) have a crucial function in hematopoiesis (reviewed by Cumano and Godin 2007). They are important elements of a gene regulatory network playing a key role in the determination of mouse HSCs in the yolk sac, in the AGM and in the fetal liver. Later in development, the endothelial lineage is marked by *VEGFR-2/Flk-1*, in contrast to the hematopoietic lineage. It is believed that both lineages originate from the same cellular progenitors, the hemangioblasts (Ema et al., 2003). Although the molecular mechanisms underlying hematopoiesis have been widely studied in vertebrate embryos and in embryonic stem cells, little is known about its evolutionary origin.

From an evolutionary point of view, three key issues are (i) the transition from the invertebrate to the vertebrate cardiovascular system, (ii) the evolutionary relationship between vertebrate and invertebrate hematopoiesis and (iii) the origin of vertebrate endothelium from invertebrate-type hemal cells. The cephalochordate amphioxus is placed in a key phylogenetic position to understand the origin of chordates (Bertrand and Escriva, 2011), as it represents the sister group of the tunicate-vertebrate clade (Delsuc et al., 2006). Amphioxus possesses a closed hemal system; the anatomical distribution of the main vessels and the direction of flow of hemal fluid (backwards dorsally and forwards ventrally) are reminiscent of those in the vertebrate embryo (Rähr, 1979). However, as has been widely described in the literature, adult amphioxus do not have a proper heart from a morphological point of view (Fig. 1), and the hemal fluid circulates by the contraction of several main vessels (depicted in Fig. 1) (Franz, 1927; Moller and Philpott, 1973; Rähr, 1981; Randall and

Davie, 1980; Ruppert, 1997). However, if amphioxus develops a heart during development that is secondarily lost in the adult still remains to be investigated. As in other invertebrates, the contractile capacities of these vessels are due to myofilaments arranged basally in the coelomic epithelia (Moller and Philpott, 1973). Free hemal cells have been described within and lining the lumen of amphioxus vessels in some regions (Kučera et al., 2009; Rhodes et al., 1982). Kučera et al., (2009) described a possible role of these cells in the degradation of the extracellular matrix to open the vessel lumen, where Laminin is one of the main components. However, as in other invertebrates, a true endothelium is absent.

In order to better understand the transition from an invertebrate-type to a vertebrate hematopoietic and vascular system, we have analyzed a number of hematopoietic and cardiac markers in embryos of the European amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. Several cardiac markers have been previously studied in the Floridian amphioxus *Branchiostoma floridae*, although in some cases in a limited developmental window, such as *BMP2/4* (Panopoulou et al., 1998), *Csx* (*Nkx2.5/tinman*) and *Hand* (Holland et al., 2003; Onimaru et al., 2011), and partially *Tbx4/5* (Horton et al., 2008; Minguillon et al., 2009), leading to different conclusions. While Panopoulou et al., 1998 proposed the endostylar artery as a vertebrate heart homologue, Holland et al. (2003) proposed so for the subintestinal vessel. Furthermore, Onimaru et al. (2011) have suggested a separation of the amphioxus ventral mesoderm into an anterior pharyngeal domain and a posterior cardiac domain. Here, we study and extend the expression patterns of the cardiac markers *Csx* (*Nkx2.5/tinman*), *Tbx4/5* and *Hand* in *B. lanceolatum*, which define a broader cardiac area than previously reported including both pharyngeal and ventral trunk mesoderm. This suggests that all developing vessels in the pharynx (e.g., endostylar artery) and the trunk (e.g., subintestinal vessel), which are indeed contractile in the adult, represent the “cardiac” domain. On the other hand, the expression of three important hematopoietic markers (*Pdvegfr*, *Scl* and *Gata1/2/3*) suggests that during development, amphioxus embryos possess a hematopoietic domain in the anterior part of the body close to the two dorsal aortas, associated with the developing excretory system and regulated by retinoic acid (RA). This hitherto undescribed domain strongly resembles the vertebrate aorta-gonads-mesonephros area. Finally, using results from experiments in which we inhibit PDVEGFR, we discuss the putative function of

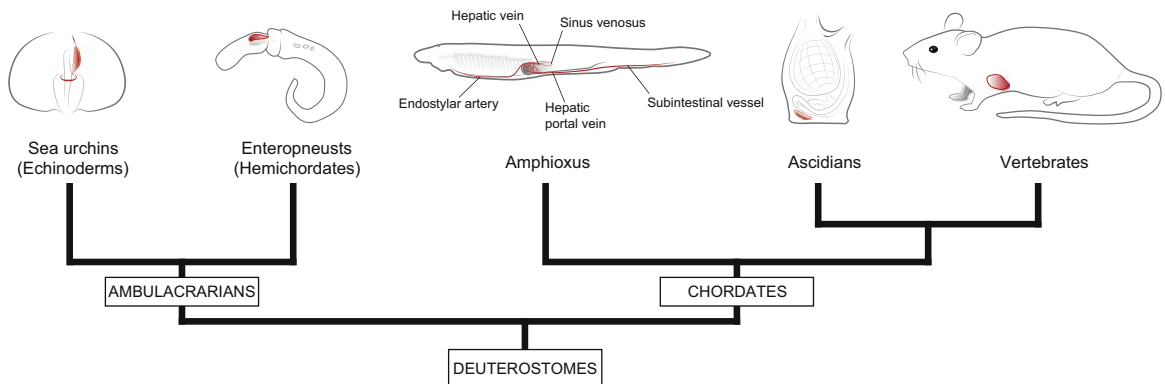


Fig. 1. Phylogenetic tree of deuterostomes depicting the heart and pumping organs. While echinoderms have a very specialized pumping organ, the axial organ, hemichordate enteropneusts have a heart–kidney complex on the rostral tip of the stomochord, in the prosome. Adult amphioxus are widely described as not possessing a proper centralized pumping organ or heart. Instead, several main vessels are contractile (labeled in the amphioxus scheme). Adult ascidians have a localized pumping vessel surrounded by a pericardium. Vertebrates possess complex chambered hearts, which represent an innovation of this group. The different pumping organs are colored in red, although the homology relationships between ambulacrarian and chordate pumping organs are still uncertain.

free *Pdvegr*⁺ hemal cells in vessel formation, and its implications for the evolutionary origin of the vertebrate endothelium.

Material and methods

Gene annotation, cloning and phylogenetic analysis

We looked for putative *Scl/Tal-1* orthologous sequences in the genome of *B. floridae* JGI v1.0 by means of tBLASTN and using aminoacidic sequences of vertebrate counterparts SCL/TAL-1 and TAL2 as queries. The corresponding genomic sequences were retrieved and a model was predicted by GeneWise2 and GeneScan, as previously described (D'Aniello et al., 2008). Only one candidate was predicted. Alignment of the sequences with vertebrate *Scl/Tal-1* orthologues was done with MAFFT multiple sequence aligner (Katoh et al., 2002). To confirm that our protein was the true *Scl* orthologue, we carried out a phylogenetic analysis: a phylogenetic tree was inferred with MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012) using two independent runs (each with four chains). Model selection was performed using ProTest (Abascal et al., 2005; Drummond, 2001; Guindon and Gascuel, 2003). The tree was considered to have converged when the standard deviation was < 0.01, and 25% of the trees were burned to generate the consensus tree.

The sequences of *B. floridae* *GATA1/2/3* and *GATA4/5/6* genes were kindly provided by Gillis et al. (2009). Primers based on *B. floridae* sequences were used to amplify a fragment of each gene from a liquid cDNA library of *B. lanceolatum* in pDNR222 (CloneMinerII kit, Invitrogen). The primers used for cloning and PCR conditions are described in Supplementary Table 1. The sequences of the clones used in this work have been submitted to the NCBI GenBank database under the accession numbers JQ942471–7, except for probes based on the exons 2a and 2b of *B. lanceolatum* *GATA4/5/6*, which were submitted to the NCBI Probe database under the accession numbers 12859234 and 12859235, respectively.

Whole mount *in situ* hybridizations and sectioning

Ripe adult amphioxus (*B. lanceolatum*) were sampled in Argelès-sur-mer, France, during the spawning season of 2009. Spawning was induced as reported in Fuentes et al. (2007) in Barcelona, Spain. After *in vitro* fertilization, embryos were cultured at 17 °C and fixed at different stages with 4% PFA in MOPS buffer overnight at 4 °C. Wholemount *in situ* hybridizations were performed as previously described (Irimia et al., 2010). Following wholemount *in situ* hybridization, embryos were embedded in Spurr's resin and sectioned with an ultramicrotome at 3 µm, as previously described (Candiani et al., 2007).

SU5416 and retinoic acid treatments

The embryos were maintained in 0.22 µm-filtered fresh seawater and were treated with different concentrations of SU5416 (Calbiochem), a permeable, ATP-competitive and selective inhibitor of tyrosine kinase receptors of the VEGFR and PDGFR family. SU5416 was dissolved in DMSO and tested at three concentrations: 0.1 µM, 1 µM and 20 µM from 8 hpf (hours post-fertilisation), using as a negative control the same amount of DMSO used in the corresponding treatment. The drug-containing seawater was changed every 24 h. The embryos were fixed for wholemount *in situ* hybridization as described above at different stages from late gastrulae until 3 day-old larvae. Retinoic acid and BMS009 treatments were performed as described in Escrivá et al. (2002), but using only a concentration of 10⁻⁶ M of all-trans retinoic acid (Sigma-Aldrich) and BMS009.

Immunohistochemistry

For immunolocalisation experiments, 5–10 animals from each of the control and treatment conditions were used in three different experiments, following previously reported procedures (Somorjai et al., 2012). Primary antibodies included α-acetylated Tubulin (1:500, Sigma), α-Laminin (1:25, rabbit anti-laminin-111, Sigma; Kučera et al., 2009) and Alexa Fluor 568 Phalloidin (1:400, Invitrogen) for F-Actin staining. DAPI was used to label nuclei (1:5000 of 5 mg/ml stock, Invitrogen). Samples were mounted in Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen), and images were acquired on a Leica SPl confocal microscope.

Quantification

Quantification of Laminin and F-Actin levels on confocal images was performed with ImageJ software ($n=5$ each DMSO and treated larvae). The RGB line profiler was used to simultaneously collect pixel intensities from all three channels. For each individual, 3–5 “lines” were profiled in equivalent posterior tail regions of control and treated larvae, when possible from different confocal sections, and the median values considered representative. In order to be able to compare across animals, Laminin values were normalized with respect to the highest value collected from the basal lamina below the epidermis (e.g., “de” or “pm” in Fig. 5E, value of 1). For F-Actin, only dorsal and ventral notochord membranes were considered, and normalization was with respect to the highest of the two. Means were compared using Welch's *t*-test statistic for unequal variances at a global $P \leq 0.5$. Comparisons were considered significant when they passed the Bonferroni correction for multiple tests at $P \leq 0.008$.

Results

Expression of cardiovascular markers in amphioxus

To better understand the development of the amphioxus vascular system, we have re-evaluated several cardiac markers in the European amphioxus *B. lanceolatum* for which expression had been reported in the Floridian amphioxus. *B. lanceolatum* *Csx* (correct naming for *Nkx2.5/tinman* after Holland et al., 2007) expression is generally comparable to that of its *B. floridae* orthologue (Holland et al., 2003). *B. lanceolatum* *Csx* expression is first detected in the right side of the pharynx and the ventral part of the first six somites (Fig. 2A and B). At the pre-mouth larval stage, it is expressed in the anlage of the subintestinal vessel in addition to the pharynx, although it is weaker in the most caudal region as compared to the expression in the Floridian amphioxus (Fig. 2C; Holland et al., 2003). As in *B. floridae*, the European amphioxus *Csx* is no longer detected in the subintestinal vessel from the second day of development onwards (Fig. 2D).

Vertebrate *Hand1* and *Hand2* are bHLH family genes with important functions in cardiac development, especially *Hand2* (McFadden et al., 2005). Amphioxus possesses only one orthologous gene (*Hand*) for both vertebrate *Hand1* and *Hand2* (Onimaru et al., 2011). Since Onimaru et al. (2011) reported the Floridian amphioxus *Hand* expression pattern in a restricted window of development, here we investigated its complete expression profile in *B. lanceolatum* (Supplementary Fig. S1). Interestingly, *B. lanceolatum* *Hand* shows clear asymmetrical expression: more anteriorly, it occurs in the right coelomic diverticulum (Fig. 2E, F, and I), and then in the ventral part of the somites, showing stronger expression in the somites on the right side until neurula stages (Fig. 2E, F, and J and Supplementary Fig. S1). Regarding its

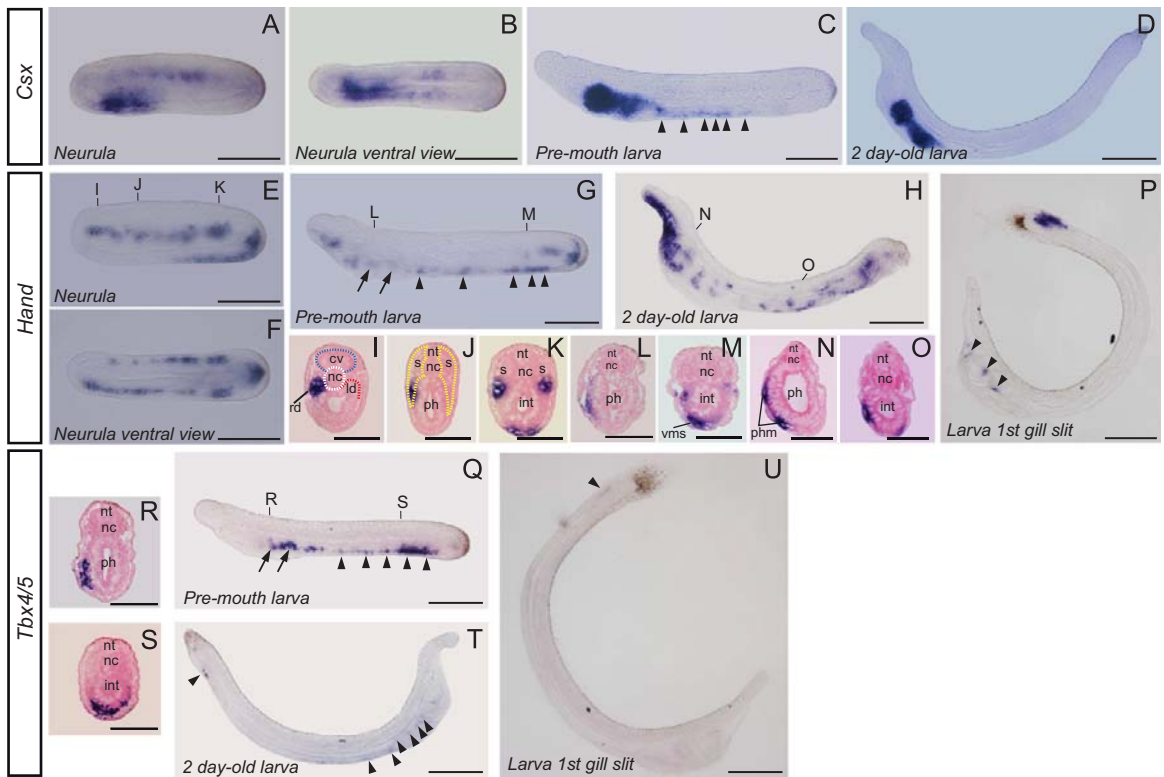


Fig. 2. Expression of cardiac marker genes during *B. lanceolatum* development. Expression patterns of *Csx* (*Nkx2.5*) (A–D), *Hand* (E–P) and *Tbx4/5* (Q–U). For whole mounts, dorsal is towards the top, except for ventral views (indicated), and anterior is towards the left (except in panels T and U, where anterior is to the right). In transverse sections, the view is from the anterior part of the embryo, with dorsal towards the top, and embryo's right towards the left. Scale bars, 100 μ m in wholemounts and 50 μ m in sections. *Csx* is first expressed in the pharyngeal endoderm and somites (A and B), mainly on the right side (B). Later, *Csx* is expressed by mesothelial cells in the subintestinal vessel anlage (C, arrowheads), although it is no longer expressed there at later stages (D). At the neurula stage, *Hand* is asymmetrically expressed in the ventral half of the somites (E, F, J, and K) and in the right diverticulum (F and I). It is also expressed in posterior-ventral ectoderm and posterior mesothelial cells of the subintestinal vessel (E and K). In pre-mouth larvae, it is expressed in the pharyngeal mesoderm (G, arrows, and L for section) and more clearly in the ventral mesoderm in the presumptive subintestinal vessel (arrowheads in G, and M for section; vms, ventral mesoderm). Somitic expression is restricted to the posterior part at later stages (G and H). In larvae (H), expression in the pharyngeal mesoderm (phm) and mesothelial cells of the subintestinal vessel is still detected (H, N and O), unlike *Hand* (D). However, eventually it is restricted to some cells in the pharyngeal mesoderm (arrowheads) and the posterior tip of the subintestinal vessel and endoderm (P). *Tbx4/5* is first detected in pre-mouth larvae (Q) in both ventral pharyngeal mesoderm (arrows) and subintestinal mesothelial cells (arrowheads), similarly to *Csx* and *Hand*. This expression is clear in sections (R and S). *Tbx4/5* expression decreases progressively, although it is still detectable in the pharynx and subintestinal vessel in 2 day-old larvae (T) and finally is reduced to the very posterior tip of the subintestinal vessel (U, arrowhead).

possible cardiac function, we detected expression in both ventral and posterior parts of ectoderm and mesoderm (Fig. 2K), in a domain surrounding the coelomic space where the anlage of the subintestinal vessel will later open. This represents an early expression domain not detected in the previous report for *B. floridae* (Onimaru et al., 2011). Subsequently, as in *B. floridae*, European amphioxus *Hand* is expressed in the ventral mesoderm, not only in the anlage of the subintestinal vessel, but also in the pharyngeal mesoderm of pre-mouth and 2 day-old larvae (Fig. 2G, H, and L–O), as can be clearly observed in sections of the pharyngeal region (Fig. 2L and N). *Hand* is expressed until 84 h post-fertilization (hpf) in *B. lanceolatum*, and its expression is detected in the very posterior part of the subintestinal vessel, the posterior part of the hindgut, and in a few cells in the pharynx and pre-oral pit (Fig. 2P).

The T-box containing gene *Tbx5* is crucial for heart development in vertebrates (Naiche et al., 2005). The amphioxus orthologue *Tbx4/5* has also been related to cardiac development by its expression in the most posterior part of the subintestinal vessel, although only in very late larval stages (Horton et al., 2008;

Minguillon et al., 2009). We investigated the expression pattern of this gene in earlier stages of *B. lanceolatum* and detected a previously unreported expression pattern in the pharyngeal and ventral mesoderm of pre-mouth larvae (Fig. 2Q–S). This expression pattern of *Tbx4/5* at the pre-mouth larval stage is similar to those of *Hand* and *Csx* (compare Fig. 2C, G and Q). *Tbx4/5* expression subsequently weakens through development, and in 2 day-old larvae, is restricted to the most caudal portion of the subintestinal vessel, as well as to a few scattered cells in the pharynx (Fig. 2T). At 84 h of development, only a weak expression in the posterior part of the subintestinal vessel persists, expression that coincides with that previously reported (Horton et al., 2008; Minguillon et al., 2009). Again, as for *Hand*, *Tbx4/5* is clearly expressed in the pharyngeal mesoderm (Fig. 2R, compare with 2L). Therefore, the pharyngeal mesoderm likely develops into cardiac elements, as well as the rest of the ventral mesoderm.

We further investigated other important orthologous amphioxus counterparts of vertebrate cardiac genes, including *B. lanceolatum* *Islet* and *GATA4/5/6*. As for *Islet*, our results in *B. lanceolatum* confirm previous reports in *B. floridae*; namely, its

lack of expression in the cardiac domain (Supplementary Fig. S2 and see Jackman et al., 2000). We also investigated the expression of two isoforms of amphioxus *GATA4/5/6* (Gillis et al., 2009) and, interestingly, neither of them were detected in the ventral mesoderm (see Supplementary Fig. S3 for the complete expression pattern).

Expression of hematopoietic markers during amphioxus development

In vertebrates, the genes *Scl/Tal-1*, encoding a bHLH transcription factor, and *VEGFR-2 (Flk-1)*, encoding a member of the PDGFR/VEGFR family of RTKs, are necessary players for the generation of HSCs (Mead et al., 2001; Shalaby et al., 1995). In a previous study in amphioxus, we identified only one member of the PDGFR/VEGFR subfamily: *Pdvegfr* (D'Aniello et al., 2008). Herein, we have also identified a single orthologue in the amphioxus genome corresponding to *Scl/Tal-1*, *Tal-2* and *lyl-1* vertebrate paralogs, which we name *Scl*. Amino acidic multiple sequence alignment and phylogenetic analysis clearly show that the amphioxus protein we have identified is a clear orthologue of the vertebrate *Tal-1/Tal-2/Lyl-1* family (Supplementary Figs. S4 and S5). The expression patterns of amphioxus *Pdvegfr* and *Scl* genes are very similar during the ontogeny of amphioxus, starting to be expressed in two anterior, bilateral and slightly asymmetrical groups of mesodermal cells, with the left signal located more anteriorly (Fig. 3A and M). Strikingly, this bilateral mesodermal expression is very similar to that found in vertebrates, such as zebrafish embryos (Gering et al., 1998). Sections of embryos at this stage show that both genes co-localized in the same domains (Fig. 3D, E, O and P). The topographical position of the left signal corresponds, at least in part, to the developing Hatschek's nephridium (HN), which is a mesodermal tissue localized between somites 1 and 2 (identified as 2 and 3 in Goodrich, 1934, since Goodrich interpreted the anterior most coelomic diverticula as somites). To confirm that this left signal corresponds properly to the HN, we used the amphioxus orthologue of *Pax2/5/8*, a marker of the HN (Kozmik et al., 1999; Somorjai et al., 2008). Double single-stained *in situ* hybridization using both *Pax2/5/8* and *Pdvegfr* shows that the left *Pdvegfr* signal coincides with that of *Pax2/5/8* in the HN (Fig. 3T and U). Thus, this result indicates that *Pdvegfr* and *Scl* are expressed in one of the developing excretory organs of amphioxus.

Later in development, at the pre-mouth larval stage, single cells expressing both *Pdvegfr* and *Scl* can be progressively detected in most posterior parts throughout the right side (Fig. 3B, N and AA and AB for a ventral view). In zebrafish, the early expression of *Scl* is also posteriorly extended during development (Gering et al., 1998). As in the neurula stage, the most anterior expression of both *Pdvegfr* and *Scl* corresponds to the left side, and seems to have been enlarged medially following the outline between the gut and the notochord, in a region where the dorsal aorta (split in two branches in the anterior region; Ruppert, 1997) will develop (Fig. 3F and Q). Similarly, the right signal is also located close to the presumptive dorsal aorta, and it expands ventro-laterally into the mesoderm of the pharynx (Fig. 3G and R). The most posterior cells seem to have migrated caudally through the pharyngeal mesoderm (Fig. 3H and S), which is strongly displaced to the right in amphioxus larvae, probably due to the specific morphological features associated with larval amphioxus' feeding behaviour (van Wijhe, 1919). Amphioxus *Scl* and *Pdvegfr* are most likely co-expressed from neurula to pre-mouth larval stages (Fig. 3A, B, M and N). However, *Scl* expression is no longer detected in 2 day-old larvae, while at this stage, *Pdvegfr* expression is also detected in the club-shaped gland (Fig. 3I) and in isolated, scattered cells distributed along the main body axis in both dorsal aorta and subintestinal vessel anlagen (Fig. 3C, I-L).

The narrow, elongated morphology of these cells suggest that they might be migrating, and probably originate in more anterior regions (inset in Fig. 3C).

During vertebrate development, *GATA1-3* genes are also essential players in hematopoiesis (Cumano and Godin, 2007). In vertebrates, *GATA1-3* genes are not only specifically expressed by the HSCs, but also by the surrounding mesenchyme (Cumano and Godin, 2007). In amphioxus, the single orthologue *GATA1/2/3* (Gillis et al., 2009) is broadly expressed in the anterior part of the embryo, except in the ectoderm and neural plate (Fig. 3V and W); in the posterior half of the embryo, *GATA1/2/3* is only expressed in the ventral part of the somites. In pre-mouth larvae, the expression is slightly more restricted, with expression in both the right and left anterior coelomic diverticula, in the club-shaped gland, endostyle and pharynx, and in the surrounding mesoderm (Fig. 3X). However, from the mid- to posterior pharynx, the expression becomes restricted to the right side (Fig. 3Y). Comparison of ventral views of the *GATA1/2/3* and *Pdvegfr/Scl* patterns suggests that the latter are enclosed in the wider domain of the former (Fig. 3Y, AA and AB). Eventually, *GATA1/2/3* expression becomes highly reduced in this presumptive hematopoietic area, coinciding with the lack of expression of *Scl*. It is strongly expressed in the anterior right coelomic cavity, preoral pit and pharynx, and faintly where *Pdvegfr* is detected (compare Fig. 3C and Z, white arrowheads).

Retinoic acid treatment severely inhibits hematopoiesis in amphioxus embryos

Retinoic acid (RA) signaling plays a crucial role in the determination of the HSCs in vertebrates. In zebrafish, RA treatment inhibits early hematopoiesis (de Jong et al., 2010), and the same effect is seen in mouse embryonic stem cells (Szatmari et al., 2010). Thus, we investigated if RA treatment (see Material and methods) had a similar effect on the *Pdvegfr*⁺/*Scl*⁺ cells, strong candidates for hematopoietic cells in amphioxus. In RA-treated embryos the expression of both *Pdvegfr* and *Scl* is not detected in either neurula or in pre-mouth stages when compared with the DMSO-treated control embryos (Fig. 4A–D and G–J). In 2 day-old larvae, the small population of *Pdvegfr*⁺ cells in the reduced pharynx is detected as in the control, but putative migrating cells of the dorsal aorta and subintestinal vessel anlage are drastically reduced (Supplementary Fig. S6A). This expression even disappears in approximately the third part of the treated larvae (Supplementary Fig. S6B). Thus, these results suggest a function of RA in the determination of the *Pdvegfr*⁺/*Scl*⁺ cell population in amphioxus. In contrast, the RA-antagonist BMS009 had no effect in the determination and development of this putative haematopoietic tissue (Fig. 4E, F, K and L).

Inhibition of PDVEGFR leads to posterior defects in the amphioxus larva

In order to assess if these *Pdvegfr*⁺ cells have a function in vessel development, as *VEGFR-2*⁺ cells (endothelial cells) do in vertebrate angiogenesis and vasculogenesis, we treated amphioxus embryos with SU5416, a specific inhibitor of PDGFR and VEGFR, (see Material and methods). This drug specifically acts by blocking the cross-phosphorylation of tyrosine residues of these receptors. Continuous treatment from early stages, since before *Pdvegfr* starts to be expressed, causes the posterior part of the embryos to hook from the pre-mouth larval stage onwards, an effect that becomes stronger in later stages (Supplementary Fig. S7). This effect has a high penetrance, with almost 100% of the embryos affected.

The curly-tail phenotype obtained upon inhibition of PDGFR/VEGFR may result from a variety of defects in morphogenesis. For instance, it could indicate a problem with elongation of the notochord, maturation of muscle fibres, or subintestinal vessel forma-

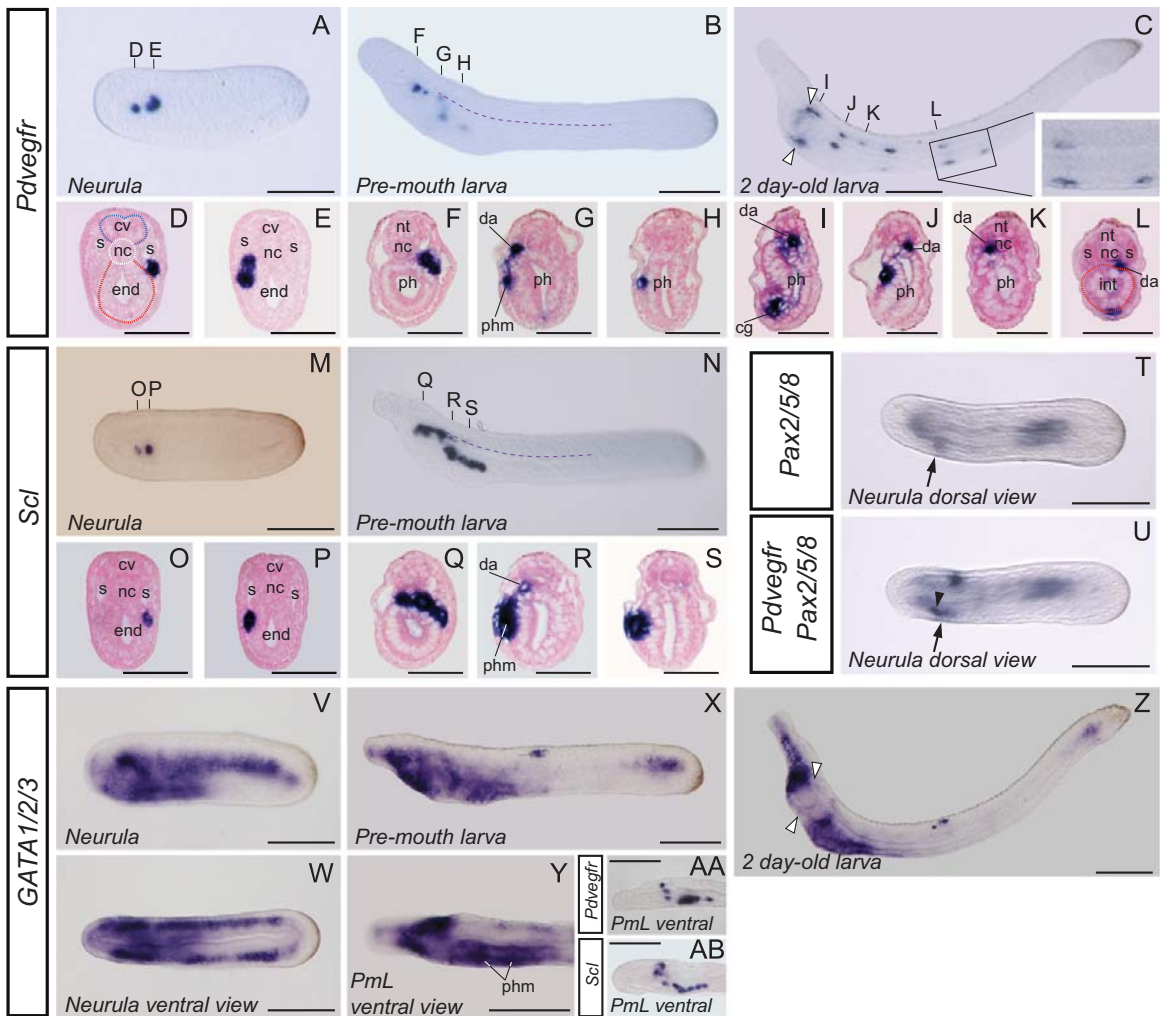


Fig. 3. Expression of hematopoietic marker genes in amphioxus. Expression patterns of *Pdvgr* (A–L and AA), *Scl* (M–S and AB) and *Gata1/2/3* (V–Z). For whole mounts, dorsal is towards the top, except for ventral views (indicated), and anterior is towards the left. In transverse sections, the view is from the anterior part of the embryo, with the embryo's right towards the left. Scale bars, 100 μ m in whole mounts and 50 μ m in sections. *Pdvgr* and *Scl* are expressed in the same tissues at early stages (A, D, E, M, O and P, respectively). On the left side, both *Pdvgr* and *Scl* are expressed in Hatschek's nephridium (D and O, respectively), and on the right side, in a region of mesodermal origin between the somites (s) and the endoderm (end), likely the glomus anlage (E and P). In pre-mouth larvae (B and N), *Pdvgr* and *Scl* are detected between the notochord (nc), pharynx (ph) and somites in what is the dorsal aorta anlage (dashed, purple lines in B and N; F, G, Q and R for sections), and are expanded posterior-ventrally along the pharyngeal mesoderm (phm; G, H, R and S). In 2 day-old larvae (C), *Scl* is no longer detected, and *Pdvgr* is expressed in the club-shaped gland (cg; I); *Pdvgr*⁺ cells are detected in both anterior branches of the dorsal aorta (I–L) and the subintestinal vessel (L). These scattered cells present an elongated shape typical of migrating cells (C, inset). Comparison of *Pax2/5/8* expression (T) with that of *Pdvgr* in a double *in situ* hybridization (U) shows that the left signal of *Pdvgr* (darker, arrowhead) partially overlaps with the expression of *Pax2/5/8* (lighter, arrow) in the Hatschek's nephridium, while the right signal is more posterior (arrowhead). *GATA1/2/3* is expressed in both right and left coelomic diverticula, the club-shaped gland, the endostyle and the pharynx, and in the surrounding mesoderm (V–Z). At early stages, it is expressed in the ventral half of all somites (V), and at later stages this domain is restricted posteriorly (X and Z). The expression in pharyngeal mesoderm is restricted to the right side (Y) engulfing *Pdvgr*⁺/*Scl*⁺ cells (compare ventral views in V, AA and AB). In 2 day-old larvae, expression is faintly detected where anterior *Pdvgr*⁺ cells are located (white arrowheads in Z; compare with C). cv, cerebral vesicle; cg, club-shaped gland; da, dorsal aorta; end, endoderm; int, intestine; nc, notochord; nt, neural tube; ph, pharynx; PmL, Pre-mouth larva; s, somites.

tion posteriorly. In order to begin to distinguish among these possibilities, we performed immunohistochemistry using a variety of antibodies. Comparing SU5416-treated larvae at 55 h with age-matched controls revealed no major morphogenetic or cytological defects at multiple levels. First, acetylated Tubulin expression shows that both epidermal and intestinal cilia appear grossly normal. Moreover, the axons of the neural tube extend posteriorly similarly in control and SU5416-treated embryos (Fig. 5A, A' and

Supplementary Fig. S8). Second, our results using Phalloidin staining of F-actin suggest that blocking PDVEGFR causes no overt defects in notochord formation or muscle differentiation (Fig. 5B, C'). The superficial longitudinal muscle fibers extend to their attachment sites at the edges of the myomeres equally well in treated and control larvae (Fig. 5B, B'). We also found no significant difference in the number of somites formed ($n=5$, mean 14.33 vs. 14.8, 2-tailed t -test, $P=0.4558$). Finally, we also saw no apparent differences in

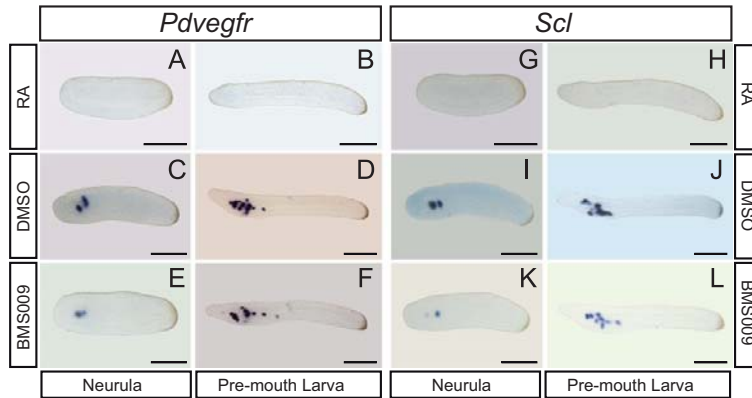


Fig. 4. Effects of RA and BMS009 treatment on hematopoietic tissues during amphioxus development. Excess RA blocks the expression of amphioxus *Pdvegfr* (A–C) and *Scl* (G and H), in comparison to control DMSO-treated embryos (D–F, I and J, respectively). The expression of *Pdvegfr* is detected neither at neurula (A) nor at pre-mouth larva (B) stages. It is only detected at the 2 day-old larval stage (C), and almost no positive cells (arrowheads) are found in the subintestinal vessel or dorsal aorta. *Scl*⁺ cells are not detected at any stage in RA-treated embryos (G and H). Scale bars, 100 μ m.

Laminin expression at the somite level between DMSO and SU5416-treated larvae (Fig. 5B, B'). Although we cannot exclude fine structural differences in treated and untreated larvae, taken together our data suggest no major disruption in morphogenesis.

While we saw no gross structural defects upon blocking of PDVEGFR, careful examination of Laminin staining revealed a strong reduction in the posterior tail, specifically in the hooked region (Fig. 5C, C'). Quantification of Laminin levels showed a highly statistically significant reduction in the basal lamina of SU5416-treated larvae in only three regions (Fig. 5D and E): dorsal to the intestine ($t=5.00$, $df=7$, $P=0.0016$), ventral to the intestine ($t=6.71$, $df=7$, $P=0.0003$) and in the visceral coelomic epithelia ($t=6.07$, $df=5$, $P=0.0018$). The former is part of the dorsal aorta, while the two latter define the subintestinal vessel. However, no differences were found in F-Actin in equivalent locations dorsal and ventral to the notochord. This suggests a specific defect in dorsal aorta and subintestinal vessel formation, and perhaps of basal lamina deposition processes, after blocking PDVEGFR signalling.

Discussion

The core of a gene regulatory network controlling the early development of the vertebrate heart and of the pumping organs of invertebrates appears to be deeply conserved, since orthologous genes, namely *Hand*, *Nkx2-5* and *Tbx* family genes, play crucial roles in their formation (Davidson and Erwin, 2006; Olson, 2006). Despite this 'deep homology' (Shubin et al., 2009), the specific functions of these genes in vertebrates and invertebrates are distinct, and both clades have likely undergone independent, parallel modifications of the gene regulatory network, leading to particular innovations in their respective circulatory systems (Medioni et al., 2009; Xavier-Neto et al., 2007). Therefore, understanding the formation of the cardiovascular and blood systems in the closest invertebrate relatives to vertebrates, such as cephalochordates, may shed light on the evolutionary changes that led to the origin of the complex vertebrate circulatory system.

Amphioxus possesses a decentralized cardiac domain

It is likely that the ancestral condition of the pumping organs resembled a simple contractile tube, with hemal spaces opening between the endodermal and visceral coelomic epithelia (Xavier-Neto et al., 2007). The pumping function of this primitive heart was

probably a co-option of the function of the visceral coelomic myoepithelium for intestinal peristalsis (Pérez-Pomares et al., 2009).

Among the contractile vessels of amphioxus, either the subintestinal or the endostylar vessels have been claimed to be homologous to the vertebrate heart, based on only one vertebrate cardiac marker, *Csx* (*Nkx2-5*) (Holland et al., 2003), or on the expression of the growth factor *BMP2/4* (Panopoulou et al., 1998), respectively. However, a distinct morphological heart in adult amphioxus does not exist. This lack of a heart in the adult could originate during development in two ways: either the heart is formed at some early developmental stage, and is secondarily lost; or, alternatively, it never develops, and cardiac ontogeny would then also be decentralized (i.e., not restricted to a specific area). Although similarity of gene expression does not necessarily imply homology, the co-localization of *Hand* and *Csx* in the coelomic epithelium under the gut and, importantly, also in the pharyngeal mesoderm (Fig. 2C and G; see Onimaru et al., 2011, for *B. floridae*) indicates that the amphioxus cardiac domain is not restricted but decentralized. The new expression pattern of *Tbx4/5* reported here (Fig. 2Q–U) in these tissues strongly supports this hypothesis. Thus, at the pre-mouth larval stage, a cardiac domain appears to be characterized by some of the molecular players involved in vertebrate cardiogenesis, namely *Tbx4/5*, *Hand* and *Csx* (*Nkx2.5*). Other members of the T-box containing family have also been associated with a cardiovascular function, such as *Tbx20*, whose expression in amphioxus resembles that of the markers studied here (Belgacem et al., 2011). It is therefore remarkable that adult pharyngeal vessels and those more linked to the gut are all contractile, and derived from the embryonic pharyngeal and ventral trunk mesoderm. Interestingly, the expression of other important orthologous genes of vertebrate cardiac markers, such as *Islet* and *GATA4/5/6* (Supplementary Figs. S2 and S3), do not co-localize with *Csx*, *Hand* or *Tbx4/5*. However, in *Ciona intestinalis*, one GATA factor has been implicated in cardiovascular determination, *GATAa* (Ragkousi et al., 2011), and *Islet* is expressed in a population resembling a secondary heart field (Stolfi et al., 2010). Whether the absence of cardiac expression of *GATA4/5/6* and *Islet* in amphioxus is associated with its cardiac 'decentralization' remains to be investigated. Taken together, our results suggest that the cardiac domain of amphioxus, unlike that found in other chordates, is not restricted to a unique contractile vessel as previously suggested (Holland et al., 2003; Panopoulou et al., 1998). Since the relationships between the chordate heart and the heart–kidney complex/axial organ of ambulacrarians

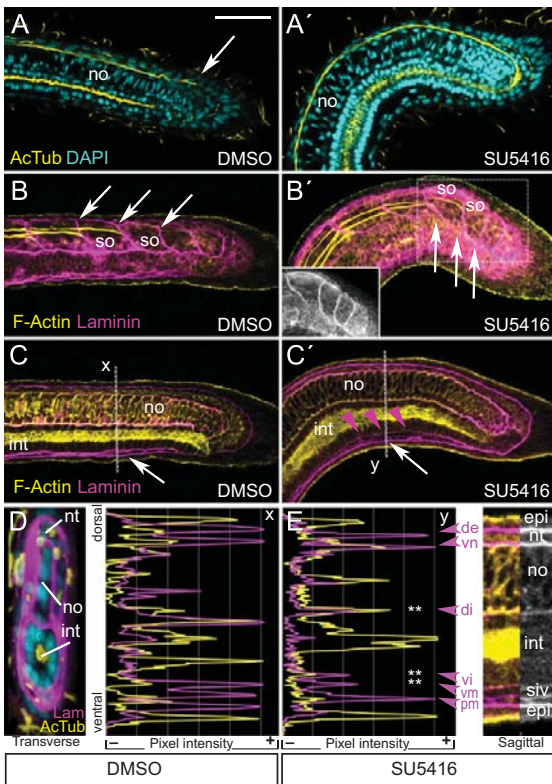


Fig. 5. PDGFR/VEGFR inhibitor SU5416 reduces Laminin expression posteriorly. No overt defects are evident in the axons of the neural tube as revealed by acetylated Tubulin staining (arrows in A, A'). At the level of the somites (so), Laminin appears normal in both DMSO (B) and SU5416-treated (B' and inset) larvae, as do the maturing muscle fibres (yellow, F-Actin). More medially, in spite of the curled tail, the notochord (no) and intestine (int) are also largely unaffected in treated (C') vs. control (C) animals, as evidenced by Phalloidin and Laminin staining. However, postero-ventrally, at the level of the subintestinal vessel (white arrows), SU5416-treated larvae show reduced Laminin levels (magenta arrowheads) that are not apparent in DMSO-treated controls. Quantification of levels of expression of Laminin in control (D, right, level x in C) compared to treated (E, left, level y in C') larvae reveals a specific reduction in the basal lamina of the dorsal intestine epithelium (di), where the dorsal aorta is located, and in both ventral intestine epithelium (vi) and visceral mesothelium (vm), which together delimit the subintestinal vessel (siv). White asterisks, $P \leq 0.0018$ with Welch's *t*-test. No differences were observed in the dorsal basal lamina (de) between the epidermis (epi) and the neural tube (nt), in that ventral to the neural tube (vn), or in the parietal mesothelium (pm) located between the subintestinal vessel and the epidermis (detail, E right). Yellow and magenta represent F-Actin and Laminin, respectively, unless otherwise noted. Scale bar, 50 μ m.

(hemichordates and echinoderms) have not yet been clarified (Xavier-Neto et al., 2010), we cannot establish if the lack of a central pumping organ in amphioxus is a derived morphological characteristic.

Hematopoiesis in amphioxus is carried out in an AGM-like area

Although blood cells have been identified in a wide range of invertebrates (Hartenstein, 2006), how these cells are determined and whether this process is similar or not to vertebrate hematopoiesis are still obscure. For instance, it has been reported that hematopoiesis in the lymph gland of *Drosophila* is similar to that occurring in the AGM of vertebrates (Mandal et al., 2004). However, although some of the genetic elements are the same,

probably belonging to an ancient gene regulatory network (Davidson and Erwin, 2006), the anatomy of the process in *Drosophila* is essentially different from that of vertebrates, and key factors like the *Drosophila* *GATA1/2/3* orthologue *grain* (Gillis et al., 2008) or *Scl* are not expressed in the cardiogenic mesoderm. Thus, the similarities between the cardiogenic mesoderms of *Drosophila* and vertebrates are rather superficial and are likely not homologous (Medioni et al., 2009).

Studies in closer relatives of vertebrates may shed light on the hitherto obscure origin and evolution of vertebrate hematopoiesis. We have found here only one amphioxus orthologue for the vertebrate paralogues *Scf/Tal-1*, *Tal-2* and *Lyl-1*. These genes have roles in both hematopoietic development (Ema et al., 2003; Giroux et al., 2007) and in the neural tube (Ferran et al., 2009; van Eekelen et al., 2003). In contrast, in amphioxus the expression of *Scl* is present only in mesodermal derivatives, at least in the window of development studied here. The function of *Scf/Tal-1* and *Tal-2* in the central nervous system was acquired in the vertebrate lineage, probably due to generation of new enhancers after the two rounds of whole genome duplication that took place at the origin of vertebrates (Jiménez-Delgado et al., 2009). Thus, amphioxus *Scl* is a good hematopoietic marker. Also, in a previous study (D'Aniello et al., 2008) we identified only one member of the PDGFR/VEGFR tyrosine kinase receptor family. Given that all vertebrate VEGFR members have important roles in the development of the vascular system and hematopoiesis (Otrock et al., 2007), we believe that amphioxus *Pdvegfr* is also a good marker for hematopoiesis and vessel development.

We have shown in amphioxus that early expression of these two important hematopoietic markers, *Pdvegfr* and *Scl*, occurs in two bilateral, slightly asymmetrical domains. It is probably in the neurula stage that determination of the hematopoietic domain occurs (Fig. 6A). The co-expression with the *Pax2/5/8* orthologue indicated that the left domain corresponds to the HN, which is tightly associated with the left dorsal aorta (Stach, 1998). The right domain is likely the anlage of the glomus, a highly vascularized area in the adult, formed at the rostral side of the right dorsal aorta (Franz, 1927). This common expression of hematopoietic genes in areas where excretory and vascular domains converge strongly recalls the vertebrate AGM. Moreover, it more generally highlights the close relationship between hematopoiesis and nephrogenesis in more basal vertebrates (Ma et al., 2011). Later, this hematopoietic domain slightly broadens in the pre-mouth larva, where some cells appear to have been displaced posteriorly, probably through migration, entering the cardiac domain (Fig. 6B). Meanwhile, amphioxus *GATA1/2/3* is expressed in the same area as the aforementioned factors, especially on the right side, from where the *Pdvegfr*⁺/*Scl*⁺ cells seem to start migrating caudally (Fig. 3Y, AA and AB). Importantly, *GATA-2* forms a complex with *SCL/TAL-1* in vertebrates, thereby regulating hematopoiesis (Mead et al., 2001; Pimanda et al., 2007). Therefore, we suggest that a hematopoietic process occurring in an AGM-like area was present in the last common ancestor of chordates.

A variety of studies suggest that RA is involved in HSC development in vertebrates. For instance, treatment with RA blocks primitive hematopoiesis in zebrafish and mouse, upstream of *SCL* (de Jong et al., 2010; Szatmari et al., 2010). Interestingly, in RA-treated amphioxus embryos the development of *Pdvegfr/Scf*-expressing anterior domains is highly impaired (Fig. 4 and Supplementary Fig. S6), and *Pdvegfr*⁺ cells are strongly reduced in the dorsal aorta and the subintestinal vessel, indicating that they are not very well produced or specified. Although this could be due to a loss of the hematopoietic tissues, such as the HN, the expression of *Pax2/5/8* in the HN of RA-treated embryos indicates that this is not the case (Schubert et al., 2006). Thus, not only are some important hematopoietic factors expressed in these tissues, but it is also likely

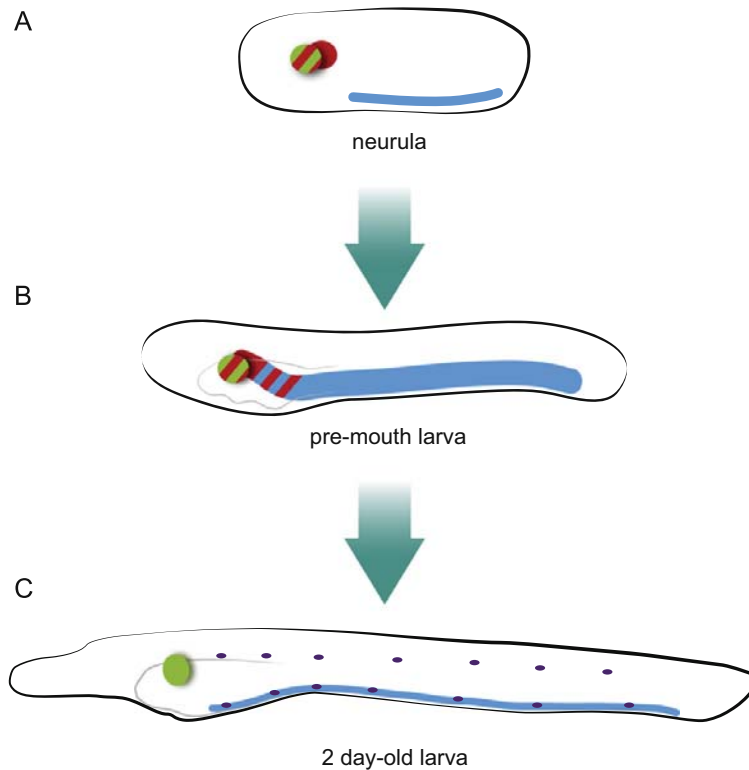


Fig. 6. Schematic representation of the development of the cardiac and hematopoietic domains in amphioxus. (A) At the neurula stage, the nephrogenic (green), hematopoietic (red) and cardiogenic (blue) domains are determined. The nephrogenic and hematopoietic domains are associated in the Hatschek's nephridium, on the left side. The cardiac domain consists of ventral mesoderm, corresponding to the subintestinal vessel anlagen. (B) At the pre-mouth larval stage, the cardiogenic mesodermic domain broadens from pharynx to tail. The hematopoietic domain expands from lateral spots to medial and more posterior cells, the latter entering into contact with the cardiac domain. (C) Finally, *Scl* expression is no longer detected, indicating that early hematopoiesis has finished, and specified *Pdvgef*⁺ hemal cells (purple) are detected in both the dorsal aorta and subintestinal vessel. These *Pdvgef*⁺ cells have an important role in the development of such vessels, and are probably similar to the invertebrate-type hemal cells from which the vertebrate endothelium originated. The cardiac vessels have already been specified, consisting of pharyngeal and subintestinal vessels. The Hatschek's nephridium is formed in the dorsal, left side of the pharynx.

that their regulation is controlled by the same players as in vertebrates. This strongly supports our hypothesis that a hematopoietic function is carried out by these tissues, and that it is homologous to that carried out in the AGM area of vertebrates.

*Vertebrate endothelial cells might have derived from ancestral free hemal *Pdvgef*⁺ cells*

The last step of our model concerns the specification of blood cells (Fig. 6C). The final piece of evidence that supports our hypothesis of a hematopoietic AGM-like area is the generation of *Pdvgef*⁺ cells scattered along the dorsal aorta and the subintestinal vessel in later stages. In vertebrates, while VEGFR-2 is an important marker of multipotent cells with hematocardiovascular specification (Kattman et al., 2006), in late development it is expressed in endothelial cells, but not in HSCs (Ishitobi et al., 2011; Yamaguchi et al., 1993). As discussed above, the early function of amphioxus *Pdvgef* in hematopoiesis is revealed by its co-expression with *Scl*. However, in 2 day-old larvae, *Scl* is not detected anymore, giving to the aforementioned hematopoietic domain a transitional nature, and *Pdvgef* is expressed in isolated cells within the amphioxus vessels. These cells may well correspond to blood cells, or amoebocytes (Muñoz-Chápuli et al., 2005), that have been specified later, as occurs in vertebrate endothelial cells. In vertebrates, VEGFR-2 has an important role in

vasculogenesis and angiogenesis. Accordingly, the inhibition of PDVEGFR by SU5416 in amphioxus embryos leads to what appears to be a vascular malformation, possibly due to defective deposition of Laminin in the vessels. Laminin is usually present in the basal lamina of the epithelia that constitute invertebrate vascular systems, including amphioxus (Kučera et al., 2009). Thus, *Pdvgef*⁺ amoebocytes likely have a function in amphioxus vessel development.

In conclusion, although cephalochordates lack endothelial cells, as do other invertebrates, these amoebocytes, originating in an AGM-like area, may be similar to the evolutionary progenitors of the vertebrate endothelium (Muñoz-Chápuli, 2011; Muñoz-Chápuli and Pérez-Pomares, 2010). Thus, the close ontogenetic relationship between endothelium and blood cells in vertebrates would be accounted for by an evolutionary relationship, i.e., the endothelial cells of vertebrates probably originated as a specialization of free blood cells, akin to the amoebocytes of amphioxus (Muñoz-Chápuli et al., 2005; Muñoz-Chápuli and Pérez-Pomares, 2010).

Acknowledgements

We thank Hector Escriva and the ASSEMBLE FP7 EU programme for providing space and support during amphioxus sampling in Laboratoire Aragó, Banyuls-sur-mer, France. The

authors are indebted to Ignacio Maeso and José L. Gómez-Skarmeta for invaluable suggestions, to Simona Candiani for kindly providing a detailed protocol of amphioxus embryo sectioning, to William Q. Gillis for providing the sequences of *GATA* factors, to Manuel Irimia and Ignacio Maeso for critical reading of the manuscript, and to Noritaka Adachi and all past members of the J.G.-F laboratory for fruitful discussions and advice. J.P.-A., B.A.-C., and J.G.-F. were funded by Grants BMC2008-03776 and BMC2011-23291 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and J.G.-F. and B.A.-C. by the ICREA Academia Prize. R.C. and R.M.-C. were supported by Grants BFU2011-25304 (Ministry of Science and Innovation), P11-CTS-7564 (Junta de Andalucía) and RD06/0010/0015 (TerCel network, ISCIII). J.P.-A. held a FI fellowship from the Generalitat of Catalunya. I.M.L.S. was funded by the European Community through a Marie Curie fellowship (7th Framework Programme FP7-People-IEF-2008).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.11.015>.

References

- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D., 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104–2105.
- Belgacem, M.R., Escande, M.L., Escrava, H., Bertrand, S., 2011. Amphioxus *Tbx6/16* and *Tbx20* embryonic expression patterns reveal ancestral functions in chordates. *Gene Expr. Patterns* 11, 239–243.
- Bertrand, S., Escrava, H., 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: amphioxus. *Development* 138, 4819–4830.
- Candiani, S., Pestarino, M., Cattaneo, E., Tartari, M., 2007. Characterization, developmental expression and evolutionary features of the huntingtin gene in the amphioxus *Branchiostoma floridae*. *BMC Dev. Biol.* 7, 127.
- Cumano, A., Godin, I., 2007. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 745–785.
- D'Aniello, S., Irimia, M., Maeso, I., Pascual-Anaya, J., Jiménez-Delgado, S., Bertrand, S., García-Fernández, J., 2008. Gene expansion and retention leads to a diverse tyrosine kinase superfamily in amphioxus. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1841–1854.
- Davidson, E.H., Erwin, D.H., 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* 311, 796–800.
- de Jong, J.L., Davidson, A.J., Wang, Y., Palis, J., Opara, P., Pugach, E., Daley, G.Q., Zon, L.L., 2010. Interaction of retinoic acid and *scf* controls primitive blood development. *Blood* 116, 201–209.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrou, D., Philippe, H., 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439, 965–968.
- Drummond, A., Strimmer, K., 2001. PAL: an object-oriented programming library for molecular evolution and phylogenetics. *Bioinformatics* 17, 662–663.
- Ema, M., Faloon, P., Zhang, W.J., Hirashima, M., Reid, T., Stanford, W.L., Orkin, S., Choi, K., Rossant, J., 2003. Combinatorial effects of *Fli1* and *Tal1* on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev.* 17, 380–393.
- Escriva, H., Holland, N.D., Gronemeyer, H., Laudet, V., Holland, L.Z., 2002. The retinoic acid signaling pathway regulates anterior/posterior patterning in the nerve cord and pharynx of amphioxus, a chordate lacking neural crest. *Development* 129, 2905–2916.
- Ferran, J.L., de Oliveira, E.D., Merchán, P., Sandoval, J.E., Sánchez-Arrones, L., Martínez-De-La-Torre, M., Puelles, L., 2009. Genoarchitectonic profile of developing nuclear groups in the chicken pretectum. *J. Comp. Neurol.* 517, 405–451.
- Franz, V., 1927. Morphologie der Akranier. *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 27, 464–692.
- Fuentes, M., Benito, E., Bertrand, S., Paris, M., Mignardot, A., Godoy, L., Jiménez-Delgado, S., Oliveri, D., Candiani, S., Hirsinger, E., D'Aniello, S., Pascual-Anaya, J., Maeso, I., Pestarino, M., Vernier, P., Nicolas, J.F., Schubert, M., Laudet, V., Genevieve, A.M., Albalat, R., García-Fernández, J., Holland, N.D., Escrava, H., 2007. Insights into spawning behavior and development of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *J. Exp. Zool. B: Mol. Dev. Evol.* 308, 484–493.
- Galloway, J.L., Zon, L.L., 2003. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* 53, 139–158.
- Gering, M., Rodaway, A.R., Göttgens, B., Patient, R.K., Green, A.R., 1998. The *SCL* gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J.* 17, 4029–4045.
- Gillis, W.Q., Bowerman, B.A., Schneider, S.Q., 2008. The evolution of protostome *GATA* factors: molecular phylogenetics, synteny, and intron/exon structure reveal orthologous relationships. *BMC Evol. Biol.* 8, 112.
- Gillis, W.Q., John, J., Bowerman, B., Schneider, S.Q., 2009. Whole genome duplications and expansion of the vertebrate *GATA* transcription factor gene family. *BMC Evol. Biol.* 9, 207.
- Giroux, S., Kaushik, A.L., Capron, C., Jalil, A., Kelaidi, C., Sablitzky, F., Dumenil, D., Albagli, O., Godin, I., 2007. *lyl-1* and *tal-1/scf*, two genes encoding closely related bHLH transcription factors, display highly overlapping expression patterns during cardiovascular and hematopoietic ontogeny. *Gene Expr. Patterns* 7, 215–226.
- Godin, I., Cumano, A., 2002. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 593–604.
- Goodrich, E.S., 1934. The early development of the nephridia in amphioxus: introduction and part I, Hatschek's nephridium. *Q. J. Microsc. Sci.* 75, 723–734.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- Hartenstein, V., 2006. Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 677–712.
- Holland, N.D., Venkatesh, T.V., Holland, L.Z., Jacobs, D.K., Bodmer, R., 2003. *AmphNk2-tin*, an amphioxus homeobox gene expressed in myocardial progenitors: insights into evolution of the vertebrate heart. *Dev. Biol.* 255, 128–137.
- Holland, P.W., Booth, H.A., Bruford, E.A., 2007. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biol.* 5, 47.
- Horton, A.C., Mahadevan, N.R., Minguillon, C., Osoegawa, K., Rokhsar, D.S., Ruvinsky, I., de Jong, P.J., Logan, M.P., Gibson-Brown, J.J., 2008. Conservation of linkage and evolution of developmental function within the *Tbx2/3/4/5* subfamily of T-box genes: implications for the origin of vertebrate limbs. *Dev. Genes Evol.* 218, 613–628.
- Irimia, M., Piñeiro, C., Maeso, I., Gómez-Skarmeta, J.L., Casares, F., García-Fernández, J., 2010. Conserved developmental expression of *Fezf* in chordates and *Drosophila* and the origin of the *Zona Limitans Intrathalamica* (ZLI) brain organizer. *Evodevo* 1, 7.
- Ishitobi, H., Wakamatsu, A., Liu, F., Azami, T., Hamada, M., Matsumoto, K., Kataoka, H., Kobayashi, M., Choi, K., Nishikawa, S., Takahashi, S., Ema, M., 2011. Molecular basis for *Fli1* expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse. *Development* 138, 5357–5368.
- Jackman, W.R., Langeland, J.A., Kimmel, C.B., 2000. *islet* reveals segmentation in the amphioxus hindbrain homolog. *Dev. Biol.* 220, 16–26.
- Jiménez-Delgado, S., Pascual-Anaya, J., García-Fernández, J., 2009. Implications of duplicated cis-regulatory elements in the evolution of metazoans: the DDI model or how simplicity begets novelty. *Brief. Funct. Genomic Proteomic* 8, 266–275.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066.
- Kattman, S.J., Huber, T.L., Keller, G.M., 2006. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev. Cell* 11, 723–732.
- Kozmik, Z., Holland, N.D., Kalousova, A., Paces, J., Schubert, M., Holland, L.Z., 1999. Characterization of an amphioxus paired box gene, *AmphiPax2/5/8*: developmental expression patterns in optic support cells, nephridium, thyroid-like structures and pharyngeal gill slits, but not in the midbrain-hindbrain boundary region. *Development* 126, 1295–1304.
- Kučera, T., Strlič, B., Regener, K., Schubert, M., Laudet, V., Lammert, E., 2009. Ancestral vascular lumen formation via basal cell surfaces. *PLoS One* 4, e4132.
- Ma, D., Zhang, J., Lin, H.F., Italiano, J., Handin, R.L., 2011. The identification and characterization of zebrafish hematopoietic stem cells. *Blood* 118, 289–297.
- Mandal, L., Banerjee, U., Hartenstein, V., 2004. Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat. Genet.* 36, 1019–1023.
- McFadden, D.G., Barbosa, A.C., Richardson, J.A., Schneider, M.D., Srivastava, D., Olson, E.N., 2005. The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development* 132, 189–201.
- Mead, P.E., Deconinck, A.E., Huber, T.L., Orkin, S.H., Zon, L.L., 2001. Primitive erythropoiesis in the *Xenopus* embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development* 128, 2301–2308.
- Medioni, C., Sénatore, S., Salmann, P.A., Lalevé, N., Perrin, L., Séméner, M., 2009. The fabulous destiny of the *Drosophila* heart. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 518–525.
- Minguillon, C., Gibson-Brown, J.J., Logan, M.P., 2009. *Tbx4/5* gene duplication and the origin of vertebrate paired appendages. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21726–21730.
- Moller, P.C., Philpott, C.W., 1973. The circulatory system of Amphioxus (*Branchiostoma floridae*). I. Morphology of the major vessels of the pharyngeal area. *J. Morphol.* 139, 389–406.
- Muñoz-Chápuli, R., 2011. Evolution of angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 345–351.
- Muñoz-Chápuli, R., Carmona, R., Guadix, J.A., Macías, D., Pérez-Pomares, J.M., 2005. The origin of the endothelial cells: an evo-devo approach for the invertebrate/vertebrate transition of the circulatory system. *Evol. Dev.* 7, 351–358.
- Muñoz-Chápuli, R., Pérez-Pomares, J.M., 2010. Cardiogenesis: an embryological perspective. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 3, 37–48.
- Naiche, L.A., Harrelson, Z., Kelly, R.G., Papaioannou, V.E., 2005. T-box genes in vertebrate development. *Annu. Rev. Genet.* 39, 219–239.

- Olson, E.N., 2006. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 313, 1922–1927.
- Onimaru, K., Shoguchi, E., Kuratani, S., Tanaka, M., 2011. Development and evolution of the lateral plate mesoderm: comparative analysis of amphioxus and lamprey with implications for the acquisition of paired fins. *Dev. Biol.* 359, 124–136.
- Orkin, S.H., Zon, L.I., 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631–644.
- Otrock, Z.K., Makarem, J.A., Shamseddine, A.I., 2007. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol. Dis.* 38, 258–268.
- Panopoulou, G.D., Clark, M.D., Holland, L.Z., Lehrach, H., Holland, N.D., 1998. AmphibMP2/4, an amphioxus bone morphogenetic protein closely related to *Drosophila* decapentaplegic and vertebrate BMP2 and BMP4: insights into evolution of dorsoventral axis specification. *Dev. Dyn.* 213, 130–139.
- Pérez-Pomares, J.M., Gonzalez-Rosa, J.M., Muñoz-Chápuli, R., 2009. Building the vertebrate heart—an evolutionary approach to cardiac development. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 1427–1443.
- Pimanda, J.E., Ottersbach, K., Knezevic, K., Kinston, S., Chan, W.Y., Wilson, N.K., Landry, J.R., Wood, A.D., Kolb-Kokocinski, A., Green, A.R., Tannahill, D., Lacaud, G., Kouskoff, V., Göttgens, B., 2007. Gata2, Flt1, and Scl form a recursively wired gene regulatory circuit during early hematopoietic development. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 17692–17697.
- Ragkousi, K., Beh, J., Sweeney, S., Starobinska, E., Davidson, B., 2011. A single GATA factor plays discrete, lineage specific roles in ascidian heart development. *Dev. Biol.* 352, 154–163.
- Rähr, H., 1979. The circulatory system of Amphioxus [*Branchiostoma lanceolatum* (Pallas)]. *Acta Zool.* 60, 1–18.
- Rähr, H., 1981. The ultrastructure of the blood vessels of *Branchiostoma lanceolatum* (Pallas) (Cephalochordata). I. Relations between blood vessels, epithelia, basal laminae, and “connective tissue”. *Zoomorphology* 97, 53–74.
- Randall, D.J., Davie, P.S., 1980. The hearts of urochordates and cephalochordates. In: Bourne, G.H. (Ed.), *Hearts and Heart-Like Organs*. Academic Press, New York, pp. 41–59.
- Rhodes, C.P., Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., 1982. Presence of coelomocytes in the primitive chordate amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *Science* 217, 263–265.
- Robin, C., Ottersbach, K., de Bruijn, M., Ma, X., van der Horn, K., Dzierzak, E., 2003. Developmental origins of hematopoietic stem cells. *Oncol. Res.* 13, 315–321.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Ruppert, E.E., 1997. Cephalochordata (Acrania). In: Harrison, F.W., Ruppert, E.E. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Wiley Liss, New York, pp. 349–504.
- Ruppert, E.E., Carle, K.J., 1983. Morphology of metazoan circulatory systems. *Zoomorphology* 103, 193–208.
- Schubert, M., Holland, N.D., Laudet, V., Holland, L.Z., 2006. A retinoic acid-*Hox* hierarchy controls both anterior/posterior patterning and neuronal specification in the developing central nervous system of the cephalochordate amphioxus. *Dev. Biol.* 296, 190–202.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.-F., Breitman, M.L., Schuh, A.C., 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62–66.
- Shubin, N., Tabin, C., Carroll, S., 2009. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature* 457, 818–823.
- Simões-Costa, M.S., Vasconcelos, M., Sampaio, A.C., Cravo, R.M., Linhares, V.L., Hochgreb, T., Yan, C.Y., Davidson, B., Xavier-Neto, J., 2005. The evolutionary origin of cardiac chambers. *Dev. Biol.* 277, 1–15.
- Somorjai, I.M.L., Bertrand, S., Camasses, A., Haguenaer, A., Escrava, H., 2008. Evidence for stasis and not genetic piracy in developmental expression patterns of *Branchiostoma lanceolatum* and *Branchiostoma floridae*, two amphioxus species that have evolved independently over the course of 200 Myr. *Dev. Genes Evol.* 218, 703–713.
- Somorjai, I.M.L., Somorjai, R.L., Garcia-Fernandez, J., Escrava, H., 2012. Vertebrate-like regeneration in the invertebrate chordate amphioxus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 517–522.
- Stach, T., 1998. Coelomic cavities may function as a vascular system in amphioxus larvae. *Biol. Bull.* 195, 260–263.
- Stolfi, A., Gainous, T.B., Young, J.J., Mori, A., Levine, M., Christiaen, L., 2010. Early chordate origins of the vertebrate second heart field. *Science* 329, 565–568.
- Szatmari, I., Iacovino, M., Kyba, M., 2010. The retinoid signaling pathway inhibits hematopoiesis and uncouples from the *Hox* genes during hematopoietic development. *Stem Cells* 28, 1518–1529.
- van Eekelen, J.A., Bradley, C.K., Göthert, J.R., Robb, L., Elefanti, A.G., Begley, C.G., Harvey, A.R., 2003. Expression pattern of the stem cell leukaemia gene in the CNS of the embryonic and adult mouse. *Neuroscience* 122, 421–436.
- van Wijhe, J.W., 1919. On the anatomy of the larva of *Amphioxus lanceolatus* and the explanation of its asymmetry. *Proc. K. Ned. Akad. Wet.* 21, 1013–1023.
- Xavier-Neto, J., Castro, R.A., Sampaio, A.C., Azambuja, A.P., Castillo, H.A., Cravo, R.M., Simões-Costa, M.S., 2007. Parallel avenues in the evolution of hearts and pumping organs. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 719–734.
- Xavier-Neto, J., Davidson, B., Simoes-Costa, M.S., Castro, R.A., Castillo, H.A., Sampaio, A.C., Azambuja, A.P., 2010. Chapter 1.1—evolutionary origins of hearts. In: Nadia, R., Richard, P.H. (Eds.), *Heart Development and Regeneration*. Academic Press, Boston, pp. 3–45.
- Yamaguchi, T.P., Dumont, D.J., Conlon, R.A., Breitman, M.L., Rossant, J., 1993. *flt-1*, an *flt*-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118, 489–498.

Resumen

En esta tesis se ha estudiado en detalle la genoarquitectura de la placa neural del anfióxico en desarrollo. La expresión de varios genes había sido descrita en el primordio neural del anfióxico, pero no existe ningún consenso sobre la significación morfológica de las partes distinguibles por patrones moleculares concretos descritos en el sistema nervioso central. En este estudio hemos analizado cerca de cincuenta genes de diferenciación y, sobretodo, factores de transcripción que se expresan en el análogo neural de las néurulas de anfióxico, corroborando y complementando estudios previos. En vertebrados, sus ortólogos delimitan distintos territorios cerebrales, contribuyendo con el concepto de bauplan neural gracias al modelo prosomérico. Nuestro principal objetivo fue determinar si el anfióxico podría constituir una aproximación a ese modelo, y en ese caso, en qué medida se podría definir un bauplan neural para cordados. Nuestros resultados revelan varios patrones de expresión discretos que discriminan tanto entre regionalización antero posterior como dorso ventral. En el caso de la regionalización antero posterior, los territorios Otx- y Gbx-positivos son fácilmente identificables pronto en el desarrollo, de la misma forma que ocurre en vertebrados. Dentro del territorio Otx-positivo, en la región se delimitan dos subdivisiones: el primordio del hipotálamo (HyP) y el primordio del di-mesencéfalo (DiMeP), el límite entre las dos es coincidente con la aposición de los dominios de Fesf y Irx. Y, conjuntamente con el primordio rombospinal (RhSp), que se define en el territorio Gbx-positivo, las tres subunidades principales quedan delimitadas por las mismas barreras topológicas que definen equivalentes dominios moleculares, tanto en cefalocordados como en vertebrados. Además los límites entre las tres subunidades principales son coincidentes con el posicionamiento y desarrollo de los organizadores secundarios en vertebrados. Ésta correspondencia topológica entre la región tálamo-pretecto-mesencefálica con el DiMeP, simple o simplificado de anfióxico, sugiere que estas tres regiones en vertebrados, que están delimitadas y especificadas por los organizadores secundarios comparten origen evolutivo. Extendiendo las correlaciones y extrapolaciones que surgen de este estudio genoarquitectónico, en esta tesis se describe un bauplan neural para cordados y se discuten otros temas relacionados con el origen y la evolución del complejo sistema nervioso central de vertebrados.

Summary

In this thesis we have studied thoroughly the genoarchitecture of the neural plate of amphioxus embryos. The expression of various genes have been studied variously in the neural primordium of Amphioxus but, there was no consensus about the morphological significance of the CNS regions that are distinguishable by characteristic molecular patterns. We have now analysed around fifty differentiation genes and transcription factors that are expressed in the neural anlage of amphioxus at the middle neurula stage, corroborating and complementing earlier reports. Homologs of the chosen markers delineate distinct brain territories in vertebrates, contributing to current concepts of the neural bauplan by means of the prosomeric model. Our main aim was to determine whether amphioxus in any way approximates that model, and whether if it can be defined a common neural bauplan for chordates. Our results revealed various discrete patterns discriminating along both the anteroposterior and dorsoventral dimensions (AP, DV). As regards AP expression patterns, Otx-positive versus Gbx-positive territories were early observable, as in vertebrates. The Otx-positive subregion is further partitioned by several markers in two major parts, which we named as primordial hypothalamus (HyP) and a primordial di-mesencephalon (DiMeP). And, along with the rhombospinal primordium (RhSP), that corresponds to the Gbx-positive territory, the three main subunits are delimited by the same topological boundaries, defining the same molecular limits, that define the secondary organizers in vertebrates. This topological correspondence between the thalamic-pretectal-mesencephalic region with the DiMeP in amphioxus suggests that this three regions in vertebrates, that are surrounded by the specifying effect of the secondary organizers, may share common ancestry. Extending the correlations that issue from this genoarchitectonic study, in this thesis, a neural bauplan for chordates is described, and other issues related with the origin and evolution of central nervous systems are debated.

I com tot a la vida... tot el que comença té un final. En el meu cas, excepte un petit impàs de temps, aquesta història va començar fa mooolt de temps. Això fa que (m'ho heu sentit dir moltes vegades) vegis la gent passar al teu voltant, més del que voldries. I sembla que la meua etapa també arriba a un final (però jo no marxo, jo mai marxo, és un dels meus superpoders) i com la meua història és mooolt llarga, també hi ha mooolta gent que he d'agrair, per fer-me el dia a dia una mica menys farragós.

I per fer-ho tot endreçadet, començaré pel principi. I el meu principi al lab, no va ser exactament benvingut, però el problema que tenim les persones és per molt poc que vulguem, ens encarinyem ràpid amb la gent... y por mucho que pensárais que yo iba a ser una alumnila de paso rápido... ¡¡me he quedado más que muchos de vosotros!!! Gracias a vosotros, los del AlterEpi (Champi, Manu, Nacho, Senda, Salvatore, Ildi), pq conoceros me ha hecho crecer como persona a parte del evidente crecimiento profesional. Gracias Sa, por mi primera PCR, gràcies Senda pq ets tot riure i alegria sempre, gracias Nacho por toodo lo q sabes y lo bien que lo transmites, gracias Ildiko pq eres todo perseverancia, gracias Champi por muuuchas cosas, por todas. Y muy más a Manu, que esta tesis la siento casi tan mia como tuya y no tengo otra manera de agradecértelo, te perdono los mil shunka que me debes :D. Y gracias sobretudo, por vuestras locuras transitorias... Desde las fantásticas bandas sonoras para trabajar: el señor de los anillos es muy freak, pero lo mejor de lo mejor...esa shakira! por supuesto, en sus mejores años! Hasta un ...yo soy batman y no soy consciente de mi realidad... me he reido hasta sentir dolor!! Gracias!!

Pel meu lab, que no és només el meu grup d'ara... El MEU lab sou tots. Ari, Aina, Maria, Susi, i el Gerard tb, Sara, Marta, Miquel, Alex, Kike, Carlos, Roser, i el Berni tb, Carlos, Nieves, Eudald, Loli, y Javi tb, Sisco, Chema, Nidia, Jon, Natalia, Marina, Isaac, Jordi, Miquel...Gràcies. Maria aunque estés lejos, se te siente cerca, siempre. Tu me dijiste: Rubia! quédate aquí a hacer la tesis! Y yo, me quedé. Aunque te hayas ido lejos...vas a tener que venir a vernos, muuucho. Y ya sabes, de mi, no te libras. Jon, que tu potser no ho saps però quan parlo de tu, sempre canto: foreever Jon... gràcies, ets un encant i amics com tu no sobren mai. A la Susi, Doctora cuqui, gràcies per escoltar-me i explicar-me secrets, i guardar-los!Les noves etapes sempre espanten però amb amigues com tu tot es més fàcil! A la sara, per intensa, i alegre, i ànims que al final sempre podem amb tot!! Al sisquet, que no se com t'ho fas però no et veiem mai i sempre volem veure't més... friki!! A la Roser... per la calma i la tempesta...i les birretes fins les mil...i les festes al terrat!! A la Nieves i l'Eudi, que sou nous però vaia entrada!! Trepitjeu fort!! A la Nidia i les seves maduixes. A l'Aina, i els hoooolaaaaa! I les històries versió fax. Al Miqueeel, el salvador, la seva presència acolloneix els ordinadors! A l'Ari, q ets més guapa que un sol, tot i lo petita que ets, envoltas, i no et deixarem marxar tant fàcilment...A Carlosh, sus gatitos y su otra realidad temporal...Al kike, pq si l'univers tant et reporta...serà que en un altra vida vas ser mooolt bona persona i això, si que és d'agrair. I al Manel! Que és un crack del confocal i fa uns 3D increïbles, gràcies per la teva feina i per les festes també. Y a Chelo y Luis, por su genoarquitectura y por Murcia. I al meu jefe! Gràcies Jordi per donar-me aquesta oportunitat, i creure en mi.

I aquí faig un impàs de lab. Desde molt abans de començar la tesi, perque sense ells no ho hagués aconseguit, he d'agrair: Als meus pares i la familia, per ajudar-me i animar-me sempre a fer el que més m'agradés, se que no siempre ha sido fácil de comprender, así que, gracias. I a les meves Biogirls, que som moltes i molt diferents, i no se ben bé com, però sempre ens entenem i ens estimem.

I al lluís, per entendre'm i escoltar-me, per aguantar-me, esperar-me (a vegades, massa), distreure'm i animar-me. Per estar allà sempre, passi el que passi. Ets un exemple per la teva raça.

I al lector X, que potser hauries de trobar el teu nom per aquí, però la meua memòria no és infinita... però si estàs llegint això: gràcies a tu també!

A tots, Gràcies!