



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magister en Bioquímica y Bioinformática

Origen evolutivo y participación funcional de la comunicación
glutamatérgica durante el proceso de neurulación en *Xenopus laevis*

Tesis para optar al grado de Magister en Bioquímica y Bioinformática



NICOLÁS ANDRÉS ZÚÑIGA SOTO
CONCEPCIÓN-CHILE
2021

Profesor Guía: Dr. Patricio Castro Maldonado
Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Profesor Co-Guía: Dr. Felipe Aguilera Muñoz
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Patricio Castro Maldonado
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Comisión Evaluadora



Dr. Felipe Aguilera Muñoz
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Mónica Carrasco Pastenes
Facultad de Ciencias Básicas Biomédicas
Universidad de Talca

Director del Programa

Dra. Elena Amparo Uribe Pérez
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a ANID (Ex CONICYT) mediante los proyectos N° 11160562 y 11180084 y a la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VRID) de la universidad de Concepción, mediante el proyecto N° 220.033.112-4, que permitieron el financiamiento para el desarrollo de esta tesis.

En segundo a lugar, agradezco a mis dos tutores, el Dr. Patricio Castro y el Dr. Felipe Aguilera, por el apoyo incondicional que me han dado desde el primer momento en que decidimos trabajar en conjunto, permitiendo incorporarme en sus grupos de trabajo. Agradezco profundamente sus consejos entregados tanto en los desarrollos experimentales como las palabras de aliento que impulsaron día a día esta investigación, incluso en tiempos de pandemia que pese a dificultar el proceso, logramos sacar adelante. Agradezco también a cada uno de los miembros del grupo de investigación LAND, a Mariana, Claudio, Camila, Alicia y Camilo, por los buenos momentos compartidos durante estos años en el laboratorio. También, agradezco a Susana Rojas y Jocelyn González, por la asistencia técnica constante que fue vital para la ejecución de esta tesis. Agradezco profundamente a mi compañera investigadora y de vida Ingrid Pinto, quien nunca ha dejado de apoyarme en cada idea descabellada propuesta en esta tesis y más, cuyas palabras guardaré hoy y siempre.

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

Y Finalmente a mi familia, por el amor entregado desde siempre, incluso a la distancia, que fue el combustible para avanzar y me ayudó a nunca darme por vencido.

El fruto de la perseverancia y consistencia se nutrió y floreció gracias a todos ustedes.

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sistema Nervioso Central y Sinapsis	1
1.2 Transporte de glutamato y sinapsis glutamatérgica.....	4
1.3 Familia de transportadores de soluto 17.....	8
1.4 Transporte Vesicular Glutamatérgico y VGLUTs	9
1.5 Señalización de glutamato durante el desarrollo embrionario.	15
1.6 Evolución del sistema nervioso en animales	18
1.7 Modelo experimental de esta tesis: <i>Xenopus laevis</i>	20
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	21
2. Hipótesis.....	21
3. Objetivos.....	21
3.1 Objetivo General.....	21
3.2 Objetivos Específicos	21
METODOLOGIA	22
4.1 Obtención de secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia de transportadores SLC17.....	22
4.2 Análisis Filogénicos	23
4.3 Búsqueda de Motivos endocíticos y Residuos funcionales	25
4.4 Predicción de interacción endocítica	26
4.5 Obtención de embriones de <i>Xenopus laevis</i>	27
4.6 Tratamientos farmacológicos e incidencia de defectos del tubo neural NTDs	28
4.7 Comportamiento epileptogénico	30
RESULTADOS.....	31
5.1. Historia evolutiva de ortólogos de SLC17 en eucariontes	31
5.1.1. Análisis filogénico de miembros de SLC17	31
5.1.2. Evolución de los transportadores de glutamato en animales	34
5.2. Evolución de las firmas moleculares de los transportadores de glutamato en animales.....	37
5.2.1. Evolución de los residuos involucrados en la interacción con glutamato.....	37
5.2.2. Evolución residuos de regulación con glutamato	37

5.2.3. Evolución de los motivos endocíticos di-leucina-like involucrados en el reciclaje vesicular de glutamato.....	38
5.2.4. Evolución del motivo poli-prolina en VGLUT1.	40
5.3. Determinación de la posible funcionalidad de los motivos di-leucina en VGLUTs de especies animales	42
5.3.1. Análisis de interacción del motivo di-leucina-like de las proteínas transportadoras de glutamato y el complejo adaptador AP-2.....	42
5.4. Señalización de glutamato durante neurulación	46
5.2.1. Bloqueo farmacológico de VGLUTs usando Rose Bengal en embriones de <i>X. laevis</i>	46
5.2.2. Alteraciones en migración lateromedial provocada por Rose Bengal durante neurulación.....	48
5.2.3. Cambio en comportamiento epileptogénico por bloqueo parcial de VGLUT durante neurulación.....	51
DISCUSIÓN	55
6.1. Malformaciones en desarrollo embrionario	55
6.2. Señalización de glutamato durante el desarrollo embrionario	56
6.3. Evolución del transporte vesicular glutamatérgico.....	59
6.4. Relación ontogenia-filogenia y transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs).....	63
CONCLUSION	67
BIBLIOGRAFIA.....	69
ANEXO	87

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Comparación de la disposición del Sistema Nervioso Central (SNC) en animales.....	2
Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de sinapsis.....	4
Figura 3. Representación esquemática de la sinapsis glutamatérgica. El glutamato generado por la enzima.....	7
Figura 4. Representación esquemática de una proteína VGLUT..	11
Figura 5. Representación esquemática del reciclaje vesicular ocurrido en una neurona presináptica.....	13
Figura 6. Representación esquemática del proceso de neurulación. .	17
Figura 7. Distribución filogenética y origen evolutivo de los miembros de la familia de transportadores de soluto SLC17.	34
Figura 8. Árbol filogenético basado en análisis de Máxima Verosimilitud de las proteínas transportadoras de glutamato en animales..	36
Figura 9. Firmas moleculares presentes en las proteínas transportadoras de glutamato..	40
Figura 10. Alineamiento del extremo C-terminal de proteínas transportadoras de glutamato en diferentes especies de mamíferos y anfibios..	42
Figura 11. Interacción molecular entre el motivo di-leucina-like de proteínas transportadoras de glutamato y el complejo AP-2 en especies representativas de diferentes grupos taxonómicos.....	45
Figura 12. Efecto del tratamiento con Rose Bengal durante el proceso de neurulación en <i>X. laevis</i>	48
Figura 13. Efecto del tratamiento con RB en la migración lateromedial en embriones de <i>X. laevis</i>	50
Figura 14. Validación del tratamiento con PTZ en renacuajos de <i>X. laevis</i>	52
Figura 15. Efecto en el comportamiento epileptogénico en renacuajos de <i>X. laevis</i> tratados con RB durante el proceso de neurulación.....	54
Figura 16. Posible escenario evolutivo de la sofisticación de la señalización de glutamato y la evolución de la condensación del sistema nervioso en animales.	66

RESUMEN

En humanos, la sinapsis excitatoria glutamatérgica participa en procesos de aprendizaje y memoria, y cumple un rol importante en el establecimiento del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario. La liberación de glutamato como neurotransmisor ha sido descrita además en distintas especies de animales, como moscas, gusanos y ratones. La señalización sináptica glutamatérgica en estas especies depende de la participación de transportadores vesiculares de glutamato o VGLUTs, que acumulan glutamato en vesículas sinápticas, en un proceso altamente controlado por señales reguladoras de iones cloruro y protones, así como por motivos endocíticos de reciclaje. Sin embargo, la historia evolutiva de VGLUT y su importancia durante el desarrollo embrionario y consolidación del funcionamiento del sistema nervioso permanece desconocida. En la presente tesis, se presenta un estudio filogenético de los VGLUTs, comprendiendo 111 especies de eucariontes, así como un estudio ontogénico de la señalización de glutamato mediada por VGLUTs para establecer su importancia durante el desarrollo embrionario temprano del sistema nervioso o neurulación del cordado *Xenopus laevis*. Los resultados proponen una evolución secuencial de la señalización de glutamato vesicular, con el surgimiento de la interacción con glutamato en el último ancestro común de los animales cnidarios-bilaterados, mientras que la capacidad de formar vesículas emerge en el último ancestro común de los animales bilaterados. Al evaluar como VGLUT participa en neurulación, observamos que la disrupción de la comunicación glutamatérgica mediante VGLUT genera un cierre anormal del tubo neural, provocado por cambios en la migración celular de las células que alterarían el establecimiento y posterior funcionamiento correcto del sistema nervioso en *X. laevis*. Estos resultados en conjunto permiten proponer la correlación e importancia del surgimiento de la señalización de glutamato vesicular con la formación de sistemas nerviosos organizados y condensados, en donde a nivel evolutivo, surge junto a la reorganización anatómica y sofisticación funcional del sistema nervioso, lo que explicaría la relevancia de la señalización de glutamato para la formación correcta del sistema nervioso central durante el desarrollo.

ABSTRACT

In humans, the excitatory glutamatergic synapse participates in memory and learning processes, as well as has a vital role in the establishment of the nervous system during embryonic development. The glutamate releases as a neurotransmitter have also been described in different species, including fruit fly, worms, and mice, where neurotransmitters accumulate in vesicles through vesicular glutamate transporters or VGLUTs. This is done in a tightly controlled process that comprises the regulation of Cl⁻ and H⁺ signals, and also the presence of endocytic motifs involved in vesicle recycling. However, the evolutionary history of VGLUTs and their role during development is yet unknown. In this thesis, I performed a phylogenic and molecular signature analysis using 111 eukaryotic species, but also conduct an ontogeny study of VGLUT to establish their importance during neurulation in the chordate *X. laevis*. The results suggest a stepwise evolution of glutamate signaling mediated by VGLUTs, where comparative analyses revealed that glutamate binding residues emerged at the dawn of eumetazoans, whereas endocytic motifs appeared during the cnidarian-bilaterian evolutionary split. When evaluating the VGLUTs participation during neurulation, I observed that the disruption of vesicular glutamate communication generates abnormal neural tube closure, caused by changes in cellular migration that modify the correct establishment and posterior functionality of the nervous system in *X. laevis*. Altogether, these results propose that there is a correlation between vesicular glutamate signaling and the formation of an organized and condensed nervous system. From an evolutionary point of view, this thesis proposes that the condensation and sophistication of the different nervous systems observed in extant animals might be correlated with glutamatergic signaling.

INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema nervioso central y sinapsis

El sistema nervioso central (SNC) en cordados, de manera general, está encargado de regular el funcionamiento armónico y coordinado de un organismo, así como del procesamiento de la información recibida desde el medio externo e interno a través del sistema nervioso periférico (Buchanan & Tranel, 2009; Purves et al., 2012; Schaible, 2007; Sternini, 1997). El SNC en especies de vertebrados consta del encéfalo, el tronco encefálico y la espina (cordón nervioso) dorsal, los cuales en conjunto se encargan de controlar la función de todos los órganos del cuerpo mediante impulsos eléctricos o nerviosos (Purves et al., 2012). En estas especies el cordón nervioso dorsal, como su nombre lo indica, se ubica en la posición dorsal del individuo de forma condensada, mientras que en especies de invertebrados esta estructura se ubica generalmente en posición ventro-medial (Figura 1). Independientemente de la posición del cordón nervioso, el SNC en vertebrados e invertebrados se organiza de forma estructurada y ordenada, además de tener un grado de condensación definido (Martín-Durán et al., 2018). No obstante, esta organización condensada no es característica de todas las especies de animales. Por ejemplo, las medusas (Cnidarios) presentan un sistema nervioso del tipo red neuronal y carecen de encéfalo (Satterlie, 2015) (Figura 1).

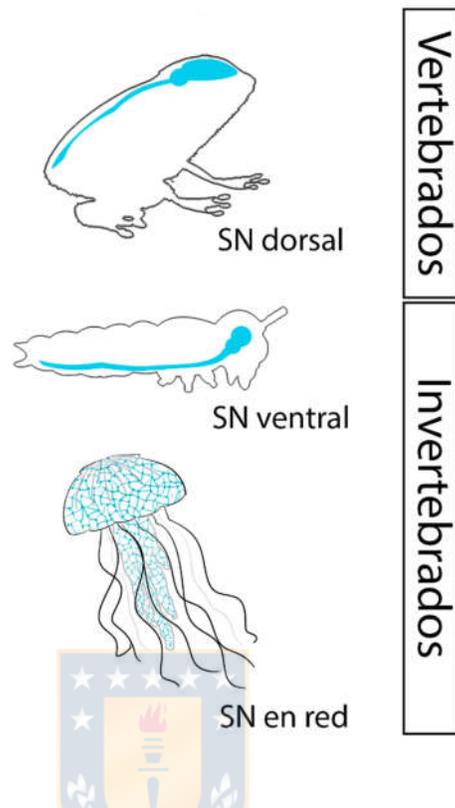


Figura 1. Comparación de la disposición del Sistema Nervioso Central (SNC) en animales. Los animales vertebrados presentan la espina nerviosa en la parte dorsal de su cuerpo, mientras que los animales invertebrados tienen esta estructura en posición ventral. Otras especies de animales invertebrados, como las medusas, tienen un SNC del tipo red neuronal.

La comunicación en el sistema nervioso y entre los diferentes órganos del cuerpo se realiza a través del proceso de sinapsis, una comunicación celular especializada capaz de enviar una señal, comúnmente un potencial de acción a lo largo de las neuronas, a través de cambios despolarizantes en la membrana plasmática producto del flujo de iones a través de ella (Cohen-Cory, 2002; Südhof & Malenka, 2008). Cuando el potencial de acción alcanza un botón sináptico, se pueden presentar dos tipos de sinapsis: i) la sinapsis eléctrica, donde las neuronas presentan uniones comunicantes que permiten el paso de iones a través de sus membranas, permitiendo el paso del impulso

nervioso desde la neurona presináptica hacia la neurona postsináptica (Connors & Long, 2004; Hormuzdi et al., 2004; Zoidl & Dermietzel, 2002), y ii) la sinapsis química, donde la despolarización del botón presináptico generado por el impulso nervioso permite el ingreso de calcio (Ca^{2+}) extracelular a través de canales sensibles a voltaje, desencadenando la liberación de neurotransmisores (NT) contenidos en vesículas, los cuales activarán receptores en la membrana de la neurona postsináptica para así permitir el paso de patrones de potenciales de acción en la neurona postsináptica (Burette et al., 2015; Glitsch, 2008; Pereda, 2014) (Figura 2). La sinapsis química en el SNC se caracteriza por dos mecanismos de señalización: i) una sinapsis excitatoria, en donde la unión del neurotransmisor (Glutamato, Serotonina o Acetilcolina) con su receptor estimula la generación de potenciales locales en la neurona postsináptica para la generación de un nuevo potencial de acción que es capaz de propagarse a distancia (Chua et al., 2010; Fremeau et al., 2001), y ii) una sinapsis inhibitoria donde la unión del neurotransmisor (ácido γ -aminobutírico (GABA) o glicina) con su receptor aleja el potencial del umbral de disparo del potencial de acción, impidiendo la propagación de este (Legendre, 2001; Qian & Sejnowski, 1990). La integración de las señales excitatorias e inhibitorias por parte de la neurona postsináptica permite la generación de un nuevo potencial (Ovsepian, 2017).

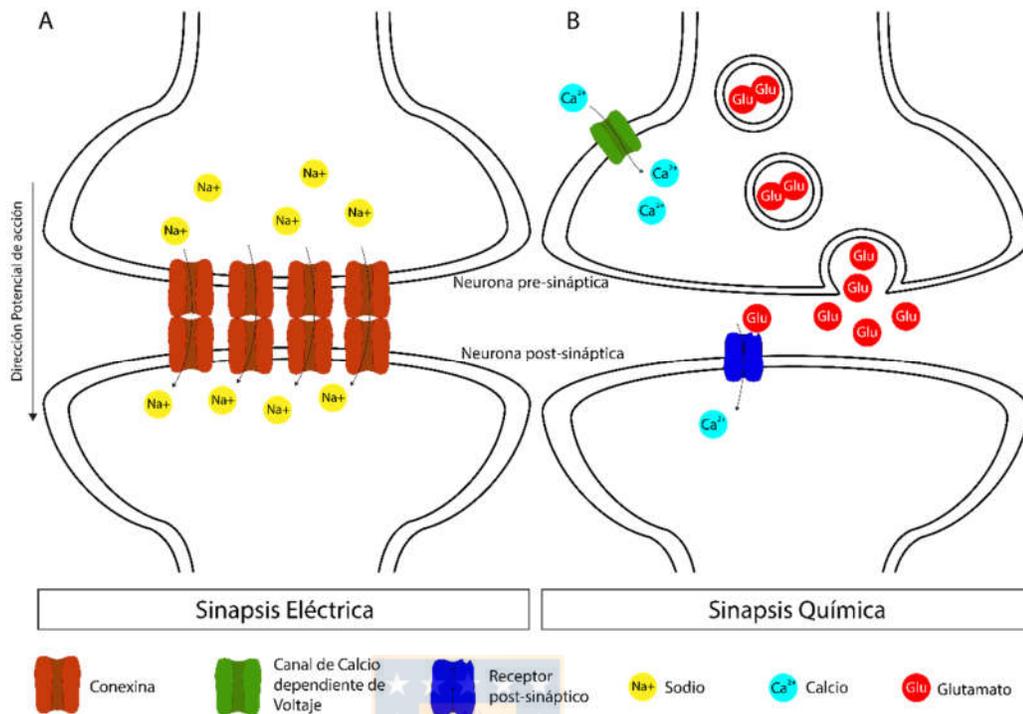


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de sinapsis. **(A)** Sinapsis eléctrica donde el potencial de acción viaja por el axón y pasa a través de uniones comunicantes a las neuronas vecinas. Estas uniones comunicantes o uniones gap están conformadas, entre otras proteínas, por conexinas que forman poros permitiendo el paso de iones, y, por tanto, del potencial de acción. **(B)** En la sinapsis química el potencial de acción llega al botón sináptico, induciendo la activación de canales de calcio dependientes de voltaje que ingresan calcio al citoplasma, y así provocando la unión de vesículas cargadas con neurotransmisores, los cuales a su vez interactúan con receptores ubicados en la neurona postsináptica, lo que conlleva a la generación de una respuesta celular.

1.2 Transporte de glutamato y sinapsis glutamatérgica

El uso del aminoácido glutamato como neurotransmisor en la sinapsis está ampliamente descrito en especies de vertebrados como *Mus musculus*, *Xenopus laevis* y *Homo Sapiens* (Fu et al., 1995; Volk et al., 2015; Wang & Sun, 2012; G.-Y. Wu et al., 1996), cumpliendo la función de propagar la señal química sináptica en el SNC activando receptores ionotrópicos como AMPAR (Receptor de α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico), NMDAR (Re-

ceptor de ácido N-metil-D-aspartico) y de Kainato, así como receptores metabotrópicos o mGluR (Purves et al., 2012). Adicionalmente, se ha descrito que participa en sinapsis neuromusculares en *Drosophila melanogaster* y en la regulación de circuitos periféricos sensoriales en *Caenorhabditis elegans* (Han et al., 2015; Thapliyal et al., 2018).

La formación de glutamato en las neuronas de un sistema nervioso maduro ocurre por la conversión de glutamina a través de la enzima glutaminasa (GLS), ubicada en las mitocondrias de los terminales sinápticos (Cardona et al., 2015; Tani et al., 2014). A su vez, la glutamina utilizada en este proceso es generada en los astrocitos por acción de la enzima glutamina sintasa (GluN sintasa) (Purves et al., 2012). En un contexto de desarrollo embrionario, la generación de glutamato está presente desde etapas muy tempranas en vertebrados como *Xenopus*, y es capaz de ser detectada desde la formación del tubo neural o neurulación, que corresponde a la primera etapa en la formación del sistema nervioso en vertebrados (Benavides-rivas et al., 2020).

La regulación de la señalización sináptica de glutamato ocurre gracias a la participación de dos grupos de transportadores. En primer lugar, el almacenamiento de glutamato en vesículas sinápticas ocurre por acción de los Transportadores Vesiculares de Glutamato (VGLUTs1-3) (Li et al., 2020; Liguz-Leczna & Skangiel-Kramska, 2007; Martineau et al., 2017). Para ello, debe ser generado un gradiente de protones que permita la acidificación de la vesícula y así permitir el gradiente (transporte) electroquímico de glutamato hacia la vesícula (El Far & Seagar, 2011; Gowrisankaran & Milosevic, 2020; Wolosker et al.,

1996). Este gradiente está a cargo de una ATPasa vesicular o V-ATPasa que utilizando energía en forma de ATP permite el paso de protones hacia la vesícula (Vavassori & Mayer, 2014) (Figura 3). Al mismo tiempo, iones cloruro (Cl^-), que permanecen unido a VGLUTs, regulan el ingreso de glutamato a la vesícula de forma directa, controlando el llenado vesicular (Chang et al., 2018). De hecho, a mayores concentraciones de cloruro intracelular, mayor es el flujo de glutamato hacia la vesícula (Wolosker et al., 1996).

Para la liberación de las vesículas glutamatérgicas, es necesario un influxo de iones Calcio (Ca^{2+}) que es producido por la llegada del potencial de acción a los terminales sinápticos (Figura 3). Este calcio permite la activación del complejo proteico SNARE (Receptores de Proteínas de Fijación Soluble de NSF), encargado de la unión de la vesícula con la membrana de la neurona (Goda, 1997; Ramakrishnan et al., 2012). Liberando del contenido vesicular al espacio sináptico, y así, permitiendo la interacción de glutamato con sus respectivos receptores (Goda, 1997; Sudhof & Rothman, 2009) (Figura 3).

En segundo lugar, la recuperación del glutamato hacia las células neuronales ocurre por acción de los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT1-5) (Bridges & Esslinger, 2005; Magi et al., 2019; Mim et al., 2005). Estos transportadores se ubican principalmente en las neuronas postsinápticas y astrocitos (Domercq et al., 1999; Kugler & Schmitt, 1999), y en menor número en neuronas presinápticas (Rothstein et al., 1994). De esta manera, el ingreso de glutamato ocurre en un cotransporte con Na^+ y H^+ , regulando los

niveles de NT que estarían participando en la activación sináptica y logrando finalizar la señal (Divito & Underhill, 2014).

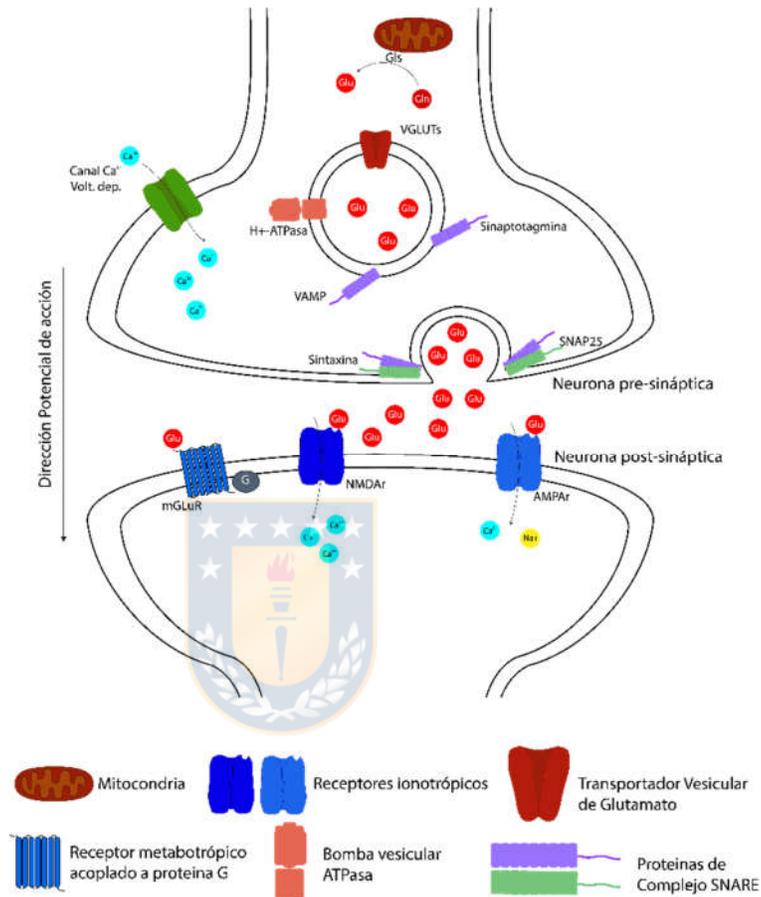


Figura 3. Representación esquemática de la sinapsis glutamatergica. El glutamato generado por la enzima Glutaminasa (Gls) es almacenado en vesículas gracias a un gradiente electroquímico generado por la actividad de una Proton-ATPasa, la cual acidifica la vesícula en conjunto con el cloruro (Cl⁻) ya presente en ella. El glutamato ingresa a través de los VGLUTs a la vesícula. Posterior al ingreso de calcio a la neurona, proteínas del complejo SNARE (VAMP, sinaptotagmina, sintaxina y SNAP25) interaccionan fuertemente para la unión de la vesícula a la membrana de la neurona, permitiendo la liberación de glutamato al espacio interneuronal. El glutamato liberado interacciona con receptores ionotrópicos (NMDAr y AMPAr) y receptores metabotrópicos (mGLuRs) presentes en la membrana postsináptica.

1.3 Familia de transportadores de soluto 17

Los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs) son parte de la familia de transportadores de soluto 17 o SLC17 (Reimer, 2013). Los miembros de esta familia corresponden a nueve proteínas que se han descrito como transportadores de aniones como fosfato, glutamato, aspartato (Fredriksson et al., 2008; Reimer, 2013). Dependiendo del soluto a transportar, estos se pueden clasificar como: i) transportadores de fosfatos (SLC17A1-4), ii) transportadores de ácido siálico (SLC17A5), iii) transportadores vesiculares de glutamato (SLC17A6-8), y iv) transportador vesicular de nucleótidos (SLC17A9) (Fredriksson et al., 2008; Reimer, 2013; Reimer & Edwards, 2004; Sreedharan et al., 2010).

Los transportadores de fosfato están descritos como cotransportadores de fosfato- Na^+ (Iharada et al., 2010). Estas cuatro proteínas se expresan de forma restringida en riñón (SLC17A1-4), hígado (SLC17A2 y 4), músculo (SLC17A2) y estómago (SLC17A4) (Jutabha et al., 2011; Reimer, 2013; Sreedharan et al., 2010; Togawa et al., 2012). A partir de sus patrones de expresión y localización se ha estipulado que estos transportadores participarían en el despeje o limpieza de aniones inorgánicos en el organismo, tal como el urato (Iharada et al., 2010).

El transportador de ácido siálico o sialina (SLC17A5) se ha identificado como un importante causante de patologías dada su alta relevancia en el control de la movilización de ácido siálico y ácido glucurónico en lisosomas.

(Tarailo-Graovac et al., 2017). Dentro de las patologías asociadas este transportador se encuentran las enfermedades de Salla y de almacenamiento de ácido siálico (ISSD) (Biancheri et al., 2002; Morse et al., 2005; Prolo et al., 2009). El rol fisiológico de este transportador se relaciona con la movilización de ácido siálico desde el lisosoma al citoplasma para ser reincorporado en nuevas glicoproteínas o glucolípidos (Prolo et al., 2009).

Los transportadores vesiculares de glutamato (SLC17A6-8) se expresan principalmente en el cerebro, en regiones como el hipocampo, neurocortex e hipotálamo (Liguz-Leczna & Skangiel-Kramska, 2007; Mackenzie et al., 2008b). A nivel fisiológico estos transportadores participan en la sinapsis excitatoria del encéfalo, permitiendo el paso de señales despolarizantes en la membrana, además de participar en procesos de memoria y aprendizaje como también en patologías neurodegenerativas, neurotóxicas y epilepsia (Liguz-Leczna & Skangiel-Kramska, 2007; Rubio et al., 2012).

Finalmente, el transportador vesicular de nucleótidos (SLC17A9) concentra nucleótidos en vesículas para ser liberadas como señales purinérgicas en el cerebro y participa en respuestas de control del sistema neuronal autónomo, transducción de señales e inflamación (Moriyama et al., 2017; Sawada et al., 2008).

1.4 Transporte vesicular glutamatérgico y VGLUTs

Para el ingreso de glutamato a una vesícula usando los VGLUTs, es necesaria la generación de un gradiente electroquímico ($\Delta\psi_{H^+}$) (Eriksen et al.,

2016). Para ello, una protón-ATPasa ubicada en la membrana de la vesícula permite el ingreso de protones (H^+), acidificándola hasta valores de pH cercanos a 5.5 (Chang et al., 2018; Martineau et al., 2017; Wolosker et al., 1996).

Estructuralmente, los transportadores vesiculares de glutamato poseen 12 dominios transmembrana, que además de poseer una función de adhesión a membranas lipídicas, posee residuos que cumplirían roles vitales para la ejecución de su función (Liguz-Leczna & Skangiel-Kramska, 2007). De hecho, los protones dentro de la vesícula interaccionan con un residuo de ácido glutámico (en las posiciones: E183 en VGLUT1, E191 en VGLUT2 y E196 en VGLUT3, de las proteínas de rata), específicamente en el dominio transmembrana 4 (TM4), lo que genera un cambio conformacional que facilita el ingreso de glutamato (Li et al., 2020). Paralelamente, se ha descrito la presencia de interacciones entre el Cloruro (Cl^-) y residuos de arginina en el TM4 (en las posiciones: R176 en VGLUT1, R184 en VGLUT2 y R189 en VGLUT3, de las proteínas de rata), provocando la remoción de iones Cl^- , desde la vesícula hacia el exterior, permitiendo así el intercambio con glutamato dentro de la vesícula (Chang et al., 2018; Martineau et al., 2017; Wolosker et al., 1996).

Adicionalmente, se han descrito dos residuos de arginina en el TM1 (en las posiciones: R80 en VGLUT1, R88 en VGLUT2 y R93 en VGLUT3, de las proteínas de rata) y en el TM7 (en las posiciones: R314 en VGLUT1, R322 en VGLUT2 y R326 en VGLUT3, de las proteínas de rata) que estarían interaccionando estrechamente con glutamato para permitir su ingreso a la vesícula (Almqvist et al., 2007; Li et al., 2020; Liguz-Leczna & Skangiel-Kramska,

2007) (Figura 4). La falta de cualquiera de todos estos residuos cargados volvería menos eficiente el llenado vesicular con glutamato (Juge et al., 2006; Li et al., 2020).

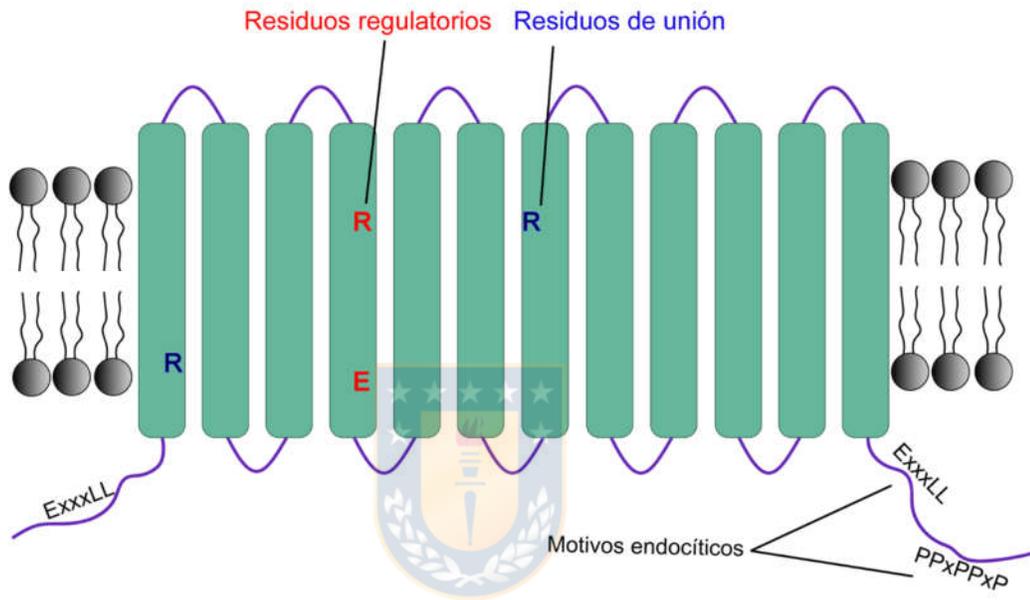


Figura 4. Representación esquemática de una proteína VGLUT. Las proteínas VGLUTs contienen 12 dominios transmembrana hidrofóbicos, indicados en color verde. En algunos de estos dominios se encuentran residuos cargados que permiten su interacción con glutamato y otras moléculas. Por ejemplo, en los dominios TM1 y TM7 se ubican residuos de arginina que unen glutamato, mientras que en el dominio TM4 se ubican residuos de glutamato y arginina que interaccionan con iones cloruro y protones, respectivamente. Además, estas proteínas presentan motivos endocíticos en las regiones N-terminal y C-terminal. Los motivos dileucina-like están presentes en ambas regiones, dos en el N-terminal y uno en el C-terminal, mientras que existen dos motivos poli-prolina en la región C-terminal.

La liberación de glutamato almacenado en vesículas ocurre por un complejo de proteínas que se fusionan con la membrana neuronal a partir de la llegada de un potencial de acción al terminal sináptico (Ramakrishnan et al., 2012; Sudhof & Rothman, 2009). Este complejo se denomina SNARE y corresponde a un conjunto de cuatro proteínas ubicadas tanto en la membrana

de la vesícula (Sinaptobrevina/VAMP) como en la membrana plasmática (Syntaxina, SNAP25) (Sudhof & Rothman, 2009). La llegada del potencial de acción genera una apertura de calcio dependientes de voltaje, generando un aumento de la concentración de este ión en el citoplasma (Quetglas et al., 2000; Schiavo et al., 1997). Este cambio es detectado por sinaptotagmina, el cual permitiría la unión de las proteínas del complejo SNARE (Schiavo et al., 1997). De esta manera, la interacción estrecha de las proteínas del complejo SNARE acerca la vesícula a la membrana plasmática, a una distancia tal que facilita la fusión de ambas, liberando el contenido hacia el espacio sináptico (Quetglas et al., 2000) (Figura 5).



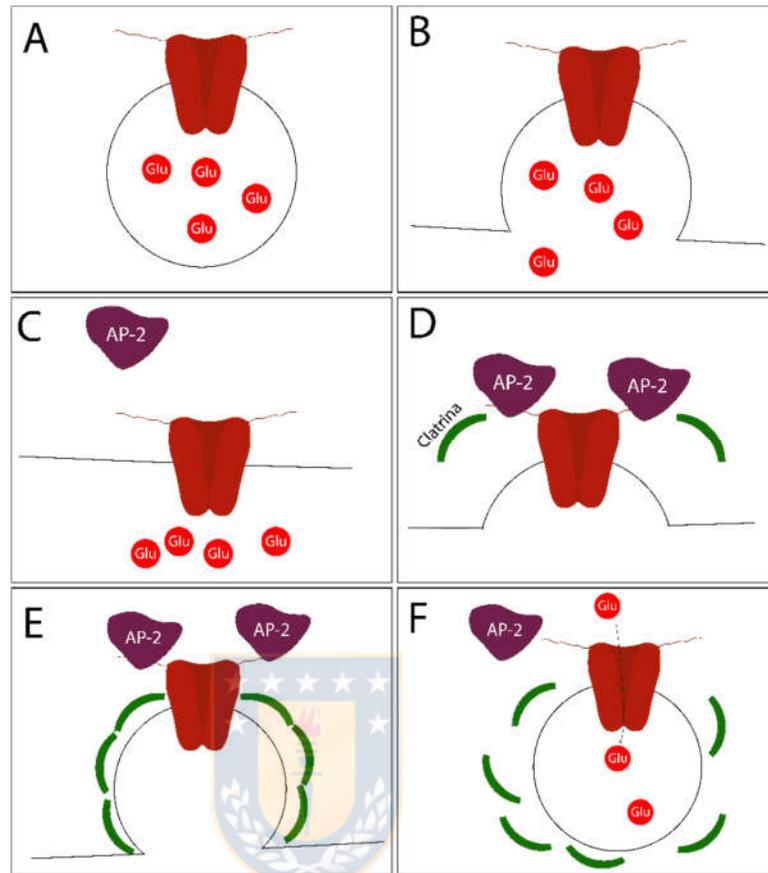


Figura 5. Representación esquemática del reciclaje vesicular ocurrido en una neurona presináptica. El glutamato es almacenado en vesículas a través de transportadores vesiculares (A) Una vez liberados los neurotransmisores posteriores al estímulo del potencial de acción (B), el VGLUT ubicado en la membrana de la neurona presináptica debe ser reciclado; para ello, el reclutamiento de distintas proteínas, incluyendo AP-2 y clatrina (C) permite la invaginación de la membrana (D) y la formación de una vesícula presináptica que no presenta glutamato (E). Esta vesícula presináptica, cargada con iones del líquido extracelular, comienza su reacidificación gracias al ingreso de glutamato (F).

La recuperación o reciclaje de los componentes vesiculares ahora ubicados en la membrana plasmática de la neurona pre-sináptica es llevada a cabo por proteínas clásicas de endocitosis, como complejos adaptadores (AP) y clatrina (Cousin & Robinson, 2002; Haucke et al., 2011; Rizzoli, 2014).

A modo general, la endocitosis se da a cabo por el reconocimiento de motivos estructurales en las proteínas a endocitar, llamados motivos di-leucina, los cuales tienen el siguiente patrón: [ED]xxxLL, y son reconocidos por

complejos proteicos adaptadores (*Adaptor Complex* o AP), a través de la interacción estrecha entre el motivo di-leucina y un bolsillo hidrofóbico en AP (Figura 4 y 5) (Foss et al., 2013; H. Li et al., 2017). La activación de esta unión permite el reclutamiento de proteínas como clatrina y endofilina, las cuales permiten la formación de una malla o “*coat*” que invagina la membrana hasta la formación de un endosoma o, en el caso de la sinapsis, una vesícula sin neurotransmisores (Figura 5D) (Rizzoli, 2014; Santos et al., 2014). En este paso, la vesícula nuevamente formada no se dirige a degradación, sino que pasa por un proceso de rellenado o “*refilling*”, en donde los neurotransmisores, como el glutamato, vuelven a ingresar a la vesícula y quedan a la espera de poder liberarse cuando llegue el potencial de acción al terminal sináptico (Chang et al., 2018; Cousin & Robinson, 2002).

En VGLUTs se ha descrito la presencia de dos motivos di-leucina, denominados como “*like*” en la región N-terminal y otro en la región C-terminal (Foss et al., 2013; Kelly et al., 2008; H. Li et al., 2017). Estos motivos “di-leucina-like” en VGLUTs presentan en reemplazo de las leucinas, residuos de valina, fenilalanina y alanina (Foss et al., 2013). Sin embargo, pese a este cambio en los residuos, los motivos son funcionales permitiendo el reclutamiento de complejos adaptadores del tipo AP-2 y AP-3 (H. Li et al., 2017; Santos et al., 2014). Además, una característica exclusiva presente en la región C-terminal de la proteína VGLUT1 es la presencia de un motivo de poli-prolina (PPxPPP) (Szaszák et al., 2002; Zhang et al., 2019), el cual es capaz de unirse al dominio SH3 de endofilina cumpliendo la función de regular las

señales excitatorias prolongadas y la frecuencia de liberación espontánea (Saksela & Permi, 2012).

1.5 Señalización de glutamato durante el desarrollo embrionario

En vertebrados, una de las primeras etapas de desarrollo del sistema nervioso se conoce como la inducción neural, y comienza con la estimulación de células ectodermales para su conversión en células neurales a través de la acción de proteínas como BMP (*Bone Morphogenic Protein*) Noggin y Shh (*Sonic Hedgehog*) (Smith, 1997; Steventon et al., 2009; Stottmann et al., 2006; Ybot-Gonzalez et al., 2007). La participación de estas proteínas provoca el proceso conocido como neurulación, donde ocurre la formación de la placa neural, seguida de una convergencia de sus extremos laterales mediante procesos migratorios, dando formación al tubo neural (Figura 6) (Davidson & Keller, 1999; Montcouquiol et al., 2006; Smith, 1997).

El proceso de neurulación depende de distintos cambios en la forma de las células, tales como cambios en la polaridad provocados por una constricción apical y cambios en el número de células neuronales inducidas que migran para formar el tubo neural (Burnside, 1973; Christodoulou & Skourides, 2015; Davidson & Keller, 1999; Davidson et al., 2002).

Se ha descrito que anomalías en la correcta formación del tubo neural desencadena en malformaciones que pueden llegar a ser letales para el or-

ganismo en desarrollo, provocando patologías como anencefalia y espina bífida (Blencowe et al., 2018a; Detrait et al., 2005; Lindhout et al., 1992). Estas patologías se denominan Defectos del Tubo Neural o NTDs, por sus siglas en inglés. Estos defectos se presentan como una gran carga para la salud pública, dado que se estima que los NTDs tienen una incidencia del 6% con respecto al total de nacimientos mundiales (Blencowe et al., 2018; Blom et al., 2006).

Si bien no hay estudios que describen la presencia de mecanismos de liberación vesicular durante el proceso de neurulación; recientemente, se ha propuesto que la señalización de glutamato mediada por el receptor de NMDA estaría encargada de la regulación de las dinámicas de calcio que ocurren durante el proceso de neurulación, y por ende, la formación del tubo neural en embriones de *Xenopus laevis* (Sequera et al., 2018). Además, se ha descrito la presencia de actividad de glutaminasa durante la neurulación en esta misma especie, cuya falla en su función podría llevar a la formación de NTDs (Benavides-rivas et al., 2020). Estos antecedentes permiten proponer la idea que, durante el proceso de neurulación, los mecanismos de comunicación celular utilizando elementos sinápticos, como glutamato, VGLUTs y otros, podrían estar participando durante la inducción neural en etapas donde la sinapsis no está completamente formada. En *Xenopus*, se dividieron las diferentes etapas del desarrollo hasta la formación morfológica de una rana 66 días post fertilización, enumerando cada etapa desde 1 a 66. La neurulación tiene lugar aproximadamente 14 horas post fertilización (hpf), etapa en donde se puede divisar la placa neural o estadio 12.5 (Figura 6A), y tiene lugar por un periodo

cercano a 8 horas, culminando 22 hpf con la formación del tubo neural en el estadio 20.

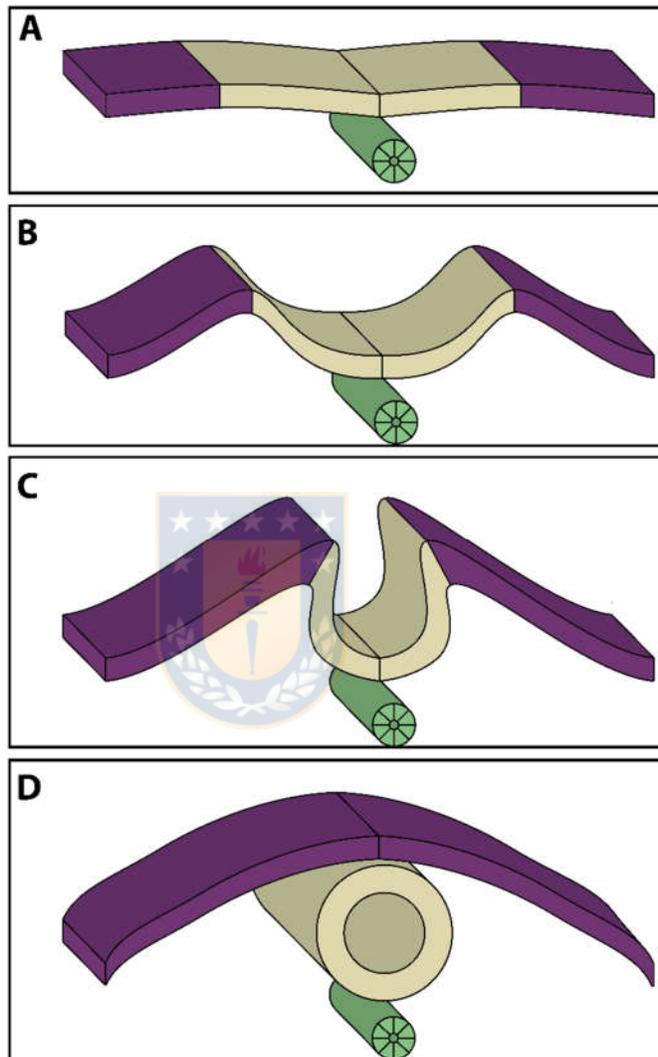


Figura 6. Representación esquemática del proceso de neurulación. La neurulación es el primer proceso de diferenciación celular que ocurre durante el desarrollo embrionario, en donde el ectodermo ubicado en la línea medial del embrión (A) comienza procesos migratorios lateromediales (B) ascendentes (C) que culminan en la formación de una estructura especializada (el tubo neural) (D) que llevará a la formación del sistema nervioso. Esta migración celular es regulada y estimulada por diferentes factores, incluyendo Wnt, noggin, Ssh; y recientemente, glutamato (Benavides-rivas et al., 2020; Sequerra et al., 2018; Smith, 1997; Stottmann et al., 2006)

1.6 Evolución del sistema nervioso en animales

El sistema nervioso es un conjunto de células, tejidos y órganos involucrados en percibir y elaborar respuestas adecuadas a los estímulos internos y externos en animales (Buchanan & Tranel, 2009; Nickel, 2010; Schnell & Maher de Leon, 1998; Sternini, 1997). Este sistema es responsable de la mayoría de los comportamientos de animales, desde simples movimientos musculares dirigidos hasta razonamientos abstractos. La mayor parte de nuestro conocimiento sobre la evolución del sistema nervioso proviene de diferentes estudios en animales bilaterados (Fei et al., 2007; Han et al., 2015; Lee et al., 2008; Rowe et al., 1993; Varoqueaux & Fasshauer, 2017), probablemente asociado al intento por entender el sistema nervioso en humanos (Varoqueaux & Fasshauer, 2017). Diferentes escenarios evolutivos han sido propuestos con el fin de explicar la aparición y evolución de la comunicación celular, neuronas y el sistema nervioso en animales (Martín-Durán & Hejnol, 2019). Una de las hipótesis propuestas sugiere que el ancestro común más reciente de los animales bilaterados (el cual vivió en el planeta Tierra hace unos 570 millones de años atrás) (Erwin & Davidson, 2002) presentaba un sistema nervioso centralizado en posición ventral, cuya condensación de células neuronales conformaría una estructura que eventualmente evolucionaría hasta formar un cerebro (Martín-Durán et al., 2018; Claus Nielsen, 2017). Esta región condensada desarrolló nuevas estructuras ligadas a procesos de duplicación de genoma completo y un complejo y dinámico escenario de pérdida y ganancia de genes, logrando el desarrollo de estructuras como el

romboencéfalo, mesencéfalo y proencefalo (Holland, 2015; Martín-Durán et al., 2018; C. Nielsen, 2015; Claus Nielsen, 2017).

Otra teoría sobre el origen y evolución del sistema nervioso en animales indica que el sistema nervioso no se originó desde un organismo con centros neuronales complejos, los cuales fueron experimentando ganancias y pérdidas a lo largo de la evolución (Erwin & Davidson, 2002; Claus Nielsen, 2017), sino más bien que este sistema y su complejidad observada en especies existentes hoy en día, se debe a procesos de convergencia evolutiva hacia una centralización o condensación a lo largo de la evolución de los animales (Heger et al., 2020; Martín-Durán et al., 2018).

A pesar de estos avances, dilucidar la historia evolutiva del sistema nervioso en animales sigue siendo polémico (Holland, 2015; Holland et al., 2013; Martín-Durán & Hejnol, 2019; Nielsen, 2017; Northcutt, 2012). Una opción válida para relacionar procesos evolutivos de tejidos y órganos, tal como el sistema nervioso, es la comparación de estos con su desarrollo embrionario en diferentes especies. Esta aproximación fue propuesta por Ernst Haeckel en 1866 quién dijo que la ontogenia, es decir el desarrollo de un organismo, recapitula la información entregada por la filogenia, es decir, su evolución (Ohno, 1995; Sander, 2002). De esta manera, lo observado en términos evolutivos de una especie tendría una relación con el proceso de desarrollo embrionario de esa especie (Clune et al., 2012; Mayr, 1994; Nielsen, 2015).

Con esto en mente, en esta tesis, voy a investigar la relación de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs) y la condensación del sistema nervioso, enfocándome en los residuos y motivos que le confieren a los VGLUTs la capacidad de transportar glutamato, además de evaluar la participación de estos transportadores en el proceso de neurulación. Al hacer esto, podré dilucidar el origen evolutivo de la señalización glutamatérgica y determinar si existe alguna asociación entre esta señalización y la condensación del sistema nervioso en animales.

1.7 Modelo experimental de esta tesis: *Xenopus laevis*

Para el desarrollo de esta tesis, se utilizó el modelo animal de rana africana *Xenopus laevis* debido a las inmejorables ventajas que entrega este animal durante su desarrollo embrionario, tales como su tamaño y niveles de pigmentación de embriones en desarrollo (1-1,4 mm), lo que hace posible observar prácticamente todas las divisiones celulares y el proceso de desarrollo bajo lupa y luz blanca. Otra ventaja de este modelo es la cantidad de muestra obtenible en cada fertilización, pues es posible obtener entre 400-500 embriones, lo cual permite realizar diversos experimentos en paralelo y evaluar diferentes condiciones. Finalmente, el desarrollo embrionario de *X. laevis* no contempla prolongados periodos de tiempo para alcanzar los estadios deseados en esta tesis. De hecho, el proceso de neurulación es alcanzado aproximadamente a las 14 horas post fertilización (Nieuwkoop & Faber, 1994).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Hipótesis

La adquisición de motivos endocíticos y residuos con carga en regiones transmembrana, le confieren a los VGLUTs la capacidad de transportar glutamato y regular la endocitosis de las vesículas sinápticas, vital para el surgimiento evolutivo de la señalización glutamatérgica y su participación en la neurulación del cordado *Xenopus laevis*.

3. Objetivos

Con la intención de abordar la hipótesis presentada, se han planteado los siguientes objetivos:

3.1 Objetivo general

Evaluar el origen filogénico y ontogénico dentro del sistema nervioso del transporte vesicular de glutamato utilizando embriones del cordado *X. laevis*.

3.2 Objetivos específicos

1. Estudiar la aparición de motivos endocíticos y residuos de interacción con glutamato en proteínas ortólogas de VGLUT1.
2. Evaluar la participación de VGLUT1 durante neurulación mediante bloqueo farmacológico en embriones de *X. laevis*.

METODOLOGÍA

4.1 Obtención de secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia de transportadores SLC17 en especies eucariontes

Los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs) pertenecen a la familia transportadora de solutos SCL17 (Liguz-Lecznar & Skangiel-Kramska, 2007; Reimer, 2013). Por lo tanto, para entender el origen evolutivo de motivos endocíticos y residuos de interacción de glutamato en estas proteínas es que realizamos una búsqueda de secuencias homólogas a VGLUT en una base de datos personalizada, la que consiste en las secuencias de proteínas provenientes de 110 especies eucariontes. Las secuencias de proteínas fueron descargadas desde las siguientes bases de datos y repositorios: Ensembl Vertebrate, Ensembl Metazoa, OIST Marine Genomics, AXOLOTL-OMICS, Xenbase, JGI Genome Portal, Amphiencode, Genoscope, Echinobase, WormBase Parasite, NCBI, Ensembl Tardigrades, Srivastaba Lab, Compagen, Neurobase, Ensembl Protist, Ensembl Fungi, Ensembl Plants, Joint Genome Institute y Cannabis Genome Browser.

La búsqueda de proteínas homólogas de VGLUTs fue realizada mediante la herramienta bioinformática BLAST+ v2.9.0-2. (Camacho et al., 2009) y miembros de la familia de transportadores de soluto SLC17 *Homo sapiens* (humano): SLC17A1 (UniProt: Q14916), SLC17A2 (UniProt: O00624), SLC17A3 (UniProt: O00476), SLC17A4 (UniProt: Q9Y2C5), SLC17A5 (UniProt: Q9NRA2), SLC17A6 (UniProt: Q9P2U8), SLC17A7 (UniProt: Q9P2U7),

SLC17A8 (UniProt: Q8NDX2) y SLC17A9 (UniProt: Q9BYT1). Esta búsqueda sistemática se llevó a cabo utilizando un valor de umbral de $1e^{-6}$. Las secuencia de proteínas con similitud a miembros de la familia SLC17 fueron analizadas con el programa InterProScan v5.44-79.0 (Jones et al., 2014), y aquellas proteínas que poseían el dominio PANTHER (PTHR11662), correspondiente a la familia de transportadores de soluto SLC17, fueron usados para análisis posteriores.

4.2 Análisis filogenéticos

Las secuencias de proteínas que pasaron los filtros anteriores fueron utilizadas para realizar alineamientos múltiples de secuencias con el programa MUSCLE v3.8.1551 (Edgar, 2004). Los alineamientos fueron editados para retener las regiones conservadas y con señal filogenética informativa con el programa TrimAl v1.2 (Capella-Gutierrez et al., 2009). Finalmente, el mejor modelo de sustitución de aminoácidos para los alineamientos múltiple de VGLUTs fueron seleccionado utilizando el programa ProtTest v3.6 (Satpathy et al., 2005), usando parámetros por defecto.

Inicialmente, se realizó una reconstrucción filogenética del tipo Máxima Verosimilitud (MV) con el fin de determinar las relaciones filogenéticas entre los miembros de la familia de transportadores de soluto SCL17 en todas las especies bajo estudio. Este análisis se realizó mediante el programa RAxML v8.2.12 (Stamatakis, 2014), con 350 réplicas de bootstrap y el modelo de sustitución de aminoácidos LG+G que fue determinado ProtTest. Finalmente, el

árbol filogenético resultante fue visualizado en el programa Figtree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Aquellas proteínas que se agrupaban en el mismo clado que las proteínas VGLUTs, fueron extraídas y analizadas nuevamente mediante filogenia del tipo Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB). Para enraizar el árbol filogenético de las proteínas VGLUTs, se utilizaron las secuencias de proteínas pertenecientes a Sialina (SLC17A5) como grupo externo. Los análisis de MV fueron realizados con el programa RAxML v8.2.12 junto con el modelo de sustitución de aminoácidos LG+I+G determinado por ProtTest v3.6. El apoyo estadístico para las diferentes ramas internas se evaluó mediante remuestreo bootstrap (100 repeticiones). Para este mismo set de datos, se realizaron análisis de IB con el programa MrBayes v3.2.7a (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003) y el modelo de sustitución de aminoácidos LG+I+G que fue determinado por ProtTest v3.6. Los análisis de Inferencia Bayesiana fueron realizados en dos corridas independientes, cada una con cuatro cadenas de Markov y 25.000.000 de generaciones para alcanzar convergencia. Los árboles filogenéticos obtenidos en las dos corridas independientes se concatenaron y los primeros árboles filogenéticos, correspondientes al 25% del total, fueron descartados como “*burnin*” para generar un árbol filogenético consenso. Las probabilidades posteriores en cada rama interna del árbol filogenético consenso se utilizaron como medida de sustento estadístico de cada clado. Finalmente, tanto los árboles filogenéticos obtenidos con el método de reconstrucción filogenética Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana fueron visualizados con el programa FigTree.

4.3 Búsqueda de motivos endocíticos y residuos funcionales

Los motivos di-leucina-like y poli-prolina fueron identificados en las secuencias de proteínas mediante la presencia de las siguientes expresiones regulares: [DE]xxx[VLAIF][VALIF] para el motivo di-leucina-like; y PPxPPx[DE] para el motivo poli-prolina. Estas expresiones regulares fueron buscadas en todas las secuencias correspondiente a VGLUTs, y que fueron corroboradas por los análisis filogenéticos anteriores, mediante el script `protein_motif_searching.pl` (Thiel et al., 2018) (https://github.com/faguil/protein-motif-searching_neuropeptides).

Aquellas secuencias de proteínas con la presencia de una o ambas expresiones regulares antes mencionadas fueron alineadas con el programa MAFFT v7.475 (Kato & Standley, 2013), y nos enfocamos en las regiones C-terminal y N-terminal de las proteínas para determinar la presencia de estos motivos. Finalmente, las secuencias de proteínas que cumplieron los requisitos mencionados fueron analizadas para establecer la presencia de dominios transmembranales con el programa TMHMM 2.0c (Krogh et al., 2001), con el fin de determinar las dimensiones de los dominios transmembranales de dichas proteínas y cuál(es) dominios transmembranales albergan estos motivos endocíticos.

Los datos obtenidos por el script `protein_motif_searching.pl`, los alineamientos del programa MAFFT y las predicciones de dominios transmembranales del programa TMHMM fueron cruzados para descartar posibles falsos-positivos arrojados por el script `protein_motif_searching.pl`. En este proceso,

se utilizó el comienzo del primer dominio transmembranal (TM) para establecer el fin de las regiones N-terminal, y el final del último TM de cada proteína para determinar el comienzo de las regiones C-terminal. Con estos criterios, se establecieron si existen semejanzas estructurales con los resultados del script `protein_motif_searching.pl`. Los residuos que interaccionan con glutamato en las proteínas VGLUTs han sido descritos previamente (Li et al., 2020; Pietrancosta et al., 2020). Con esta información, nos enfocamos en determinar su localización en las proteínas VGLUTs identificadas en las diferentes especies analizadas. Para ello, los alineamientos múltiples de secuencias utilizados previamente fueron empleados para buscar la localización de estos dos residuos (en VGLUT1, R80 en el dominio transmembrana 1 y R314 en el dominio transmembrana 7). También buscamos los residuos de unión de H⁺ (E183) y unión de Cl⁻ (R176) presentes en el dominio transmembrana 4 de la proteína VGLUT1, los cuales han sido reportado que están involucrados en la regulación del tamaño quantal ("*quantal size*"). En esta tesis, la presencia de un motivo o residuo en un miembro de cada especie indicaría su presencia en el último ancestro común para el grupo que abarcan estas especies, mientras que la ausencia de estos motivos o residuos se explicaría por una pérdida independiente de estos caracteres.

4.4 Predicción de interacción endocítica

Para establecer que los motivos endocíticos encontrados de manera bioinformática en las secuencias de proteínas de VGLUT en las especies analizadas tienen una función similar a los descritos en la literatura para VGLUTs

(Foss et al., 2013; Li et al., 2017; Santos et al., 2014; Voglmaier et al., 2006), se realizaron predicciones estructurales usando como referencia un motivo di-leucina cristalizado con su interacción con el complejo adaptador 2 (AP-2) [PDB: 2JKR]. Se modelaron los motivos di-leucina-like de humano (*H. sapiens*), mosca (*Drosophila melanogaster*), rana africana (*X. laevis*), erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*), ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), y el acoela (*Hofstenia miamia*) usando Modeller v9.24 (Eswar et al., 2006). El análisis de interacción molecular (“*molecular docking*”) fue realizado con el programa AutoDockVina v4.0 (Huey et al., 2007; Morris et al., 2009). El docking molecular fue realizado de manera ciega; es decir, permitiendo que el ligando (el motivo di-leucine-like) busque la mejor interacción con la totalidad del receptor (la proteína AP-2). En total, se realizaron 5 réplicas de cada interacción, y se seleccionó la interacción con menor valor de energía (ΔG) de cada réplica. Este proceso fue realizado para cada una de las especies antes mencionadas.

4.5 Obtención de embriones de *Xenopus laevis*

La colección de embriones de *X. laevis* fue realizada por medio de fertilización *in vitro*, según la metodología descrita por Sive et al., 2000. La colección de gónadas masculinas se realizó a través del sacrificio de una rana macho previamente anestesiada con benzocaína 5%. Las gónadas colectadas se mantuvieron en una solución de Suero de bobino fetal (FBS) al 10% con 5 uL de una solución stock de antibiótico penicilina/estreptoavidina. Para obtención de gónada femenina, hembras fueron pre-estimuladas con 30-50 μ L de

hormona coriónica humana (hCG). Un día antes de la fertilización, la inducción de crecimiento de gametos femeninos se realizó con una inyección de 350-500 μ L de hCG.

Los ovocitos maduros fueron colectados en una placa Petri conteniendo una solución de Marc's Modified Ringer's (MMR) (Ubbels et al., 1983) y fueron fertilizados con un trozo de gónada masculina (1/4 del total), la cual fue diseminada y mezclada con los huevos. Luego de transcurrida una hora post-fertilización se desgelatinizaron los embriones ocupando una solución de L-cisteína al 2% (Merck, Cat. 168149). Los embriones ahora limpios fueron mantenidos en solución MMR 10%, a una temperatura constante de 18°C hasta obtener los estadios de desarrollo necesario para el desarrollo de esta tesis.

4.6 Tratamientos farmacológicos e incidencia de defectos del tubo neural NTDs

Al alcanzar el estadio 12.5 o comienzo de neurulación, es decir, transcurridas 12 horas post fertilización (hpf) (Nieuwkoop & Faber, 1994), 10 embriones fueron colocados en placas Petri conteniendo el bloqueador específico de VGLUTs, conocido como Rose Bengal (RB) (MERCK Cat. 330000) (Pietrancosta et al., 2010; Thompson & Chao, 2020), en concentraciones crecientes de 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 μ M. Transcurridas 7 horas de tratamiento los embriones fueron retirados de la placa que contiene la droga y fueron depositados en MMR 10%. Finalmente, las fotografías para el análisis de los embriones fueron obtenidas usando la lupa NIKON (modelo SMZ25).

La incidencia de defectos del tubo neural (NTDs) se estableció mediante el análisis visual del daño en el desarrollo del tubo neural inducido por la droga Rose Bengal. Para ello, los fenotipos con malformaciones fueron definidos como aquellos que presentaban un cierre incompleto del tubo neural en comparación al proceso normal que se logra a las 22 horas post-fertilización, correspondiente al estadio 20 del desarrollo de *X. laevis*.

La severidad de la apertura del tubo neural se estableció midiendo la longitud alcanzada por el cierre del tubo neural en embriones pertenecientes al grupo control y aquellos tratados farmacológicos que alcanzaron las 20 horas post-fertilización. Para ello, al menos 3 embriones por condición fueron fotografiados bajo lupa (Nikon SMZ25) a la misma amplificación y posición (lado posterior hacia el foco); adicionalmente, una regla milimétrica fue fotografiada en la misma amplificación para calibrar las medidas. Las fotografías obtenidas en cada condición y junto con las fotografías de la regla milimétrica fueron analizadas con el software ImageJ (v1.43m) (Schindelin et al., 2012). Para ello, se estandarizó 1 mm a partir de la regla obtenida y se midieron las longitudes de los tubos neurales en la zona medial del dorso del embrión. Los cambios en la migración de las células en los embriones fueron documentados a través de fotografías del proceso de neurulación, obteniendo fotografías cada 60 segundos. Los lapsos de tiempo (*time-lapse*) obtenidos fueron analizados con el programa ImageJ (v1.43m) y el seguimiento de al menos 9 células pigmentadas se realizó en cada lado del embrión, tanto en la condición control como en el tratamiento a una concentración de 3 μ M de RB.

4.7 Comportamiento epileptogénico

Para establecer los cambios que genera el bloqueo parcial de VGLUTs usando RB durante neurulación, embriones de *X. laevis* fueron tratados a una concentración que no generaban malformaciones en el desarrollo normal del tubo neural (1 μ M) durante todo el proceso de neurulación. Una vez terminada la neurulación, se retiró la droga y los embriones fueron mantenidos en solución de MMR 10% hasta alcanzar el estadio de renacuajo (72 hpf). Posteriormente, los embriones controles fueron tratados con concentraciones de 7, 10 y 15 mM de Pentilenotetrazol (PTZ), el cual es un fármaco estimulante del sistema nervioso capaz de generar reacciones epilépticas (James et al., 2015), para establecer el tiempo en que los embriones se demoraban en tener una convulsión. Según literatura previa (Bell et al., 2011; James et al., 2015), se estableció que la torción de la cola del embrión hasta chocar con su cabeza, formando una "C", correspondería al momento en el cual el embrión presenta un episodio de epilepsia.

Una vez establecida la concentración ideal para los experimentos de comportamiento epileptogénico, al menos 3 embriones por condición, grupo control y tratamientos con RB 1 μ M durante neurulación, fueron tratados con 10 mM de PTZ luego de transcurridos 3 minutos de grabación. A los 10 minutos de grabación, los embriones en ambas condiciones (control y tratamientos) fueron retirados y puestos en solución de MMR 10% para su descanso; dichos embriones no fueron utilizados para posteriores experimentos.

RESULTADOS

5.1. Historia evolutiva de ortólogos de SLC17 en eucariontes

5.1.1. Análisis filogenético de los miembros de la familia SLC17

En esta tesis, se lleva a cabo un análisis exhaustivo y sistemático en 110 genomas de eucariontes con el fin de identificar proteínas homólogas a los diferentes miembros de la familia de transportadores de soluto SCL17. Los análisis de similitud de secuencias con el algoritmo BLASTp arrojó un total de 898 secuencias, de las cuales 536 de ellas tenían el dominio PANTHER (PTHR11662) correspondiente a la familia de transportadores de soluto SLC17.

El alineamiento múltiple de estas 536 secuencias de proteínas y su posterior procesamiento permitió la generación de un árbol filogenético del tipo Máxima Verosimilitud (Figura 7, y Figura Suplementaria 1). Por razones de claridad, la Figura 7A muestra la distribución filogenética de los diferentes miembros de la familia SCL17 en diversos grupos taxonómicos de especies eucariontes. Para mayores detalles ver la Figura Suplementaria 1. Cada triángulo indica los miembros de la familia SCL17 y las diferentes especies pertenecientes a un grupo taxonómico en particular en cada miembro. Por ejemplo, en color negro se indican las proteínas SLC17A1-4 (transportadores de fosfatos) que están presentes en diversas especies del grupo taxonómico Metazoa (animales); en color rojo se indican las proteínas SLC17A5 (sialina) que están

presentes en diferentes especies del grupo taxonómico Choanozoa (coanoflagelados + animales); en color verde se indican las proteínas SLC17A9 (VNUTs) que están presentes en diversas especies del grupo taxonómico Choanozoa (coanoflagelados + animales), y en color calipso se indican las proteínas Transportadoras de Aniones que están presentes en diversas especies del grupo taxonómico Plantae (plantas).

Interesantemente, según los análisis relacionados a la presencia de motivos endocíticos (Figura 8), los transportadores de glutamato, clasificados como SLC17A6-8 (transportadores vesiculares de glutamato - VGLUTs) por bases de datos convencionales, pareciera corresponder a transportadores de glutamato pero que pueden ser tanto vesiculares como no vesiculares (Figura 7A). Con esto en mente, en la Figura 7A se muestra en color café las proteínas transportadoras de glutamato no vesicular (GluT) que están presentes en diversas especies del grupo taxonómico Eumetazoa (cnidarios + animales bilaterados), mientras que los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs) están presentes en diversas especies del grupo taxonómico Bilateria (animales bilaterados) y representados por el triángulo amarillo (Figura 7A).

La distribución filogénica mostrada en la Figura 7A permitió determinar el origen evolutivo de cada uno de los miembros de la familia SLC17 (Figura 7B). La presencia de transportadores de aniones exclusivamente en plantas podría indicar que dicha función corresponde a la función más ancestral de la familia de transportadores de soluto SCL17. El origen evolutivo de los miem-

bros SLC17A5 (sialina) y SLC17A9 (VNUT) radica en el último ancestro común de Choanozoa (coanoflagelados + animales), mientras que el surgimiento de los transportadores de fosfato pareciera haber ocurrido en los albores de los metazoos (animales). Por otro lado, el origen evolutivo de los transportadores de glutamato no vesicular se remonta al último ancestro común de Eumetazoa (cnidarios + animales bilaterados), mientras que el surgimiento de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT) puede ser rastreado hasta el último ancestro común de Bilateria (animales bilaterados). Interesantemente, no se encontró ninguna proteína homóloga de la familia de transportadores de soluto SCL17 en las diferentes especies de hongos (Fungi) y ctenóforos (Ctenophora) analizadas en este estudio.



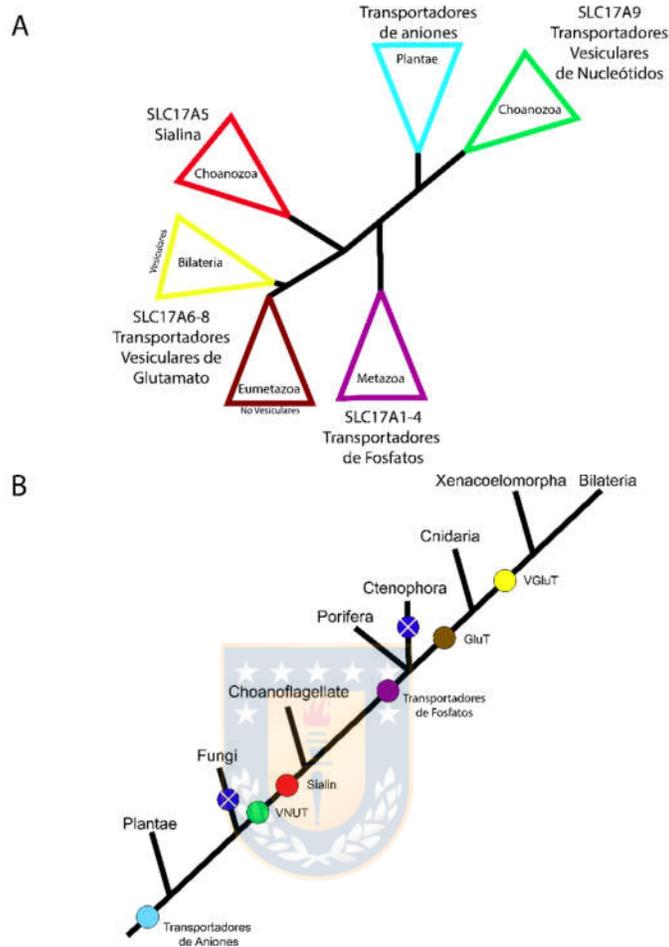


Figura 7. Distribución filogenética y origen evolutivo de los miembros de la familia de transportadores de soluto SLC17. **(A)** Distribución filogenética de miembros de la familia SLC17, indicando los grupos taxonómicos a los cuales pertenecen las especies que contienen este tipo de proteínas. **(B)** Cladograma representando el origen evolutivo de los miembros de la familia SCL17. Cada círculo representa el origen evolutivo de los diferentes miembros de la familia SCL17, además de proteínas afines a esta familia (transportadores de aniones – círculo calipso). El círculo verde representa el origen de las proteínas VNUTs (SCL17A9), el círculo rojo representa el origen de las proteínas Sialina (SCL17A5), el círculo negro representa el origen de las proteínas transportadoras de fosfato (SCLA1-4), el círculo café representa el origen de las proteínas transportadoras de glutamato no vesicular (GluTs), mientras que el círculo amarillo representa el origen de las proteínas transportadoras de glutamato vesicular (VGLuTs). Ambos tipos de transportadores de glutamato (vesicular y no vesicular) corresponden al miembro de la familia SCL17 conocido SCL17A6-8. Los círculos azules representan la ausencia de todos los miembros de la familia de SLC17 en esos grupos taxonómicos.

5.1.2. Evolución de los transportadores de glutamato en animales

Las secuencias de proteínas que correspondían a transportadores de glutamato vesicular y no vesicular (Figura 7) fueron utilizadas para realizar

análisis filogenéticos posteriores. En este caso se utilizaron 296 secuencias de proteínas, las cuales se organizaron en 3 grandes grupos (Figura 8 y Figura Suplementaria 2). En primer lugar, se formó un clado con un valor de soporte estadístico de bootstrap de 40% (MV) y probabilidad posterior de 0,9992 (IB), que contiene exclusivamente transportadores de glutamato no vesiculares ya que no presentan motivos di-leucina indicando la incapacidad de realizar el reciclaje vesicular (Foss et al., 2013; Kelly et al., 2008). Este nuevo grupo de transportadores de glutamato no vesiculares, pero que pertenecen a la familia SCL17 según nuestros análisis, no ha sido reportado anteriormente, lo que indica el grado de diversidad en términos de funcionalidad que tiene esta familia de transportadores. Dentro de este clado de transportadores de glutamato no vesicular, se encuentran especies de diferentes grupos taxonómicos, incluyendo Spiralia (moluscos), Ecdysozoa (artrópodos) y Cnidaria (cnidarios). El segundo grupo formado corresponde a transportadores de glutamato presentes en diferentes especies de no vertebrados perteneciente a los siguientes grupos taxonómicos: Urochordata, Cephalochordata, Hemichordata, Echinodermata, Spiralia, Ecdysozoa, Xenacoelomorpha, y Cnidaria. Este grupo tiene valores de bootstrap de 24% (MV) y probabilidad posterior de 0,9962 (IB), y es el más diverso ya que involucra transportadores de glutamato tanto vesiculares como no vesiculares. Finalmente, existe un tercer grupo filogenético que alberga exclusivamente transportadores de glutamato vesicular (VGLUTs) (44% MV; probabilidad posterior 0,632 IB), los que son específicos de especies de vertebrados. En este grupo podemos encontrar las proteínas

VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3, las que han sido descritas como los tres miembros de la familia SLC17 que transportan glutamato (Liguz-Leczna & Skangiel-Kramaska, 2007).

La evolución posterior de los transportadores de glutamato en animales se caracteriza por la pérdida de uno o más de los tipos de transportadores identificados (vesiculares o no vesiculares), además de la expansión de estos de manera linaje-específica.

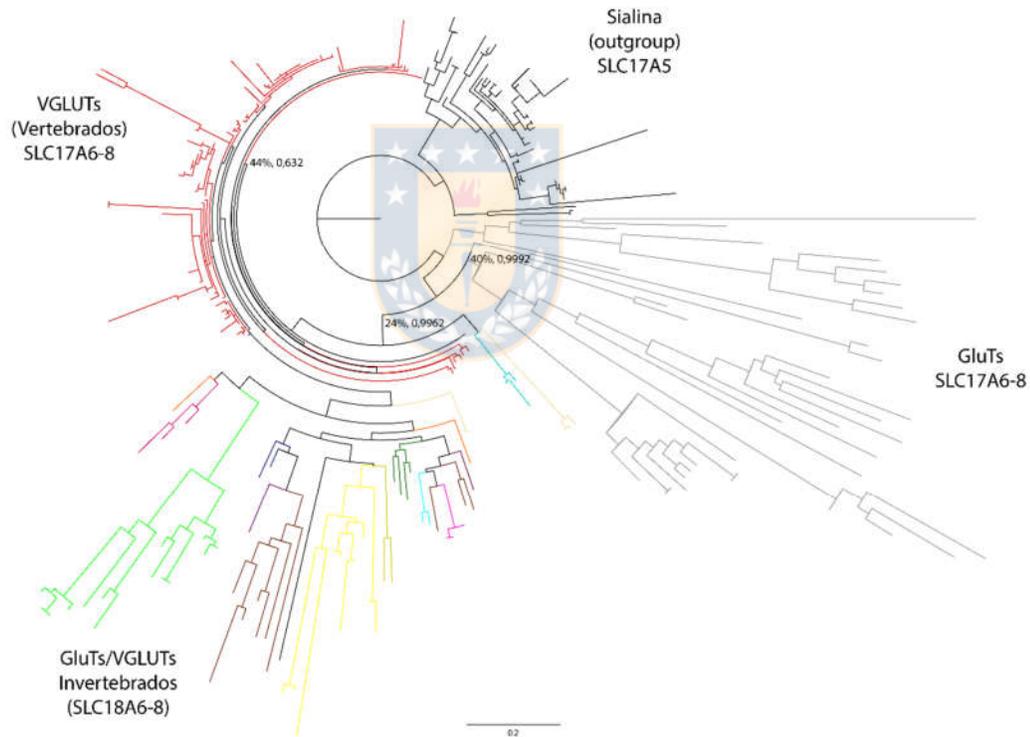


Figura 8. Árbol filogenético basado en análisis de Máxima Verosimilitud de las proteínas transportadoras de glutamato en animales. El soporte estadístico basado en porcentaje de bootstrap (MV) y las probabilidades posteriores (IB) se indican en los nodos que dan a lugar a los diferentes grupos de transportadores de glutamato. Ver Figura Suplementaria 2 para el análisis filogenético basado en Inferencia Bayesiana. Las especies se etiquetaron de acuerdo con un código de color específico de la siguiente manera: rojo (Vertebrata), rosado (Urochordata), amarillo (Cephalochordata), naranja (Hemichordata), morado (Echinodermata), café (Ecdysozoa), verde (Spiralia), azul (Xenacoelomorpha), y negro (Cnidaria). El largo de cada rama indica el número de sustituciones por sitio para secuencia analizada.

5.2. Evolución de las firmas moleculares de los transportadores de glutamato en animales

5.2.1. Evolución de los residuos involucrados en la interacción con glutamato

Recientemente, se ha obtenido por cristalografía la estructura tridimensional del transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2) (Chen et al., 2021; F. Li et al., 2020) En dicho artículo se describen diferentes residuos que establecen la funcionalidad de VGLUT2 para unir glutamato y movilizarlo al interior de la vesícula, siendo los residuos R88 y R322 los que interaccionan con glutamato (Li et al., 2020).

Un análisis comparativo de las secuencias de proteínas, enfocado en las diferentes firmas moleculares previamente reportadas para los transportadores de glutamato (Almqvist et al., 2007; Chang et al., 2018; Li et al., 2020; Martineau et al., 2017), permitió identificar que la señalización de glutamato a través de la unión de este neurotransmisor por transportadores específicos probablemente ocurre desde animales con un sistema nervioso sencillo (cnidarios) hasta animales con un sistema nervioso más complejo (animales bilaterales), ya que las especies analizadas en esta tesis presentaban a lo menos uno de los residuos identificados como lo responsables de unir glutamato (Li et al., 2020) (Figura 9).

5.2.2. Evolución residuos de regulación con glutamato

Dentro de los dominios transmembrana de VGLUTs, existen distintos residuos que presentan afinidad por iones, los que regulan la tasa de llenado de la vesícula (Byland et al., 2007; Foss et al., 2013). Por ejemplo, en VGLUT1

los residuos encargados de la regulación del llenado vesicular mediado por iones cloruro y protones corresponden a E183 y R176 (Chen et al., 2021). Nuestro análisis comparativo reveló la presencia de estos residuos reguladores en especies representantes de prácticamente todos los grupos taxonómicos de animales, con la excepción de especies del grupo taxonómico Nematoda (nemátodos) donde no se encuentran presentes los residuos reguladores de cloruro y protones, así como especies del grupo taxonómico Tardigrada (tardígrados), las cuales no poseen el residuo regulador asociado a cloruro (Figura 9).

5.2.3. Evolución de los motivos endocíticos di-leucina-like involucrados en el reciclaje vesicular de glutamato

El reciclaje vesicular de glutamato está regulado por la interacción de proteínas encargadas del tráfico de proteínas conocidas como proteínas adaptadoras (AP) (Kadlecova et al., 2017; Li et al., 2017). Para que ocurra el reciclaje vesicular es necesario la interacción de las proteínas AP con motivos di-leucina (Byland et al., 2007; Foss et al., 2013). Esta interacción permite el reclutamiento de factores de formación de vesículas, tales como clatrina y endofilina (Milosevic, 2018; Zhang et al., 2019). En el caso de VGLUTs, se ha descrito la interacción con complejos de proteínas adaptadoras AP-2 y AP-3 mediante la participación de motivos similares a di-leucina, conocidos como di-leucina-like y que tiene conformación [DE]xxxLL (Byland et al., 2007; Foss et al., 2013; Kadlecova et al., 2017; Kelly et al., 2008). Por ejemplo, en los

humanos, las proteínas VGLUTs poseen 2 motivos di-leucina-like en el extremo N-terminal (EFRKLA y KLHRL) y 1 motivo de este tipo en el extremo C-terminal (EKCGFV) (Foss et al., 2013; H. Li et al., 2017).

Además, se ha reportado que la presencia de al menos uno de estos motivos di-leucina-like permite el reciclaje vesicular de glutamato (Foss et al., 2013). Con esto en mente, en nuestros análisis comparativos también nos enfocamos en determinar la presencia de motivos di-leucina-like y poder determinar la capacidad de reciclaje de los transportadores de glutamato en diferentes grupos taxonómicos. Nuestros resultados indican que a lo menos un motivo endocítico del tipo di-leucina-like se encuentra presente en los diferentes grupos taxonómicos de animales bilaterados (Figura 9). No obstante, este patrón no es conservado en todos los grupos taxonómicos ya que nuestros análisis no revelaron la presencia de motivos di-leucina-like, tanto en los extremos N-terminal como C-terminal, en las proteínas pertenecientes a especies de hemicordados (Hemichordata), anélidos (Annelida), rotíferos (Rotifera), y nemátodos (Nematoda). Tampoco encontramos la presencia de motivos di-leucina-like en especies de cnidarios (Cnidaria) (Figura 9).

Estos resultados, junto con los análisis filogenéticos (Figura 7 y Figura 8), corroboran que el surgimiento de la capacidad de reciclaje vesicular de los transportadores de glutamato es una innovación de animales bilaterados (Bilateria). De esta manera, hemos descrito en términos evolutivos como proteínas transportadoras de glutamato no vesiculares (GluTs) adquieren motivos

endocíticos que permiten el transporte de glutamato a través de vesículas (VGLUTs).

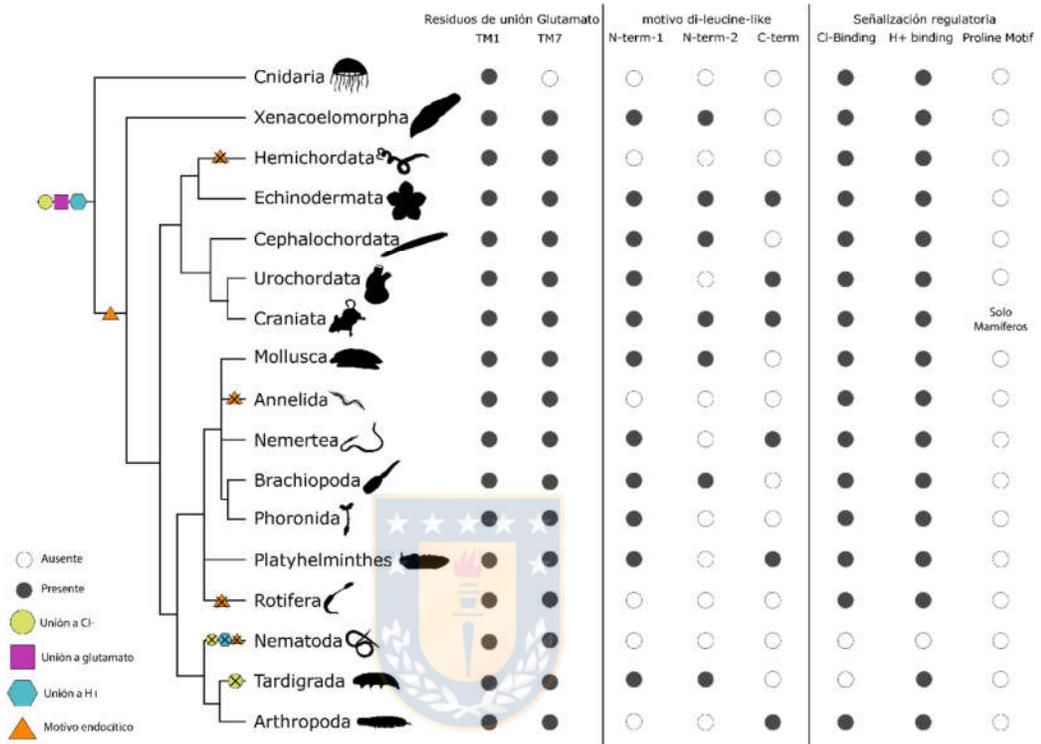


Figura 9. Firmas moleculares presentes en las proteínas transportadoras de glutamato. Distribución de las diferentes firmas moleculares, incluyendo residuos de unión a glutamato (cuadrado morado), motivos endocíticos di-leucina-like (triángulo naranja), residuos reguladores de cloruro (círculo amarillo) y protones (rombo calipso), y motivo poli-prolina, a lo largo de la evolución de los animales. Los círculos azules indican la presencia de las diferentes firmas moleculares en los diferentes grupos taxonómicos, mientras que los círculos blancos indican la ausencia de estas firmas. En la izquierda se muestra un cladograma con las relaciones filogenéticas de los distintos grupos taxonómicos de animales. En dicho cladograma se indica cuando fue la aparición de las diferentes firmas moleculares, así como las pérdidas de algunas de ellas en diferentes grupos taxonómicos, las que son representadas por cruces negras. Las siluetas de los organismos representantes de cada grupo taxonómico de animales fueron obtenidas desde PhyloPic (www.phylopic.org).

5.2.4. Evolución del motivo poli-prolina en VGLUT1.

La regulación de la frecuencia de liberación espontánea de vesículas sinápticas glutamatérgicas, así como la cantidad de vesículas dispuestas en el botón sináptico, están mediadas por la capacidad de formar y reciclar vesículas cargadas con glutamato, proceso que utiliza las proteínas VGLUTs para

su llenado (Zhang et al., 2019). En mamíferos se ha descrito que un motivo presente en el extremo C-terminal de la proteína VGLUT1, pero no en VGLUT2 y VGLUT3 permitiría la regulación de este proceso (Santos et al., 2014; Voglmaier et al., 2006). Este motivo se conoce como motivo poli-prolina y corresponde a una secuencia de al menos cuatro prolinas ubicadas secuencialmente, las que permiten el reclutamiento de factores formadores de vesículas, tales como la endofilina-A1 e intersectina-1 (Saksela & Permi, 2012; Szaszák et al., 2002; Zhang et al., 2019). También, se ha descrito, que, junto con las prolinas, es necesario la presencia de un residuo cargado positivamente, seguido de este motivo, para su correcto funcionamiento (Saksela & Permi, 2012)

Con lo anterior en mente, nos enfocamos en buscar motivos poli-prolina en los extremos C-terminal de las proteínas transportadoras de glutamato, tanto vesicular como no vesicular. Los análisis comparativos indican la presencia de 1 o 2 motivos, dependiendo de la especie analizada, poli-prolina(s) en el extremo C-terminal de las proteínas anotadas como VGLUT1, pero no en aquellas anotadas como VGLUT2 y VGLUT3 (Figura 10). Interesantemente, la presencia de estos motivos poli-prolina solamente fueron encontrados en especies de mamíferos, lo que ratifica lo antes publicado (Foss et al., 2013; Voglmaier et al., 2006) y sugeriría que proteínas transportadoras de glutamato con esta firma molecular estarían presentes en especies con sistemas nerviosos más condensados y centralizados. (Figura 10).

```

Hsap-VGLUT1 MSEEKCGFVGHQDLAGSDSEMEDEAEPPGAPPAPPPSYGAT-----HSTFQPPRPPPPVRYDY---- 560
Mmus-VGLUT1 MSEEKCGFVGHQDLAGSDSEMEDEAEPPGAPPAPPPSYGAT-----HSTVQPPRPPPPVRYDY---- 560
Hsap-VGLUT2 TSEEKCGFIHEDELD--EETGDITQNY---INYGTTKSYGATTQANGGWPSPGWEKKEEFVQGEVQDHSYKDRVDYS--- 582
Mmus-VGLUT2 TSEEKCGFIHEDELD--EETGDITQNY---INYGTTKSYGATSQENGGWPNGWEKKEEFVQEGAQDAYTYKDRDDYS--- 582
Hsap-VGLUT3 LSEEKCGIIDQDELA--EEIELNHESF---ASPKKMSYGATSNCEVQKKEWKGQRGATLDEEELTSYQNEERNFSTIS 589
Mmus-VGLUT3 LSEDKCGIIDQDELA--EETELNHETF---VSPRKKMSYGATTQCEVQKTEWRQQRRESAFD--GEEPLSYQAEGDFSETS 601
Xlae-VGLUT1 TSDEKCGFIHEDELA--DEEEQTQAH---GGYGSYGATQTTSQNGGWATDWEKKDEFIQDQGKDPYLYGTVAERDLS- 576
Xlae-VGLUT2 TSDEKCGFINEDELA--EEAGDISQNY---INYGTTKSYGATTQMNTGWPNG---GEEGVQDQGESFHYQEE-NYS--- 524
Xlae-VGLUT3 LSEDKCGIIDNDELQ--EETELNNEF---ASPNNKSSYGATIHSNETRRKGWRSKKEMTQDIDEQNFYQHENGNSDLS- 586
    
```

Figura 10. Alineamiento del extremo C-terminal de proteínas transportadoras de glutamato en diferentes especies de mamíferos y anfibios. En verde se presenta el motivo di-leucina presente en el dominio C-terminal de VGLUTs. La presencia de motivos poli-prolina es destacada en azul. El residuo cargado positivamente y que indica su naturaleza catiónica está indicado en rojo. La ausencia del residuo cargado en el primer motivo poli-prolina explicaría la funcionalidad de solo el segundo motivo poli-prolina en VGLUT1. Por otro lado, VGLUT2 y VGLUT3 de todas las especies no presentan dicho motivo.

5.3. Determinación de la posible funcionalidad de los motivos di-leucina en VGLUTs de especies animales

5.3.1. Análisis de interacción del motivo di-leucina-like de las proteínas transportadoras de glutamato y el complejo adaptador AP-2.

Para establecer la posible funcionalidad de los motivos di-leucina-like encontrados en esta investigación de las proteínas transportadoras de glutamato de las distintas especies de animales analizadas, nos propusimos estudiar la interacción molecular de estos motivos con la proteína AP-2. Para ello, se realizaron predicciones de interacción molecular usando como modelo una estructura cristalizada de la proteína AP-2 en *Mus musculus* [PDB: 2JKR] (Byland et al., 2007; Kelly et al., 2008) y los motivos di-leucina-like de algunas especies representativas de los diferentes grupos taxonómicos de animales utilizados en esta tesis. Decidimos utilizar la estructura cristalizada [PDB: 2JKR] porque se ha descrito un modelo de interacción de un motivo di-leucina (LL) proveniente desde la molécula CD4, y el complejo AP-2 (Kelly et al., 2008), y así se ha descrito la importancia de un bolsillo hidrofóbico conformado

en AP-2 que contiene los aminoácidos V88, V98, Y62, los cuales interaccionan con los residuos apolares en el motivo di-leucina (LL) (Kelly et al., 2008).

Con esto en mente, realizamos distintos “*docking*” ciegos para determinar la interacción molecular del motivo di-leucina-like con la totalidad de la proteína AP-2 (Figura 11 y Tabla Suplementaria 1). La interacción entre el motivo di-leucina-like de VGLUT1 de humanos y la proteína AP-2 entregó que la mejor interacción probable de este motivo ocurriría en el mismo bolsillo hidrofóbico descrito previamente (Kelly et al., 2008), interaccionando con los mismos residuos antes mencionados (Figura 11A).

Del mismo modo, los “*docking*” ciegos de los motivos di-leucina-like de *X. laevis* (Vertebrata), *Drosophila melanogaster* (Ecdyzoa), y *Crassostrea gigas* (Spiralia) con la proteína AP-2 de *M. musculus* ([PDB: 2JKR]), presentaron la misma conformación espacial en el bolsillo hidrofóbico (Figura 11A, 11B, 11C, 11D). Asimismo, las interacciones moleculares entre el motivo di-leucina-like de la especie de animal evolutivamente basal a Bilateria, *Hofstenia miamia* – Xenacoelomorfa, y la proteína AP-2 muestran que ocurriría la misma interacción que en las otras especies analizadas, sugiriendo la formación de enlaces hidrofóbicos con los residuos de AP-2 (Figura 11E) y el posible rol funcional de estos motivos di-leucina-like en el transporte de glutamato a través de vesículas en el ancestro común de los animales bilaterados hace unos 545 millones de años atrás (Erwin & Davidson, 2002). Por lo tanto, se concluye que los motivos di-leucina-like encontrados en las distintas especies pertenecientes a los diferentes grupos taxonómicos de los animales, aunque

varíen en su composición aminoacídica, presentan una naturaleza similar permitiendo la interacción con el complejo adaptador AP-2. Así, sería posible la participación de proteínas transportadoras con la capacidad de almacenar glutamato en vesículas (VGLUTs), una característica que está presente en una amplia gama de especies de animales que observamos hoy en día (Figura 9).



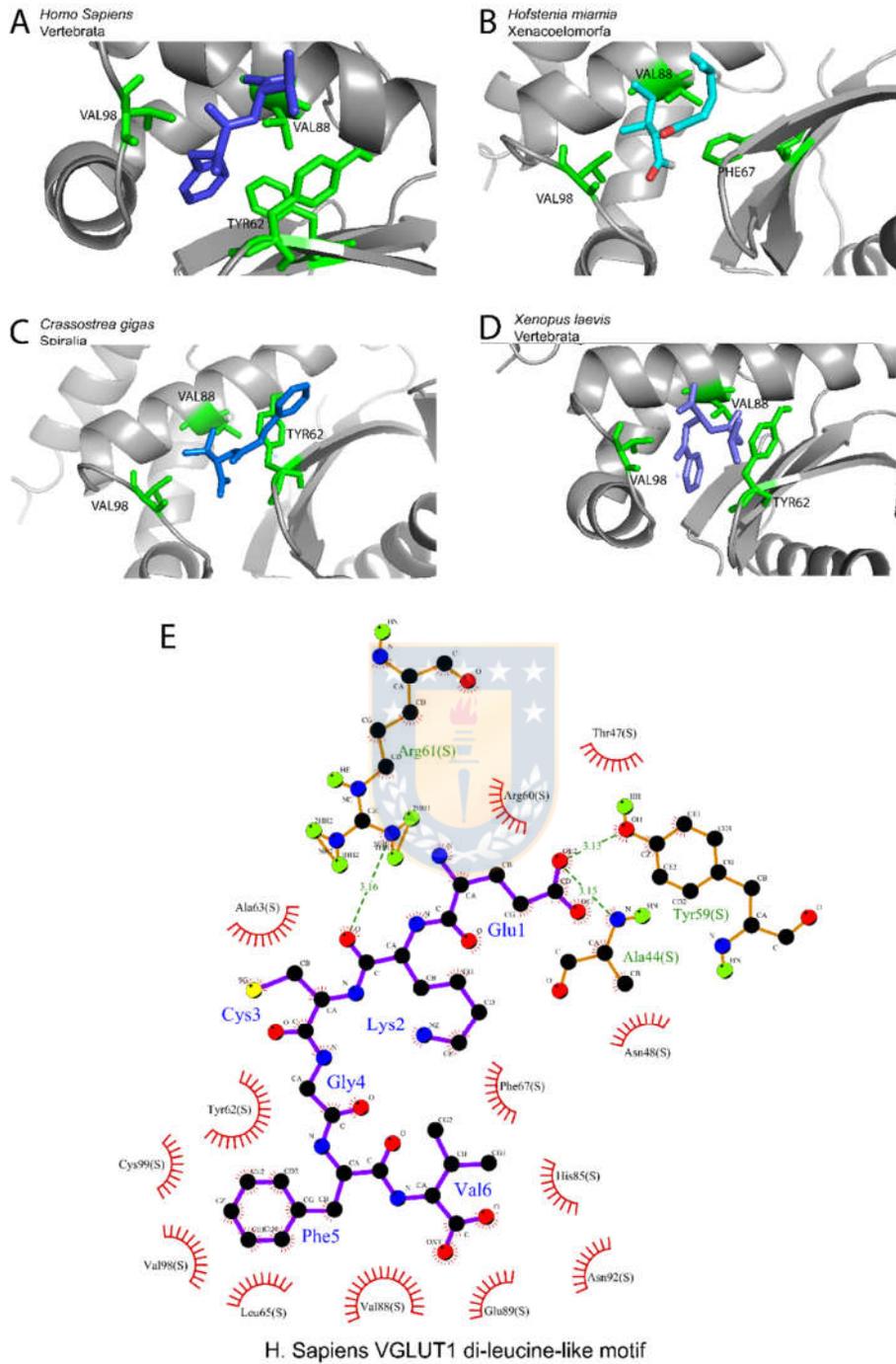


Figura 11. Interacción molecular entre el motivo di-leucina-like de proteínas transportadoras de glutamato y el complejo AP-2 en especies representativas de diferentes grupos taxonómicos. En los paneles A-D se presentan vistas estereoscópicas de la región de interacción. En cada panel, los aminoácidos del motivo di-leucina-like que interactúa con el complejo AP-2 se destacan en color azul, mientras que los residuos del complejo AP-2 se muestran en verde. Interacción molecular en **(A)** *Homo sapiens* (Vertebrata), **(B)** *Hofstenia miamia* (Xenacoelomorpha), **(C)** *Crassostrea gigas* (Spiralia), y **(D)** *Xenopus laevis* (Vertebrata). **(E)** Representación gráfica de bolsillo hidrofóbico interaccionando con los residuos del motivo di-leucina-like de VGLUT1 de *H. sapiens*.

5.4. Señalización de glutamato durante neurulación

5.2.1. Bloqueo farmacológico de VGLUTs usando Rose Bengal en embriones de *X. laevis*

Para establecer si la expresión de VGLUTs durante la etapa de neurulación tiene alguna implicancia en dicho proceso, y podría estar relacionada con la condensación del sistema nervioso, se utilizó el fármaco Rose Bengal (RB) que corresponde a un xanteno utilizado como colorante (Pietrancosta et al., 2010). Además, se ha descrito que este bloqueador presenta una afinidad por los transportadores vesiculares de glutamato, inhibiendo su capacidad de aumentar el tamaño quantal de vesículas sinápticas (Ogita et al., 2001; Thompson & Chao, 2020).

Para evaluar el efecto de Rose Bengal en el proceso de neurulación de *X. laevis*, se utilizaron embriones que alcanzaron el estadio de neurulación temprana (estadio 12.5), los cuales fueron incubados en distintas concentraciones de Rose Bengal (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 μM). Estos embriones (tanto el grupo control como los diferentes tratamientos) fueron mantenidos hasta que alcanzaran el término de la neurulación (estadio 20). Así, se pudo observar que los embriones incubados en distintas concentraciones de Rose Bengal no lograban el cierre del tubo neural, provocando que la placa neural no logre cerrarse por completo y dejando al descubierto el tejido neural en tiempos que ya debería haberse formado el tubo neural (Figura 12A). Este proceso se denominó malformación del tubo neural (NTDs).

También, se pudo generar una curva concentración-respuesta al comparar las concentraciones de RB con la incidencia de malformaciones en el

tubo neural. A partir de esta curva, se obtuvo una EC50 de $3.49 \pm 0.32 \mu\text{M}$, en donde concentraciones menores $1 \mu\text{M}$ no lograban generar más de un 10% de malformaciones, mientras que a concentraciones mayores de $10 \mu\text{M}$ más del 95% de los embriones presentaba NTDs (Figura 12B). En efecto, al analizar la apertura del tubo neural en relación con las distintas concentraciones de RB, fue posible establecer que mayores concentraciones de dicho compuesto provocan que el tubo neural se mantenga abierto, evitando que sus pliegues se unan en posición medial, lo que provoca que el proceso de neurulación no se lleve a cabo completamente (Figura 12C). Con lo anterior, es posible establecer la importancia de los transportadores vesiculares de glutamato como unos actores importantes en la formación del tubo neural en *X. laevis*, indicando que la señalización de glutamato participaría activamente en permitir la correcta migración de ectodermo neural para la formación del tubo neural.

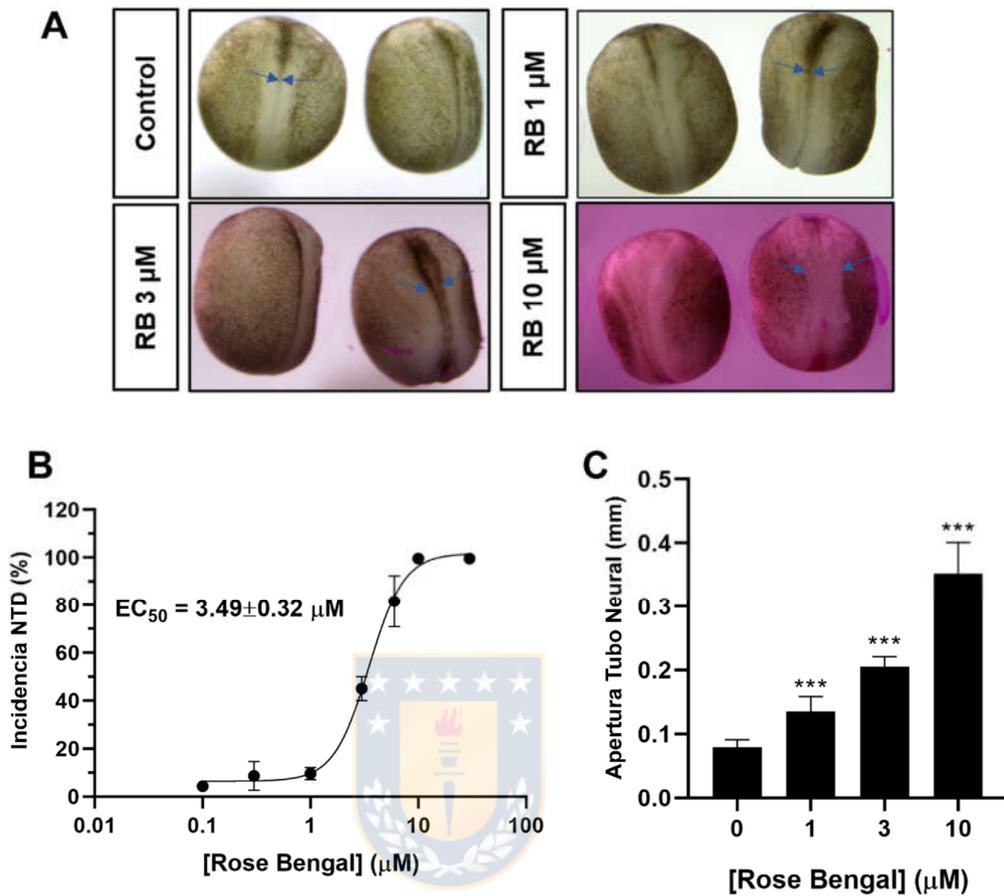


Figura 12. Efecto del tratamiento con Rose Bengal durante el proceso de neurulación en *X. laevis*. **(A)** Efecto fenotípico en el cierre del tubo neural a distintas concentraciones de RB. **(B)** Curva concentración-respuesta del tratamiento con RB, provocando defectos del tubo neural (NTDs). **(C)** Cuantificación de la apertura del tubo neural en relación con la concentración de RB utilizada en el tratamiento durante el proceso de neurulación.

5.2.2. Alteraciones en migración latero medial provocada por Rose Bengal durante neurulación

Una vez establecido el aumento de incidencia de NTDs provocado por el bloqueo de los transportadores vesiculares de glutamato usando Rose Bengal, se realizó un estudio en lupa óptica para establecer qué ocurre con la migración celular de aquellos precursores neuronales alterados por el bloqueo

de VGLUTs. Dado que los embriones de *X. laevis* presentan células pigmentadas, fue posible realizar un seguimiento de aquellas células durante un periodo de 3 horas, fotografiando cada 60 segundos. Esto fue realizado en embriones en condición control y con incubación en RB a una concentración de 3 μ M. De esta manera, detectamos un cambio en la dirección de la migración de las células ectodermales pigmentadas (Figura 13). En condición normal, es decir, sin tratamiento con RB, las células pigmentadas presentan una migración latero medial, provocando la elongación del embrión y llevando al cierre de la placa neural formando así el tubo neural (Figura 13A). Sin embargo, la dirección de la migración con RB cambia, esta vez en dirección anteroposterior, provocando que los pliegues que se unirían en la línea medial del embrión no logren unirse, lo que lleva a que el tubo neural se mantenga abierto (Figura 13B). Si bien hay una tendencia de movimiento hacia la línea media, este cambio de dirección acerca las células en menor manera significativamente, con una migración promedio de 100 μ m (Figura 13C). Estos resultados permiten establecer que la manera en la cual la señalización de glutamato participa en la etapa de neurulación es regulando la dirección de la migración para que ocurra el cierre del tubo neural (Figura 13).

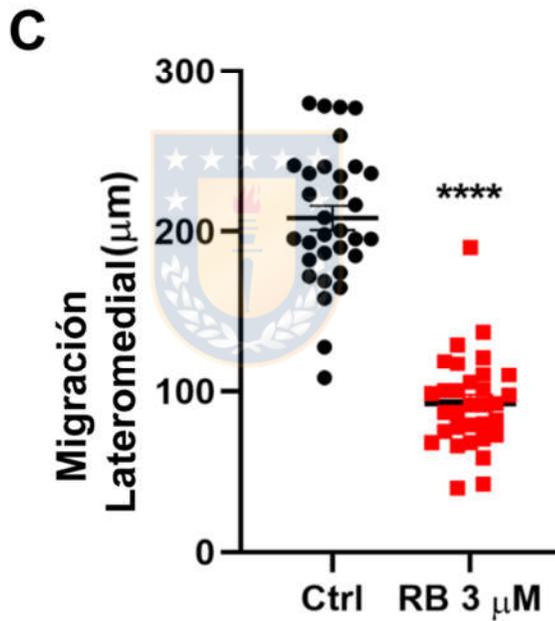
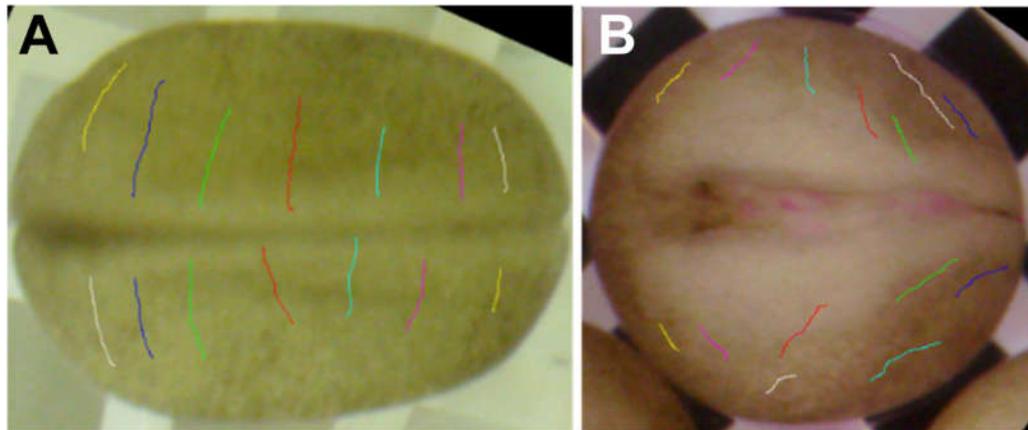


Figura 13. Efecto del tratamiento con RB en la migración lateromedial en embriones de *X. laevis*. **(A)** embrión de *X. laevis* indicando la dirección de migración de las células pigmentadas en una dirección lateromedial. Esta condición corresponde al control. **(B)** embrión de *X. laevis* indicando la migración de las células pigmentadas en dirección anteroposterior, luego de incubarlo en RB a una concentración de 3 μM . **(C)** determinación de la distancia de migración en μm entre las células pigmentadas de embriones tratados con RB y aquellos que no fueron tratado con el fármaco. Los asteriscos indican que existe una diferencia significativa en la migración celular al aplicar prueba estadística t-student ($p < 0.05$).

5.2.3 Cambio en comportamiento epileptogénico por bloqueo parcial de VGLUT durante neurulación

Dado que no existen mayores efectos en el cierre del tubo neural provocado por concentraciones bajas de RB (Figura 13), se realizaron estudios de comportamiento en embriones de *X. laevis* que recibieron tratamientos con RB a concentraciones de 1 μ M. Esto fue realizado durante la etapa de neurulación (estadios 12.5 al 20) y se permitió a los embriones llegar hasta el estadio de renacuajo (estadio 42).

Para el estudio de comportamiento se realizó una prueba de epileptogénica inducida por pentilenotetrazole (PTZ), usualmente utilizada para la inducción de convulsiones en modelos como *X. laevis* debido a su capacidad de desregular señales excitatorias e inhibitorias (James et al., 2015). Inicialmente, se estableció un estudio comparativo entre concentraciones de 7, 10 y 15 mM de PTZ para establecer el tiempo en que demora la generación de convulsiones en renacuajos de *X. laevis*. Las concentraciones de 7 mM tomaron $463,3 \pm 3,3$ seg en generar convulsiones, mientras que a 10 mM las convulsiones se generaron a los $390,7 \pm 1,7$ y a 15 mM a los $333,7 \pm 1,2$ seg. A partir de estos resultados, se decidió emplear la concentración de 10 mM; en todos los casos, un aumento de la movilidad de los embriones fue observada durante los tratamientos con PTZ (Figura 14)

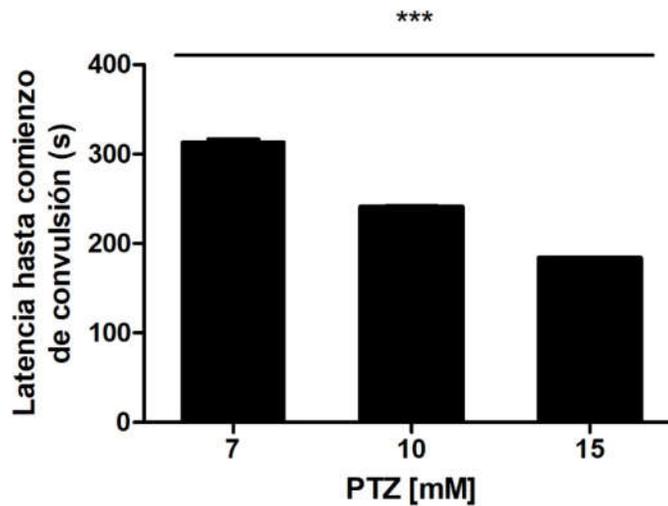


Figura 14. Validación del tratamiento con PTZ en renacuajos de *X. laevis*. Los renacuajos fueron tratados con distintas concentraciones de pentilenotetrazol (PTZ) y se cuantificó el tiempo transcurrido desde la administración hasta la generación de convulsiones. Los asteriscos indican que existe una diferencia significativa en el tiempo necesario para una convulsión en los embriones, obtenida por prueba estadística t-student ($p < 0.05$).

Para establecer si el tratamiento con RB durante el proceso de neurulación provoca cambios en el tiempo necesario para que ocurra una convulsión, se comparó la formación de una convulsión, descrita como una forma de “C”, donde la cola del renacuajo se toca con su cabeza (Figura 15A) (James et al., 2015). De estos análisis, se observó que el tiempo necesario para que ocurra una convulsión en los renacuajos de la condición control corresponde a $349,8 \pm 20,3$ seg, mientras que los renacuajos sometidos a RB (condición tratamiento) tuvieron una convulsión a los $215,0 \pm 2,8$ seg (Figura 15B).

Para establecer cómo cambiaban los parámetros de movilidad de los renacuajos tratados con PTZ, se realizó un seguimiento durante 10 minutos de

tratamiento con dicha droga y se analizaron los parámetros de distancia recorrida, velocidad media y velocidad máxima, realizando mediciones cada 2 minutos de grabación.

Por otra parte, se realizaron grabaciones de 10 minutos a los renacuajos tratados con PTZ, aplicando la droga luego de transcurrido 2 minutos. En estos casos, se adicionó el fármaco hasta alcanzar una concentración de 10 mM. No se pudo detectar mayores cambios en la velocidad máxima obtenida por el tratamiento con PTZ en ambos casos, con y sin tratamiento con RB; sin embargo, se detectaron cambios en la distancia recorrida (Figura 15D). Transcurridos 2 minutos, los renacuajos tratados con RB durante el proceso de neurulación recorrían mayores distancias en comparación a los controles sin tratamiento en neurulación, la cual transcurrido ocho minutos post-tratamiento con PTZ, alcanzaron valores similares (Figura 15C, 15D). Estos resultados permiten describir que el bloqueo parcial de VGLUTs, si bien altera la disposición de los NPC presentes en el cerebro en desarrollo, no produce mayores cambios en el comportamiento normal de un renacuajo. Sin embargo, existiría una mayor sensibilidad para desencadenar comportamiento epiletogénicos, disminuyendo el tiempo para la generación de convulsiones y aumentando la distancia que recorrerían en respuesta al desafío (Figura 15E).

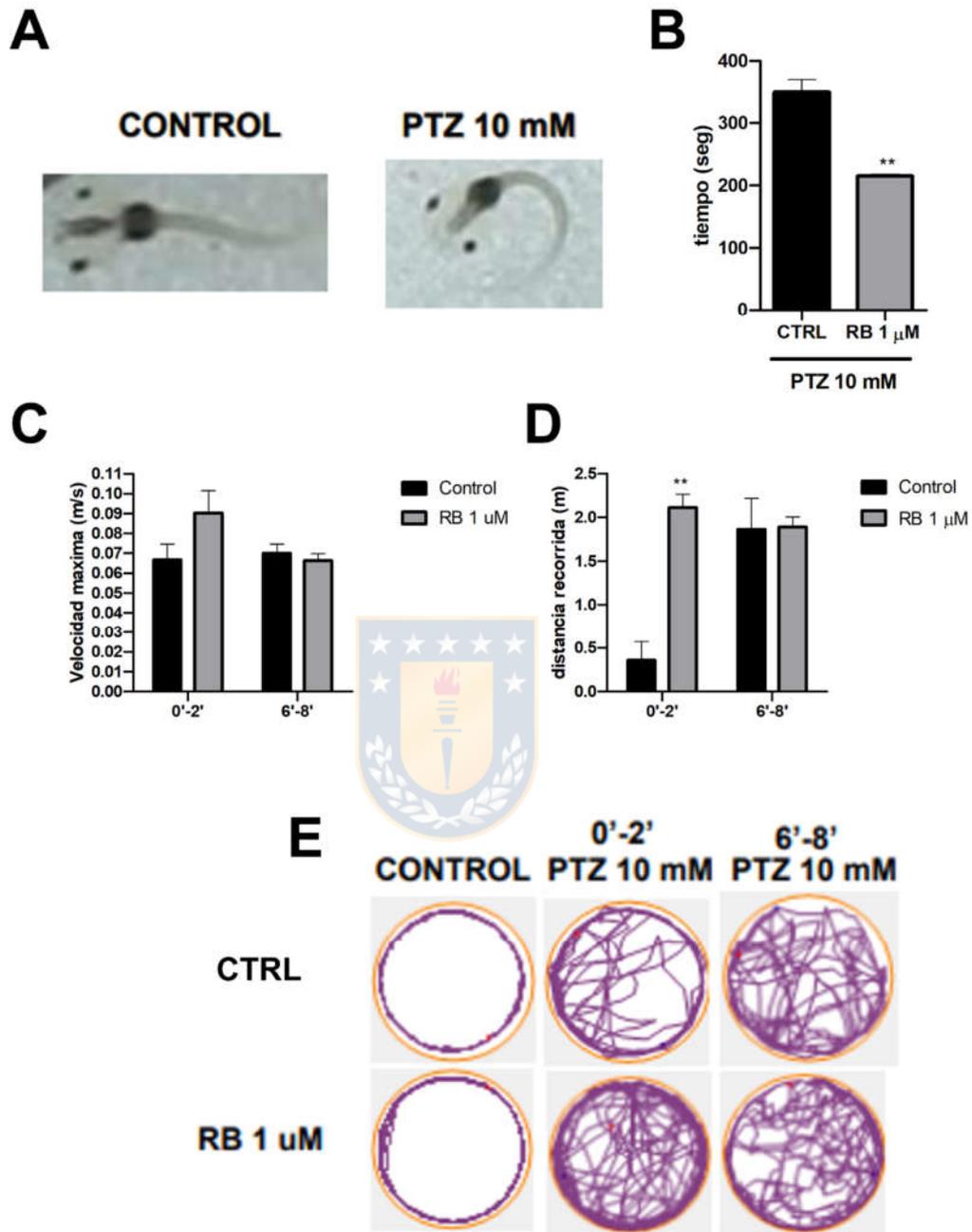


Figura 15. Efecto en el comportamiento epileptogénico en renacuajos de *X. laevis* tratados con RB durante el proceso de neurulación. **(A)** Esquemática del efecto epileptogénico provocado por pentilenotetrazol (PTZ) en renacuajos de *X. laevis*. **(B)** Tiempo necesario para la generación de convulsiones en renacuajos controles y tratados con RB 1 μ M. **(C, D)** Efecto en el comportamiento de renacuajos, representado por velocidad de movimiento y distancia recorrida, controles y tratados con RB 1 μ M. **(E)** Representación del recorrido acumulado realizado por los renacuajos de los grupos controles y tratamientos, expuestos a PTZ durante los 2 primeros minutos y luego de transcurridos 8 minutos de exposición.

DISCUSIÓN

6.1. Malformaciones en desarrollo embrionario

En los últimos años, los esfuerzos para disminuir la incidencia de defectos del tubo neural en recién nacidos se han enfocado en la suplementación de ácido fólico en la dieta de la madre embarazada, esfuerzos que si bien han disminuido la incidencia de dichos defectos, la tasa de nacidos vivos con malformaciones al tubo neural sigue en números elevados, con una prevalencia de 15 a 23 niños por cada 10.000 nacimientos vivos (Blencowe et al., 2018b). Además, con la reciente propuesta de que las transcripciones de calcio detectadas durante el desarrollo temprano estarían reguladas por glutamato (Sequeira et al., 2018), se pueden proponer vías alternativas para el estudio y control de este proceso, de tal manera que puedan generarse mecanismos nuevos de control para disminuir la incidencia de estas malformaciones.

Adicionalmente, la incidencia de estas malformaciones aumenta cuando factores ambientales interceden con el desarrollo normal embrionario; entre ellas, el uso de drogas antiepilépticas en el embarazo aumenta la incidencia de distintas patologías, como defectos al corazón, formación de labio leporino y malformaciones al desarrollo del sistema nervioso central, denominadas defectos del tubo neural (Kallen et al., 1989; Wallingford et al., 2013). Estos efectos teratogénicos fueron probados previamente en embriones de *Xenopus laevis*, observando que existe una mayor incidencia de estos defectos del tubo neural al exponer embriones a drogas antiepilépticas como ácido valproico

(Sequera et al., 2018), así como también el aumento de la predisposición a la generación de convulsiones (James et al., 2015). Lo anterior, correlacionándose con la información epidemiológica, donde la incidencia de malformaciones al tubo neural aumentan en un 10% frente al uso de drogas antiepilépticas durante el embarazo (Werler et al., 2011).

Esta información en conjunto propone la importancia de la señalización no clásica encargada de la regulación del proceso de neurulación, principalmente, el rol del glutamato durante el desarrollo embrionario. Como se mencionó previamente, la señalización de glutamato estaría regulando el proceso de neurulación, a través de la activación de receptores de glutamato (NMDAr), como la formación de glutamato a partir de glutamina (Benavides-rivas et al., 2020). De esta manera, el proceso de liberación de glutamato permanece inexplorado para explicar cómo se realiza esta comunicación celular que relacione ambos procesos.

6.2. Señalización de glutamato durante el desarrollo embrionario

Considerando los resultados obtenidos previamente en el Laboratorio para Desarrollo Neural, es posible detectar el comienzo de expresión de efectores pre-sinápticos durante la etapa de neurulación en *X. laevis*; es decir, en estadios de desarrollo en donde la sinapsis aún no ocurre (Por publicar). Así, se puede proponer que la activación de receptores que aumentan transcientes de calcio en células precursoras neuronales se debería a la participación de transportadores vesiculares de glutamato.

Para evaluar dicha propuesta, se utilizaron bloqueos farmacológicos de VGLUTs usando Rose Bengal (RB). Esta molécula es un colorante hidrofóbico, capaz de atravesar la membrana plasmática, que puede actuar como un inhibidor no competitivo de VGLUT (en vesículas aisladas, posee una K_i de 25 nM) (Pietrancosta et al., 2010, 2020); además, se ha descrito que posee la capacidad de disminuir la cantidad de glutamato liberado desde las vesículas sinápticas en una manera dependiente de potencial de acción y calcio intracelular (Ogita et al., 2001). Así, el sitio de interacción de RB con VGLUT2 se ubicaría en los extremos de dominios transmembrana, uniéndose a residuos como H199, P196, M296 y L293 (Thompson & Chao, 2020).

Los tratamientos de embriones con RB permitieron observar la formación de diferentes grados de malformación en el tubo neural. Por ejemplo, obtuvimos un aumento de la incidencia de NTDs frente a mayores concentraciones de RB, reafirmando la propuesta inicial que el glutamato participa en el proceso de neurulación, y a su vez, lo realiza a través de la liberación vesicular mediada por VGLUTs. Junto con ello, el aumento del bloqueo al incrementar las concentraciones del inhibidor genera mayores malformaciones, incluso con letalidad en embriones que fueron incubados con cantidades de droga que inhibieran por completo la actividad vesicular; por esto, se propone que los precursores neuronales realizan una comunicación celular similar a la observada en la sinapsis ya formada, sin tener que denominarse como tal.

Por otro lado, la participación del glutamato durante la etapa de neurulación podría deberse no solamente a su liberación vesicular, sino también por

la comunicación celular generada por la formación de uniones comunicantes, las cuales están formadas por la interacción de proteínas comunicantes llamadas conexinas (Alsarraf et al., 2017; Gaete et al., 2014; Vicario et al., 2017). En el cerebro adulto humano, las conexinas permiten el paso de diferentes moléculas de señal, como el ATP, glutamato, entre otros (Mayorquin et al., 2018). Así, el glutamato a nivel intracelular puede ser convertido el α -cetoglutarato, regulando procesos metabólicos y promoviendo la proliferación celular, uno de los eventos esenciales durante la etapa de neurulación (Lukey et al., 2016; Rumping et al., 2019). Estas conexinas, en especial la Conexina 32 y 46, están expresadas durante el proceso de neurulación y presentan una función relevante durante el desarrollo neural en donde su bloqueo provoca a su vez malformaciones en el tubo neural en embriones de *X. laevis*. (Tesis Mariana Tovar, Magister Bioquímica y Bioinformática).

El bloqueo parcial de la comunicación mediada por VGLUTs, si bien generó malformaciones en el tubo neural, no impide el desarrollo del organismo. Por ello, se buscó establecer si esta deficiencia durante la neurulación implica también efectos en la funcionalidad del cerebro en formación. Diferentes autores han propuesto que la exposición a drogas antiepilépticas, como el ácido valproico, puede aumentar el riesgo de padecer enfermedades que se relacionan al déficit en la formación de circuitos neuronales, como es en el caso del Desorden de Espectro Autista (Abrahams & Geschwind, 2008; Krey & Dolmetsch, 2007; Pratt & Khakhlin, 2013). Por lo tanto, es posible relacionar que alteraciones durante el cierre del tubo neural podría provocar alteraciones en la formación de estos circuitos (Abrahams & Geschwind, 2008). De esta

manera una migración alterada durante neurulación (Figura 13) podría explicar el motivo por el cual la susceptibilidad a la formación de convulsiones estimulada por pentilenotetrazol es mayor en renacuajos tratados previamente con Rose Bengal.

6.3. Evolución del transporte vesicular glutamatérgico

Los VGLUTs cumplen funciones primordiales en el cerebro adulto, participando en la sinapsis glutamatérgica en neocorteza, cerebelo, hipotálamo y la corteza cerebral (Liguz-Leczna & Skangiel-Kramska, 2007). El almacenaje vesicular de glutamato está altamente regulado por mecanismos moleculares, usando fuerzas motrices asociadas a protones y electroquímicas mediadas por cloruro que permiten regular el llenado vesicular (Schenck et al., 2009; Takamori, 2016; Wojcik et al., 2004; Wu et al., 2007)

La participación de VGLUTs en el proceso de neurulación y las malformaciones provocadas por su bloqueo podría proponer la importancia de estos transportadores de glutamato en la generación del sistema nervioso (Benavides-Rivas et al., 2020; Sequerra et al., 2018). Así, la disparidad de la señalización de glutamato durante el desarrollo embrionario podría relacionarse con la correcta formación del sistema nervioso. Entonces, se podría proponer que, si la señalización glutamatérgica está ausente en algunas especies de animales, el sistema nervioso debería presentarse y/o desarrollarse de manera diferente. De hecho, diferentes proteínas envueltas en la transmisión sináptica glutamatérgica surgen tempranamente durante la evolución de

los animales (Arendt, 2020; Varoqueaux & Fasshauer, 2017), y por ello, se ha propuesto que la comunicación sináptica ya estaba presente en el último ancestro común de los animales (Burkhardt, 2015; Martín-Durán et al., 2018; Ryan & Grant, 2009). Sin embargo, hasta ahora no se ha explorado si existe alguna relación entre el proceso sináptico glutamatérgico y la sofisticación o complejización del sistema nervioso en animales.

Los transportadores de soluto (SLC) son proteínas de membranas que regulan el paso de sustancia a través de membranas celulares, y han sido clasificados en 43 familias en los seres humanos (Hediger et al., 2004). Estudios filogenéticos han descrito que los transportadores de soluto tienen una gran afinidad filogenética, sugiriendo que las diferentes familias de estos transportadores provienen de un ancestro común (Fredriksson et al., 2008; Høglund et al., 2011). Por lo tanto, es posible esperar que los miembros de esta familia de transportadores presenten firmas moleculares que permitan entender la compleja y diversa funcionalidad de estos transportadores.

En efecto, en esta tesis, fue posible detectar que en la familia SLC17 la interacción con aniones (fosfatos, glutamato, entre otros) correspondería a la función ancestral de esta familia (Figura 7), observada hasta el día de hoy en los transportadores de fosfato (SLC17A1-4) (Iharada et al., 2010). Posteriormente, nuestros análisis muestran que duplicaciones y pérdidas de miembros de esta familia, de una manera especie-específica, dio origen a nuevos transportadores que tuvieron la capacidad de expresarse diferencialmente en distintos tejidos, como es el caso de los transportadores de nucleótidos (VNUTs)

y sialina (Moriyama et al., 2017; Sawada et al., 2008). Los análisis filogenéticos (Figuras 7 y 8) indicarían que los transportadores de sialina, un transportador de soluto que ya presenta afinidad por glutamato (Miyaji et al., 2011), tienen una gran cercanía evolutiva con los transportadores de glutamato, los cuales se expresan en el sistema nervioso (Liguz-Leczna & Skangiel-Kramska, 2007).

Durante la evolución, las proteínas sufren mutaciones que van permitiendo la generación de residuos o dominios funcionales que permiten su diversificación funcional (Escriva et al., 2006). En el caso de los transportadores de glutamato, la aparición de residuos y dominios funcionales asociados a la unión y regulación de glutamato ocurrió en el último ancestro común de Eumetazoa (cnidarios + animales bilaterados) (Figura 7). No obstante, la capacidad de formar vesículas y permitir el reciclaje vesicular del glutamato surgió en el último ancestro común de Bilateria (animales bilaterados) (Figura 7). Los orígenes evolutivos de los transportadores de glutamato determinados en esta tesis tiene cierta correlación con la evolución del sistema nervioso en animales (Bucher & Anderson, 2015; Holland, 2015), y se podría especular que la capacidad de movilizar glutamato mediante vesículas estaría relacionado con la aparición de estructuras nerviosas más sofisticadas y condensadas.

Los análisis de firmas/señales e interacción molecular permiten relacionar la actividad endocítica de los transportadores vesiculares de glutamato descrita en mamíferos (Foss et al., 2013; Li et al., 2020; Zhang et al., 2019), con la que estaría presente en otras especies de animales. Por ejemplo, la

falta de estos motivos endocíticos provocarían una incapacidad de reciclar el glutamato de manera vesicular, por lo tanto, aquellas especies de animales que carecen de estos motivos no podrían realizar dicha función. Si bien esto es lo que indican los resultados bioinformáticos de esta tesis, no podemos descartar que aquellas especies sin motivos endocíticos puedan reciclar vesicularmente el glutamato mediante algún otro mecanismo. Para ello, es necesario realizar futuros estudios que puedan ahondar en mayor profundidad en este tema de investigación.

Por otro lado, en especies de mamíferos se ha demostrado la presencia de una regulación sináptica más sofisticada mediante el uso del motivo poli-prolina (Szaszák et al., 2002; Zhang et al., 2019). Esto ha sido reportado exclusivamente para la proteína VGLUT1, en donde el uso del motivo poli-prolina permite regular la frecuencia de liberación vesicular (Zhang et al., 2019). Nuestros resultados indican que esta capacidad de regulación de la liberación vesicular es una característica exclusiva de los mamíferos (Figuras 9 y 10), ya que son las únicas especies de vertebrados que presentan este tipo de motivos. La ausencia de este residuo cargado positivamente en el motivo poli-prolina no facilitaría la interacción de este motivo con factores regulatorios de endocitosis (Foss et al., 2013; Santos et al., 2014; Zhang et al., 2019).

Cabe destacar que en esta tesis no fue abordado filogenéticamente la evolución de los transportadores plasmáticos de glutamato o EAATs. Si bien estos transportadores se han descrito como participantes activos de la sinap-

sis, ubicándose en las células gliales y regulando las concentraciones de neurotransmisores en el espacio sináptico (Liang et al., 2008)(Perea et al., 2009)(Blutstein & Haydon, 2014), estos transportadores provienen de una familia de transportadores diferente a los VGLUTs, siendo miembros de la familia de transportadores de soluto 1 o SLC1 (Grewer et al., 2014; Mim et al., 2005). Hasta el momento, estudios filogénicos de SLC1 han demostrado como eventos de reorganización y duplicación del genoma de las especies de cordados lleva a diferentes pérdidas o preservaciones de miembros de SLC1 (Gesemann et al., 2010). Sin embargo, no hay estudios a nivel de especies de eucariontes que describan la historia evolutiva de dicha familia en el contexto de la evolución del sistema nervioso, lo que propone una interesante área para correlacionar y comparar con la evolución de los VGLUTs propuesta en esta tesis.

6.4. Relación ontogenia-filogenia y transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs)

En el campo de la Biología del Desarrollo y Evolución es altamente cuestionado si la ontogenia recapitula la filogenia (Heldstab et al., 2020; Ohno, 1995). Es bien sabido que una gran cantidad de genes son evolutivamente conservados entre la mayoría de las especies de animales (Danchin et al., 2006; Jayaswal et al., 2017; Siepel, 2005), y que la maquinaria regulatoria presente durante la ontogenia activa o reprime diferidamente estos genes en distintas especies de animales, permitiendo la formación y diferenciación de tejidos, órganos y sistemas (García et al., 2007; Pollet et al., 2005). Estudios

previos han propuesto que ciertos rasgos de individuos que emergen temprano en su historia evolutiva, también tienden a expresarse tempranamente durante el desarrollo (Clune et al., 2012). Así mismo, se ha hipotetizado que los cambios ocurridos durante la ontogenia de un organismo podrían típicamente alterar su desarrollo posterior, y que cambios más tempranos podrían ser incluso más disruptivos (Clune et al., 2012; Mayr, 1994). Así, los organismos que mantenían estos rasgos ancestrales tendrían una ventaja selectiva, más si lo presentarán en estadios tempranos de su desarrollo embrionario (Mayr, 1994).

En el caso de la evolución del sistema nervioso y su maquinaria neuronal en animales, la historia evolutiva es interesantemente secuencial (Laundon et al., 2019; Varoqueaux & Fasshauer, 2017). En la pre-sinapsis, la acumulación de vesículas secretoras expectantes al influjo de calcio extracelular ha sido observada en coanoflagelados (Laundon et al., 2019), organismos unicelulares más cercanos a las especies de animales que observamos hoy en día. Más adelante en la evolución de animales, la exclusividad de proteínas sinápticas como sinaptotagmina (Varoqueaux & Fasshauer, 2017), la diversificación de canales de calcio exclusivos para sinapsis (Simms & Zamponi, 2014), y la detección transcritos de transportadores de neurotransmisores en animales con un sistema nervioso en forma de red neuronal (Ctenophora: ctenóforos) o incluso que no posee un sistema nervioso definido (Porifera: esponjas marinas) (Lawal & Krantz, 2013), indicarían que la maquinaria transcripcional y celular para el envío de información a través de tejidos especializados estaba

presente en el planeta desde hace unos 750 millones de años atrás. Sin embargo, estos estudios se enfocan en expresión génica (Laundon et al., 2019; Lawal & Krantz, 2013; Simms & Zamponi, 2014; Varoqueaux & Fasshauer, 2017), pero fallan en establecer si aquellas proteínas presentes en dichas especies cumplirían la función que se le atribuye actualmente o si contienen los residuos y motivos funcionales que han sido descubiertos en sistemas modelos mayormente estudiados, como por ejemplo los humano, ratones, y ranas (Benavides-Rivas et al., 2020; Li et al., 2020; H. Li et al., 2017; Liguz-Leczna & Skangiel-Kramska, 2007; Mackenzie et al., 2008a; Nickel, 2010; Sequerra et al., 2018).

Bajo estos mismos enunciados, los análisis filogenéticos y firmas moleculares podrían entregar una perspectiva más profunda de la evolución del sistema nervioso en animales. Siendo la neurulación, o la formación de un sistema nervioso condensado y organizado, una de las características más importantes de los animales vertebrados (Abdul-Wajid et al., 2015; Smith, 1997; Ybot-Gonzalez et al., 2007), interrumpir o alterar su formación normal guiada por la señalización de glutamato, lleva a la formación de fenotipos con desventajas selectivas, los cuales no serían viables (Figura 13) y no permitiría la perpetuación de una especie. Entonces, la importancia de entrelazar la ontogenia con la filogenia es clave para entender la evolución. En esta tesis, proponemos que la señalización de glutamato desde la neurulación indicaría su participación en el establecimiento de sistemas nerviosos condensados y sofisticados, la cual no debería estar presente en aquellas especies que no presentan sistemas nerviosos tan elaborados (Figura 9). Esto es apoyado por

nuestros resultados los que muestran que especies de ciertos grupos taxonómicos no presentan los dominios y motivos necesarios para transportar glutamato de forma vesicular. Las especies que carecen la capacidad de reciclaje vesicular tienen sistemas nerviosos relativamente simples en forma de red nervioso (cnidarios) (Grimmelikhuijzen & Westfall, 1995) o ganglios difusos (nemátodos) (Schafer, 2016), mientras que especies que si tiene esta capacidad tienen sistemas nerviosos más complejos con la presencia de condensación de ganglios y/o cerebro (Buchanan & Tranel, 2009; Greene & Copp, 2009; Spitzer, 2006) (Figura 16).

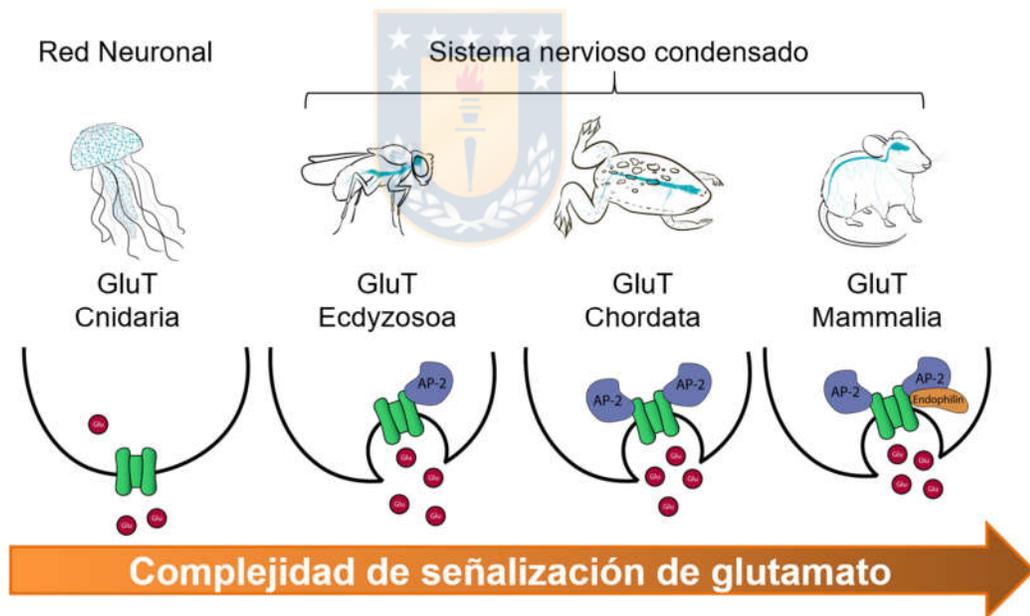


Figura 16. Posible escenario evolutivo de la sofisticación de la señalización de glutamato y la evolución de la condensación del sistema nervioso en animales.

CONCLUSIÓN

En esta tesis se analizó, por primera vez, la participación de transportadores vesiculares de glutamato durante el proceso de neurulación, utilizando de modelo *in vivo* huevos de *Xenopus laevis*, así como la determinación de la historia evolutiva y funcional de los transportadores VGLUTs en animales.

A partir de los resultados de esta tesis, se puede concluir que:

1. Los transportadores de glutamato se pueden clasificar en no vesiculares y vesiculares, siendo los primeros presentes desde el último ancestro común de Eumetazoa (cnidarios + animales bilaterados), mientras que los segundos emergieron cuando habitaba el último ancestro común de Bilateria (animales bilaterados) hace unos 550 millones de años.

2. La posterior evolución de estos transportadores estuvo asociada a la ganancia de firmas moleculares, en forma de residuos y motivos funcionales que permitieron la sofisticación del transporte vesicular de glutamato, reflejada en la capacidad de formar, reciclar y regular la acción de vesículas como parte del sistema de transporte de glutamato en especies que habitan hoy en día nuestro planeta.

3. La señalización de glutamato, mediada por VGLUTs, participa durante la neurulación regulando la migración de las células de la placa neural para la formación del tubo neural.

4. Impedimentos en el cierre del tubo neural provocado por el bloqueo de la señal glutamatérgica lleva a la formación de defectos del tubo neural, que pueden ser de severos a leves.

5. El bloqueo de VGLUTs, que no generan defectos visibles, puede provocar a su vez alteraciones en el comportamiento, en este caso, epileptogénico.



BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Wajid, S., Morales-Diaz, H., Khairallah, S. M., & Smith, W. C. (2015). T-type Calcium Channel Regulation of Neural Tube Closure and EphrinA/EPHA Expression. *Cell Reports*, 13(4), 829–839. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.035>
- Abrahams, B. S., & Geschwind, D. H. (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nature Reviews Genetics*, 9(5), 341–355. <https://doi.org/10.1038/nrg2346>
- Almqvist, J., Huang, Y., Laaksonen, A., Wang, D.-N., & Hovmöller, S. (2007). Docking and homology modeling explain inhibition of the human vesicular glutamate transporters. *Protein Science*, 16(9), 1819–1829. <https://doi.org/10.1110/ps.072944707>
- Alsarraf, H., Kelly, K. A., Anderson, C., & Rhett, J. M. (2017). Connexins in the Brain: Psychopharmaceutical Implications. *Neuropsychiatry*, 07(05), 591–595. <https://doi.org/10.4172/neuropsychiatry.1000253>
- Arendt, D. (2020). The Evolutionary Assembly of Neuronal Machinery. *Current Biology*, 30(10), R603–R616. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.008>
- Bell, M. R., Belarde, J. A., Johnson, H. F., & Aizenman, C. D. (2011). A neuroprotective role for polyamines in a *Xenopus* tadpole model of epilepsy. *Nature Neuroscience*, 14(4), 505–512. <https://doi.org/10.1038/nn.2777>
- Benavides-rivas, C., Tovar, L. M., Zúñiga, N., Pinto-borguero, I., Yévenes, G. E., Moraga-cid, G., Fuentealba, J., Coddou, C., Bascuñán-godoy, L., & Castro, P. A. (2020). Altered glutaminase 1 activity during neurulation and its potential implications in neural tube defects. *Frontiers in Pharmacology*.
- Biancheri, R., Verbeek, E., Rossi, A., Gaggero, R., Roccatagliata, L., Gatti, R., Van Diggelen, O., Verheijen, F., & Mancini, G. (2002). An Italian severe Salla disease variant associated with a SLC17A5 mutation earlier described in infantile sialic acid storage disease. *Clinical Genetics*, 61(6), 443–447. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2002.610608.x>
- Blencowe, H., Kancherla, V., Moorthie, S., Darlison, M. W., & Modell, B. (2018a). Estimates of global and regional prevalence of neural tube defects for 2015: a systematic analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1414(1), 31–46. <https://doi.org/10.1111/nyas.13548>
- Blencowe, H., Kancherla, V., Moorthie, S., Darlison, M. W., & Modell, B. (2018b). Estimates of global and regional prevalence of neural tube

- defects for 2015: a systematic analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1414(1), 31–46. <https://doi.org/10.1111/nyas.13548>
- Blom, H. J., Shaw, G. M., den Heijer, M., & Finnell, R. H. (2006). Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 724–731. <https://doi.org/10.1038/nrn1986>
- Blutstein, T., & Haydon, P. G. (2014). The Tripartite Synapse. In *The Synapse* (pp. 155–172). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418675-0.00005-5>
- Bridges, R. J., & Esslinger, C. S. (2005). The excitatory amino acid transporters: Pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. *Pharmacology & Therapeutics*, 107(3), 271–285. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.01.002>
- Buchanan, T. W., & Tranel, D. (2009). Central and peripheral nervous system interactions: From mind to brain to body. *International Journal of Psychophysiology*, 72(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2008.09.002>
- Bucher, D., & Anderson, P. A. V. (2015). Evolution of the first nervous systems - what can we surmise? *Journal of Experimental Biology*, 218(4), 501–503. <https://doi.org/10.1242/jeb.111799>
- Burette, A., Collman, F., Micheva, K. D., Smith, S. J., & Weinberg, R. J. (2015). Knowing a synapse when you see one. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00100>
- Burkhardt, P. (2015). The origin and evolution of synaptic proteins - choanoflagellates lead the way. *Journal of Experimental Biology*, 218(4), 506–514. <https://doi.org/10.1242/jeb.110247>
- BURNSIDE, B. (1973). Microtubules and Microfilaments in Amphibian Neurulation. *American Zoologist*, 13(4), 989–1006. <https://doi.org/10.1093/icb/13.4.989>
- Byland, R., Vance, P. J., Hoxie, J. A., & Marsh, M. (2007). A Conserved Dileucine Motif Mediates Clathrin and AP-2–dependent Endocytosis of the HIV-1 Envelope Protein. *Molecular Biology of the Cell*, 18(2), 414–425. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-06-0535>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Capella-Gutierrez, S., Silla-Martinez, J. M., & Gabaldon, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972–1973.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>

- Cardona, C., Sánchez-Mejías, E., Dávila, J. C., Martín-Rufián, M., Campos-Sandoval, J. A., Vitorica, J., Alonso, F. J., Matés, J. M., Segura, J. A., Norenberg, M. D., Rama Rao, K. V., Jayakumar, A. R., Gutiérrez, A., & Márquez, J. (2015). Expression of Gls and Gls2 glutaminase isoforms in astrocytes. *Glia*, *63*(3), 365–382. <https://doi.org/10.1002/glia.22758>
- Chang, R., Eriksen, J., & Edwards, R. H. (2018). The dual role of chloride in synaptic vesicle glutamate transport. *ELife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/eLife.34896>
- Chen, I., Pant, S., Wu, Q., Cater, R. J., Sobti, M., Vandenberg, R. J., Stewart, A. G., Tajkhorshid, E., Font, J., & Ryan, R. M. (2021). Glutamate transporters have a chloride channel with two hydrophobic gates. *Nature*, *591*(7849), 327–331. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03240-9>
- Christodoulou, N., & Skourides, P. A. (2015). Cell-Autonomous Ca²⁺ Flashes Elicit Pulsed Contractions of an Apical Actin Network to Drive Apical Constriction during Neural Tube Closure. *Cell Reports*, *13*(10), 2189–2202. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.017>
- Chua, J. J. E., Kindler, S., Boyken, J., & Jahn, R. (2010). The architecture of an excitatory synapse. *Journal of Cell Science*, *123*(6), 819–823. <https://doi.org/10.1242/jcs.052696>
- Clune, J., Pennock, R. T., Ofria, C., & Lenski, R. E. (2012). Ontogeny Tends to Recapitulate Phylogeny in Digital Organisms. *The American Naturalist*, *180*(3), E54–E63. <https://doi.org/10.1086/666984>
- Cohen-Cory, S. (2002). The Developing Synapse: Construction and Modulation of Synaptic Structures and Circuits. *Science*, *298*(5594), 770–776. <https://doi.org/10.1126/science.1075510>
- Connors, B. W., & Long, M. A. (2004). ELECTRICAL SYNAPSES IN THE MAMMALIAN BRAIN. *Annual Review of Neuroscience*, *27*(1), 393–418. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131128>
- Cousin, M. A., & Robinson, P. J. (2002). Mechanisms of Synaptic Vesicle Recycling Illuminated by Fluorescent Dyes. *Journal of Neurochemistry*, *73*(6), 2227–2239. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0732227.x>
- Danchin, E. G. J., Gouret, P., & Pontarotti, P. (2006). Eleven ancestral gene families lost in mammals and vertebrates while otherwise universally conserved in animals. *BMC Evolutionary Biology*, *6*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-5>
- Davidson, L A, & Keller, R. E. (1999). Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation

- and convergent extension. *Development (Cambridge, England)*, 126(20), 4547–4556. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10498689>
- Davidson, Lance A., Ezin, A. M., & Keller, R. (2002). Embryonic wound healing by apical contraction and ingression in *Xenopus laevis*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 53(3), 163–176. <https://doi.org/10.1002/cm.10070>
- Detrait, E. R., George, T. M., Etchevers, H. C., Gilbert, J. R., Vekemans, M., & Speer, M. C. (2005). Human neural tube defects: Developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicology and Teratology*, 27(3), 515–524. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.12.007>
- Divito, C. B., & Underhill, S. M. (2014). Excitatory amino acid transporters: Roles in glutamatergic neurotransmission. *Neurochemistry International*, 73, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.12.008>
- Domercq, M., Sanchez-Gomez, M. V., Areso, P., & Matute, C. (1999). Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes. *European Journal of Neuroscience*, 11(7), 2226–2236. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00639.x>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- El Far, O., & Seagar, M. (2011). A role for V-ATPase subunits in synaptic vesicle fusion? *Journal of Neurochemistry*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07234.x>
- Eriksen, J., Chang, R., McGregor, M., Silm, K., Suzuki, T., & Edwards, R. H. (2016). Protons Regulate Vesicular Glutamate Transporters through an Allosteric Mechanism. *Neuron*, 90(4), 768–780. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.026>
- Erwin, D. H., & Davidson, E. H. (2002). The last common bilaterian ancestor. *Development*, 129(13), 3021–3032.
- Escriva, H., Bertrand, S., Germain, P., Robinson-Rechavi, M., Umbhauer, M., Cartry, J., Duffraisse, M., Holland, L., Gronemeyer, H., & Laudet, V. (2006). Neofunctionalization in Vertebrates: The Example of Retinoic Acid Receptors. *PLoS Genetics*, 2(7), e102. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020102>
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M., Pieper, U., & Sali, A. (2006). Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics*, 15(1), 5.6.1-5.6.30. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s15>
- Fei, H., Karnezis, T., Reimer, R. J., & Krantz, D. E. (2007). Membrane topology

- of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter. *Journal of Neurochemistry*, 101(6), 1662–1671. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04518.x>
- Foss, S. M., Li, H., Santos, M. S., Edwards, R. H., & Voglmaier, S. M. (2013). Multiple Dileucine-like Motifs Direct VGLUT1 Trafficking. *Journal of Neuroscience*, 33(26), 10647–10660. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5662-12.2013>
- Fredriksson, R., Nordström, K. J. V., Stephansson, O., Hägglund, M. G. A., & Schiöth, H. B. (2008). The solute carrier (SLC) complement of the human genome: Phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Letters*, 582(27), 3811–3816. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.10.016>
- Freneau, R. T., Troyer, M. D., Pahner, I., Nygaard, G. O., Tran, C. H., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., & Edwards, R. H. (2001). The Expression of Vesicular Glutamate Transporters Defines Two Classes of Excitatory Synapse. *Neuron*, 31(2), 247–260. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00344-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00344-0)
- Fu, W. M., Liou, J. C., Lee, Y. H., & Liou, H. C. (1995). Potentiation of neurotransmitter release by activation of presynaptic glutamate receptors at developing neuromuscular synapses of *Xenopus*. *The Journal of Physiology*, 489(3), 813–823. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp021094>
- Gaete, P. S., Lillo, M. A., & Figueroa, X. F. (2014). Functional role of connexins and pannexins in the interaction between vascular and nervous system. *Journal of Cellular Physiology*, 229(10), 1336–1345. <https://doi.org/10.1002/jcp.24563>
- García, C. I., Paez, P. M., Soto, E. F., & Pasquini, J. M. (2007). Differential Gene Expression during Development in Two Oligodendroglial Cell Lines Overexpressing Transferrin: A cDNA Array Analysis. *Developmental Neuroscience*, 29(6), 413–426. <https://doi.org/10.1159/000097317>
- Gesemann, M., Lesslauer, A., Maurer, C. M., Schönthaler, H. B., & Neuhaus, S. C. (2010). Phylogenetic analysis of the vertebrate Excitatory/Neutral Amino Acid Transporter (SLC1/EAAT) family reveals lineage specific subfamilies. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 117. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-117>
- Glitsch, M. D. (2008). Spontaneous neurotransmitter release and Ca²⁺—How spontaneous is spontaneous neurotransmitter release? *Cell Calcium*, 43(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.02.008>
- Goda, Y. (1997). SNAREs and regulated vesicle exocytosis. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences, 94(3), 769–772.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.3.769>

Gowrisankaran, S., & Milosevic, I. (2020). Regulation of synaptic vesicle acidification at the neuronal synapse. *IUBMB Life*, 72(4), 568–576.
<https://doi.org/10.1002/iub.2235>

Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2009). Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenatal Diagnosis*, 29(4), 303–311. <https://doi.org/10.1002/pd.2206>

Greuer, C., Gameiro, A., & Rauen, T. (2014). SLC1 glutamate transporters. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 466(1), 3–24.
<https://doi.org/10.1007/s00424-013-1397-7>

Grimmelikhuijzen, C. J. P., & Westfall, J. A. (1995). *The nervous systems of Cnidarians* (pp. 7–24). https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9219-3_2

Han, T. H., Dharkar, P., Mayer, M. L., & Serpe, M. (2015). Functional reconstitution of *Drosophila melanogaster* NMJ glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), 6182–6187.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1500458112>

Haucke, V., Neher, E., & Sigrist, S. J. (2011). Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(3), 127–138. <https://doi.org/10.1038/nrn2948>

Hediger, M. A., Romero, M. F., Peng, J.-B., Rolfs, A., Takanaga, H., & Bruford, E. A. (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 465–468.
<https://doi.org/10.1007/s00424-003-1192-y>

Heger, P., Zheng, W., Rottmann, A., Panfilio, K. A., & Wiehe, T. (2020). The genetic factors of bilaterian evolution. *ELife*, 9.
<https://doi.org/10.7554/eLife.45530>

Heldstab, S. A., Isler, K., Schuppli, C., & van Schaik, C. P. (2020). When ontogeny recapitulates phylogeny: Fixed neurodevelopmental sequence of manipulative skills among primates. *Science Advances*, 6(30), eabb4685. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb4685>

Hoglund, P. J., Nordstrom, K. J. V., Schioth, H. B., & Fredriksson, R. (2011). The Solute Carrier Families Have a Remarkably Long Evolutionary History with the Majority of the Human Families Present before Divergence of Bilaterian Species. *Molecular Biology and Evolution*, 28(4), 1531–1541. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq350>

Holland, L. Z. (2015). The origin and evolution of chordate nervous systems.

Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 370(1684), 20150048. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0048>

- Holland, L. Z., Carvalho, J. E., Escriva, H., Laudet, V., Schubert, M., Shimeld, S. M., & Yu, J.-K. (2013). Evolution of bilaterian central nervous systems: a single origin? *EvoDevo*, 4(1), 27. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-4-27>
- Hormuzdi, S. G., Filippov, M. A., Mitropoulou, G., Monyer, H., & Bruzzone, R. (2004). Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1662(1–2), 113–137. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.10.023>
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, 28(6), 1145–1152. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>
- Iharada, M., Miyaji, T., Fujimoto, T., Hiasa, M., Anzai, N., Omote, H., & Moriyama, Y. (2010). Type 1 Sodium-dependent Phosphate Transporter (SLC17A1 Protein) Is a Cl⁻-dependent Urate Exporter. *Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 26107–26113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.122721>
- James, E. J., Gu, J., Ramirez-Vizcarrondo, C. M., Hasan, M., Truszkowski, T. L. S., Tan, Y., Oupravanh, P. M., Khakhalin, A. S., & Aizenman, C. D. (2015). Valproate-Induced Neurodevelopmental Deficits in *Xenopus laevis* Tadpoles. *Journal of Neuroscience*, 35(7), 3218–3229. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4050-14.2015>
- Jayaswal, P. K., Dogra, V., Shanker, A., Sharma, T. R., & Singh, N. K. (2017). A tree of life based on ninety-eight expressed genes conserved across diverse eukaryotic species. *PLOS ONE*, 12(9), e0184276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184276>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.-Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Juge, N., Yoshida, Y., Yatsushiro, S., Omote, H., & Moriyama, Y. (2006).

- Vesicular Glutamate Transporter Contains Two Independent Transport Machineries. *Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 39499–39506. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607670200>
- Jutabha, P., Anzai, N., Hayashi, K., Domae, M., Uchida, K., Endou, H., & Sakurai, H. (2011). A Novel Human Organic Anion Transporter NPT4 Mediates the Transport of Ochratoxin A. *Journal of Pharmacological Sciences*, 116(4), 392–396. <https://doi.org/10.1254/jphs.10227SC>
- Kadlecova, Z., Spielman, S. J., Loerke, D., Mohanakrishnan, A., Reed, D. K., & Schmid, S. L. (2017). Regulation of clathrin-mediated endocytosis by hierarchical allosteric activation of AP2. *The Journal of Cell Biology*, 216(1), 167–179. <https://doi.org/10.1083/jcb.201608071>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kelly, B. T., McCoy, A. J., Späte, K., Miller, S. E., Evans, P. R., Höning, S., & Owen, D. J. (2008). A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature*, 456(7224), 976–979. <https://doi.org/10.1038/nature07422>
- Krey, J. F., & Dolmetsch, R. E. (2007). Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca²⁺ signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(1), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.01.010>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. . (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes¹¹Edited by F. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Kugler, P., & Schmitt, A. (1999). Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia*, 27(2), 129–142. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199908\)27:2<129::AID-GLIA3>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199908)27:2<129::AID-GLIA3>3.0.CO;2-Y)
- Källén, B., Robert, E., Mastroiacovo, P., Martinez-Frias, M. L., Castilla, E. E., & Cocchi, G. (1989). Anticonvulsant drugs and malformations is there a drug specificity? *European Journal of Epidemiology*, 5(1), 31–36. <https://doi.org/10.1007/BF00145041>
- Laundon, D., Larson, B. T., McDonald, K., King, N., & Burkhardt, P. (2019). The architecture of cell differentiation in choanoflagellates and sponge choanocytes. *PLOS Biology*, 17(4), e3000226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000226>

- Lawal, H. O., & Krantz, D. E. (2013). SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 360–372. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.005>
- Lee, D., Jung, S., Ryu, J., Ahnn, J., & Ha, I. (2008). Human vesicular glutamate transporters functionally complement EAT-4 in *C. elegans*. *Molecules and Cells*, 25(1), 50–54.
- Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(5), 760–793. <https://doi.org/10.1007/PL00000899>
- Li, F., Eriksen, J., Finer-Moore, J., Chang, R., Nguyen, P., Bowen, A., Myasnikov, A., Yu, Z., Bulkley, D., Cheng, Y., Edwards, R. H., & Stroud, R. M. (2020). Ion transport and regulation in a synaptic vesicle glutamate transporter. *Science*, 368(6493), 893–897. <https://doi.org/10.1126/science.aba9202>
- Li, H., Santos, M. S., Park, C. K., Dobry, Y., & Voglmaier, S. M. (2017). VGLUT2 Trafficking Is Differentially Regulated by Adaptor Proteins AP-1 and AP-3. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00324>
- Liang, J., Takeuchi, H., Doi, Y., Kawanokuchi, J., Sonobe, Y., Jin, S., Yawata, I., Li, H., Yasuoka, S., Mizuno, T., & Suzumura, A. (2008). Excitatory amino acid transporter expression by astrocytes is neuroprotective against microglial excitotoxicity. *Brain Research*, 1210, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.03.012>
- Liguz-Leczna, M., & Skangiel-Kramska, J. (2007). Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 67(3), 207–218. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17957901>
- Lindhout, D., Omtzigt, J. G., & Cornel, M. C. (1992). Spectrum of neural-tube defects in 34 infants prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Neurology*, 42(4 Suppl 5), 111–118. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1574164>
- Lukey, M. J., Greene, K. S., Erickson, J. W., Wilson, K. F., & Cerione, R. A. (2016). The oncogenic transcription factor c-Jun regulates glutaminase expression and sensitizes cells to glutaminase-targeted therapy. *Nature Communications*, 7(1), 11321. <https://doi.org/10.1038/ncomms11321>
- Mackenzie, B., Illing, A. C., Morris, M. E. K., Varoqui, H., & Erickson, J. D. (2008a). Analysis of a Vesicular Glutamate Transporter (VGLUT2) Supports a Cell-leakage Mode in Addition to Vesicular Packaging. *Neurochemical Research*, 33(2), 238–247. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9546-z>

- Mackenzie, B., Illing, A. C., Morris, M. E. K., Varoqui, H., & Erickson, J. D. (2008b). Analysis of a Vesicular Glutamate Transporter (VGLUT2) Supports a Cell-leakage Mode in Addition to Vesicular Packaging. *Neurochemical Research*, 33(2), 238–247. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9546-z>
- Magi, S., Piccirillo, S., Amoroso, S., & Lariccia, V. (2019). Excitatory Amino Acid Transporters (EAATs): Glutamate Transport and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5674. <https://doi.org/10.3390/ijms20225674>
- Martín-Durán, J. M., & Hejnol, A. (2019). A developmental perspective on the evolution of the nervous system. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.10.003>
- Martín-Durán, J. M., Pang, K., Børve, A., Lê, H. S., Furu, A., Cannon, J. T., Jondelius, U., & Hejnol, A. (2018). Convergent evolution of bilaterian nerve cords. *Nature*, 553(7686), 45–50. <https://doi.org/10.1038/nature25030>
- Martineau, M., Guzman, R. E., Fahlke, C., & Klingauf, J. (2017). VGLUT1 functions as a glutamate/proton exchanger with chloride channel activity in hippocampal glutamatergic synapses. *Nature Communications*, 8(1), 2279. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02367-6>
- Mayorquin, L. C., Rodriguez, A. V., Sutachan, J.-J., & Albarracín, S. L. (2018). Connexin-Mediated Functional and Metabolic Coupling Between Astrocytes and Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00118>
- Mayr, E. (1994). Recapitulation Reinterpreted: The Somatic Program. *The Quarterly Review of Biology*, 69(2), 223–232. <https://doi.org/10.1086/418541>
- Milosevic, I. (2018). Revisiting the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis in Synaptic Vesicle Recycling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00027>
- Mim, C., Balani, P., Rauen, T., & Grever, C. (2005). The Glutamate Transporter Subtypes EAAT4 and EAATs 1-3 Transport Glutamate with Dramatically Different Kinetics and Voltage Dependence but Share a Common Uptake Mechanism. *Journal of General Physiology*, 126(6), 571–589. <https://doi.org/10.1085/jgp.200509365>
- Miyaji, T., Omote, H., & Moriyama, Y. (2011). Functional characterization of vesicular excitatory amino acid transport by human sialin. *Journal of Neurochemistry*, 119(1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07388.x>

- Montcouquiol, M., Crenshaw, E. B., & Kelley, M. W. (2006). NONCANONICAL WNT SIGNALING AND NEURAL POLARITY. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 363–386. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112933>
- Moriyama, Y., Hiasa, M., Sakamoto, S., Omote, H., & Nomura, M. (2017). Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signalling*, 13(3), 387–404. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9568-1>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Morse, R. P., Kleta, R., Alroy, J., & Gahl, W. A. (2005). Novel Form of Intermediate Salla Disease: Clinical and Neuroimaging Features. *Journal of Child Neurology*, 20(10), 814–816. <https://doi.org/10.1177/08830738050200100601>
- Nickel, M. (2010). Evolutionary emergence of synaptic nervous systems: what can we learn from the non-synaptic, nerveless Porifera? *Invertebrate Biology*, 129(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2010.00193.x>
- Nielsen, C. (2015). Larval nervous systems: true larval and precocious adult. *Journal of Experimental Biology*, 218(4), 629–636. <https://doi.org/10.1242/jeb.109603>
- Nielsen, Claus. (2017). Evolution of deuterostomy - and origin of the chordates. *Biological Reviews*, 92(1), 316–325. <https://doi.org/10.1111/brv.12229>
- Nieuwkoop, P., & Faber, J. (1994). *Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin): A Systematical & Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis*.
- Northcutt, R. G. (2012). Evolution of centralized nervous systems: Two schools of evolutionary thought. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(Supplement_1), 10626–10633. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201889109>
- Ogita, K., Hirata, K., Bole, D. G., Yoshida, S., Tamura, Y., Leckenby, A. M., & Ueda, T. (2001). Inhibition of vesicular glutamate storage and exocytotic release by Rose Bengal. *Journal of Neurochemistry*, 77(1), 34–42. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00200.x>
- Ohno, S. (1995). Why ontogeny recapitulates phylogeny. *Electrophoresis*, 16(1), 1782–1786. <https://doi.org/10.1002/elps.11501601295>

- Ovsepián, S. V. (2017). The birth of the synapse. *Brain Structure and Function*, 222(8), 3369–3374. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1459-2>
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, 32(8), 421–431. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>
- Pereda, A. E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(4), 250–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3708>
- Pietrancosta, N., Djibo, M., Daumas, S., El Mestikawy, S., & Erickson, J. D. (2020). Molecular, Structural, Functional, and Pharmacological Sites for Vesicular Glutamate Transporter Regulation. *Molecular Neurobiology*, 57(7), 3118–3142. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01912-7>
- Pietrancosta, N., Kessler, A., Favre-Besse, F.-C., Triballeau, N., Quentin, T., Giros, B., Mestikawy, S. El, & Acher, F. C. (2010). Rose Bengal analogs and vesicular glutamate transporters (VGLUTs). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(18), 6922–6933. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.069>
- Pollet, N., Muncke, N., Verbeek, B., Li, Y., Fenger, U., Delius, H., & Niehrs, C. (2005). An atlas of differential gene expression during early *Xenopus* embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 122(3), 365–439. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.11.009>
- Pratt, K. G., & Khakhalin, A. S. (2013). Modeling human neurodevelopmental disorders in the *Xenopus* tadpole: from mechanisms to therapeutic targets. *Disease Models & Mechanisms*, 6(5), 1057–1065. <https://doi.org/10.1242/dmm.012138>
- Prolo, L. M., Vogel, H., & Reimer, R. J. (2009). The Lysosomal Sialic Acid Transporter Sialin Is Required for Normal CNS Myelination. *Journal of Neuroscience*, 29(49), 15355–15365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3005-09.2009>
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., & White, L. E. (2012). *Neuroscience*. Sinauer Associates, Inc.
- Qian, N., & Sejnowski, T. J. (1990). When is an inhibitory synapse effective? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(20), 8145–8149. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.20.8145>
- Quetglas, S., Leveque, C., Miquelís, R., Sato, K., & Seagar, M. (2000). Ca²⁺-dependent regulation of synaptic SNARE complex assembly via a calmodulin- and phospholipid-binding domain of synaptobrevin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17), 9695–9700.

<https://doi.org/10.1073/pnas.97.17.9695>

- Ramakrishnan, N. A., Drescher, M. J., & Drescher, D. G. (2012). The SNARE complex in neuronal and sensory cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *50*(1), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.03.009>
- Reimer, R. J. (2013). SLC17: A functionally diverse family of organic anion transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(2–3), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.004>
- Reimer, R. J., & Edwards, R. H. (2004). Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, *447*(5), 629–635. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1087-y>
- Rizzoli, S. O. (2014). Synaptic vesicle recycling: steps and principles. *The EMBO Journal*, *33*(8), 788–822. <https://doi.org/10.1002/embj.201386357>
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, *19*(12), 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., & Kuncl, R. W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, *13*(3), 713–725. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90038-8)
- Rowe, S. J., Messenger, N. J., & Warner, A. E. (1993). The role of noradrenaline in the differentiation of amphibian embryonic neurons. *Development (Cambridge, England)*, *119*(4), 1343–1357. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306892>
- Rubio, M. D., Drummond, J. B., & Meador-Woodruff, J. H. (2012). Glutamate Receptor Abnormalities in Schizophrenia: Implications for Innovative Treatments. *Biomolecules and Therapeutics*, *20*(1), 1–18. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.1.001>
- Rumping, L., Büttner, B., Maier, O., Rehmann, H., Lequin, M., Schlump, J.-U., Schmitt, B., Schieberger-Bronkhorst, B., Prinsen, H. C. M. T., Losa, M., Fingerhut, R., Lemke, J. R., Zwartkuis, F. J. T., Houwen, R. H. J., Jans, J. J. M., Verhoeven-Duif, N. M., van Hasselt, P. M., & Jamra, R. (2019). Identification of a Loss-of-Function Mutation in the Context of Glutaminase Deficiency and Neonatal Epileptic Encephalopathy. *JAMA Neurology*, *76*(3), 342. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2941>
- Ryan, T. J., & Grant, S. G. N. (2009). The origin and evolution of synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(10), 701–712. <https://doi.org/10.1038/nrn2717>

- Saksela, K., & Permi, P. (2012). SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS Letters*, *586*(17), 2609–2614. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.042>
- Sander, K. (2002). Ernst haeckel's ontogenetic recapitulation: irritation and incentive from 1866 to our time. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, *184*(6), 523–533. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(02\)80092-9](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(02)80092-9)
- Santos, M. S., Foss, S. M., Park, C. K., & Voglmaier, S. M. (2014). Protein Interactions of the Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1. *PLoS ONE*, *9*(10), e109824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109824>
- Satpathy, M., Leuschel, M., & Butler, M. (2005). ProTest: An Automatic Test Environment for B Specifications. *Electronic Notes in Theoretical Computer Science*, *111*, 113–136. <https://doi.org/10.1016/j.entcs.2004.12.009>
- Satterlie, R. A. (2015). Cnidarian Nerve Nets and Neuromuscular Efficiency. *Integrative and Comparative Biology*, *55*(6), 1050–1057. <https://doi.org/10.1093/icb/icv067>
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., & Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(15), 5683–5686. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800141105>
- Schafer, W. (2016). Nematode nervous systems. *Current Biology*, *26*(20), R955–R959. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.044>
- Schaible, H.-G. (2007). Peripheral and Central Mechanisms of Pain Generation. In *Analgesia* (pp. 3–28). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-33823-9_1
- Schenck, S., Wojcik, S. M., Brose, N., & Takamori, S. (2009). A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nature Neuroscience*, *12*(2), 156–162. <https://doi.org/10.1038/nn.2248>
- Schiavo, G., Stenbeck, G., Rothman, J. E., & Sollner, T. H. (1997). Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(3), 997–1001. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.3.997>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona,

- A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schnell, S., & Maher de Leon, M. E. (1998). Anatomy of the central nervous system. *Seminars in Oncology Nursing*, 14(1), 2–7. [https://doi.org/10.1016/S0749-2081\(98\)80037-5](https://doi.org/10.1016/S0749-2081(98)80037-5)
- Sequerra, E. B., Goyal, R., Castro, P. A., Levin, J. B., & Borodinsky, L. N. (2018). NMDA Receptor Signaling Is Important for Neural Tube Formation and for Preventing Antiepileptic Drug-Induced Neural Tube Defects. *The Journal of Neuroscience*, 38(20), 4762–4773. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2634-17.2018>
- Siepel, A. (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Research*, 15(8), 1034–1050. <https://doi.org/10.1101/gr.3715005>
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels: Structure, Function, and Dysfunction. *Neuron*, 82(1), 24–45. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>
- Sive, H., Grainger, R. M., & Harland, R. M. (2000). *Early Development of Xenopus laevis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smith, J. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends in Neurosciences*, 20(11), 510–517. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01121-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01121-1)
- Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, 444(7120), 707–712. <https://doi.org/10.1038/nature05300>
- Sreedharan, S., Shaik, J. H., Olszewski, P. K., Levine, A. S., Schiöth, H. B., & Fredriksson, R. (2010). Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression. *BMC Genomics*, 11(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-17>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Sternini, C. (1997). Organization of the Peripheral Nervous System: Autonomic and Sensory Ganglia. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.1997.2>
- Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuriyama, S., & Mayor, R. (2009). Differential requirements of BMP and Wnt signalling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development*, 136(5), 771–779. <https://doi.org/10.1242/dev.029017>

- Stottmann, R. W., Berrong, M., Matta, K., Choi, M., & Klingensmith, J. (2006). The BMP antagonist Noggin promotes cranial and spinal neurulation by distinct mechanisms. *Developmental Biology*, 295(2), 647–663. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.051>
- Südhof, T. C., & Malenka, R. C. (2008). Understanding Synapses: Past, Present, and Future. *Neuron*, 60(3), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.011>
- Sudhof, T. C., & Rothman, J. E. (2009). Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. *Science*, 323(5913), 474–477. <https://doi.org/10.1126/science.1161748>
- Szaszák, M., Gáborik, Z., Turu, G., McPherson, P. S., Clark, A. J. L., Catt, K. J., & Hunyady, L. (2002). Role of the Proline-rich Domain of Dynamin-2 and Its Interactions with Src Homology 3 Domains during Endocytosis of the AT1 Angiotensin Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21650–21656. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200778200>
- Takamori, S. (2016). Presynaptic Molecular Determinants of Quantal Size. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00002>
- Tani, H., Dulla, C. G., Farzampour, Z., Taylor-Weiner, A., Huguenard, J. R., & Reimer, R. J. (2014). A Local Glutamate-Glutamine Cycle Sustains Synaptic Excitatory Transmitter Release. *Neuron*, 81(4), 888–900. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.026>
- Tarailo-Graovac, M., Drögemöller, B. I., Wasserman, W. W., Ross, C. J. D., van den Ouweland, A. M. W., Darin, N., Kollberg, G., van Karnebeek, C. D. M., & Blomqvist, M. (2017). Identification of a large intronic transposal insertion in SLC17A5 causing sialic acid storage disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0584-6>
- Thapliyal, S., Ravindranath, S., & Babu, K. (2018). Regulation of Glutamate Signaling in the Sensorimotor Circuit by CASY-1A/Calsyntenin in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 208(4), 1553–1564. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300834>
- Thiel, D., Franz-Wachtel, M., Aguilera, F., & Hejnol, A. (2018). Xenacoelomorph Neuropeptidomes Reveal a Major Expansion of Neuropeptide Systems during Early Bilaterian Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 35(10), 2528–2543. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy160>
- Thompson, C. M., & Chao, C.-K. (2020). VGLUT substrates and inhibitors: A computational viewpoint. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -*

- Togawa, N., Miyaji, T., Izawa, S., Omote, H., & Moriyama, Y. (2012). A Na⁺ - phosphate cotransporter homologue (SLC17A4 protein) is an intestinal organic anion exporter. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 302(11), C1652–C1660. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00015.2012>
- Ubbels, G. A., Hara, K., Koster, C. H., & Kirschner, M. W. (1983). Evidence for a functional role of the cytoskeleton in determination of the dorsoventral axis in *Xenopus laevis* eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 77, 15–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6689175>
- Varoqueaux, F., & Fasshauer, D. (2017). Getting Nervous: An Evolutionary Overhaul for Communication. *Annual Review of Genetics*, 51(1), 455–476. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024648>
- Vavassori, S., & Mayer, A. (2014). A new life for an old pump: V-ATPase and neurotransmitter release. *The Journal of Cell Biology*, 205(1), 7–9. <https://doi.org/10.1083/jcb.201403040>
- Vicario, N., Zappalà, A., Calabrese, G., Gulino, R., Parenti, C., Gulisano, M., & Parenti, R. (2017). Connexins in the Central Nervous System: Physiological Traits and Neuroprotective Targets. *Frontiers in Physiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01060>
- Voglmaier, S. M., Kam, K., Yang, H., Fortin, D. L., Hua, Z., Nicoll, R. A., & Edwards, R. H. (2006). Distinct Endocytic Pathways Control the Rate and Extent of Synaptic Vesicle Protein Recycling. *Neuron*, 51(1), 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.027>
- Volk, L., Chiu, S.-L., Sharma, K., & Huganir, R. L. (2015). Glutamate Synapses in Human Cognitive Disorders. *Annual Review of Neuroscience*, 38(1), 127–149. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033821>
- Wallingford, J. B., Niswander, L. A., Shaw, G. M., & Finnell, R. H. (2013). The Continuing Challenge of Understanding, Preventing, and Treating Neural Tube Defects. *Science*, 339(6123), 1222002–1222002. <https://doi.org/10.1126/science.1222002>
- Wang, X., & Sun, Q.-Q. (2012). Characterization of axo-axonic synapses in the piriform cortex of *Mus musculus*. *The Journal of Comparative Neurology*, 520(4), 832–847. <https://doi.org/10.1002/cne.22792>
- Werler, M. M., Ahrens, K. A., Bosco, J. L. F., Mitchell, A. A., Anderka, M. T., Gilboa, S. M., & Holmes, L. B. (2011). Use of Antiepileptic Medications in Pregnancy in Relation to Risks of Birth Defects. *Annals of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2011.08.002>

- Wojcik, S. M., Rhee, J. S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N., & Rosenmund, C. (2004). An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(18), 7158–7163. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401764101>
- Wolosker, H., de Souza, D. O., & de Meis, L. (1996). Regulation of Glutamate Transport into Synaptic Vesicles by Chloride and Proton Gradient. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(20), 11726–11731. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.20.11726>
- Wu, G.-Y., Malinow, R., & Cline, H. T. (1996). Maturation of a Central Glutamatergic Synapse. *Science*, *274*(5289), 972–976. <https://doi.org/10.1126/science.274.5289.972>
- Wu, X.-S., Xue, L., Mohan, R., Paradiso, K., Gillis, K. D., & Wu, L.-G. (2007). The Origin of Quantal Size Variation: Vesicular Glutamate Concentration Plays a Significant Role. *Journal of Neuroscience*, *27*(11), 3046–3056. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4415-06.2007>
- Ybot-Gonzalez, P., Gaston-Massuet, C., Girdler, G., Klingensmith, J., Arkell, R., Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2007). Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development*, *134*(17), 3203–3211. <https://doi.org/10.1242/dev.008177>
- Zhang, X. M., François, U., Silm, K., Angelo, M. F., Fernandez-Busch, M. V., Maged, M., Martin, C., Bernard, V., Cordelières, F. P., Deshors, M., Pons, S., Maskos, U., Bemelmans, A. P., Wojcik, S. M., El Mestikawy, S., Humeau, Y., & Herzog, E. (2019). A proline-rich motif on VGLUT1 reduces synaptic vesicle super-pool and spontaneous release frequency. *ELife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.50401>
- Zoidl, G., & Dermietzel, R. (2002). On the search for the electrical synapse: a glimpse at the future. *Cell and Tissue Research*, *310*(2), 137–142. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0632-x>

ANEXOS

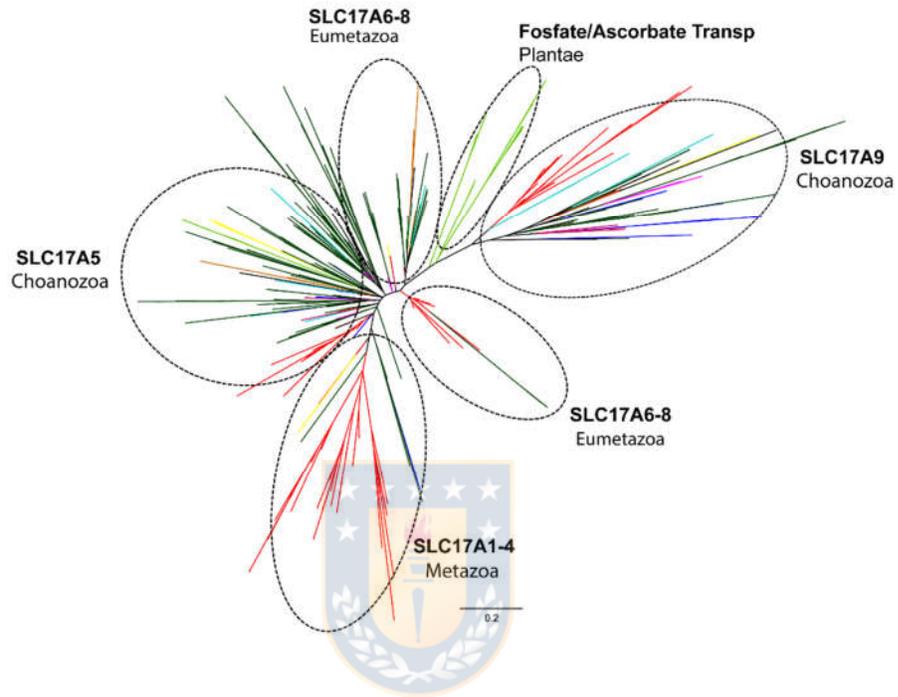


Figura S1. Árbol filogenético basado en análisis de Máxima Verosimilitud de las miembros de la familia de transportadores de solutos 17 o SLC17. En círculos punteados se agrupan las secuencias ortólogas a los miembros de esta familia: SLC17A-4, Transportadores de Fosfato; SLC17A5, Sialina; SLC17A6-8, Transportadores Vesiculares de Glutamato o VGLUTs; SLC17A9. Transportador Vesicular de Nucleótidos o VNUT.

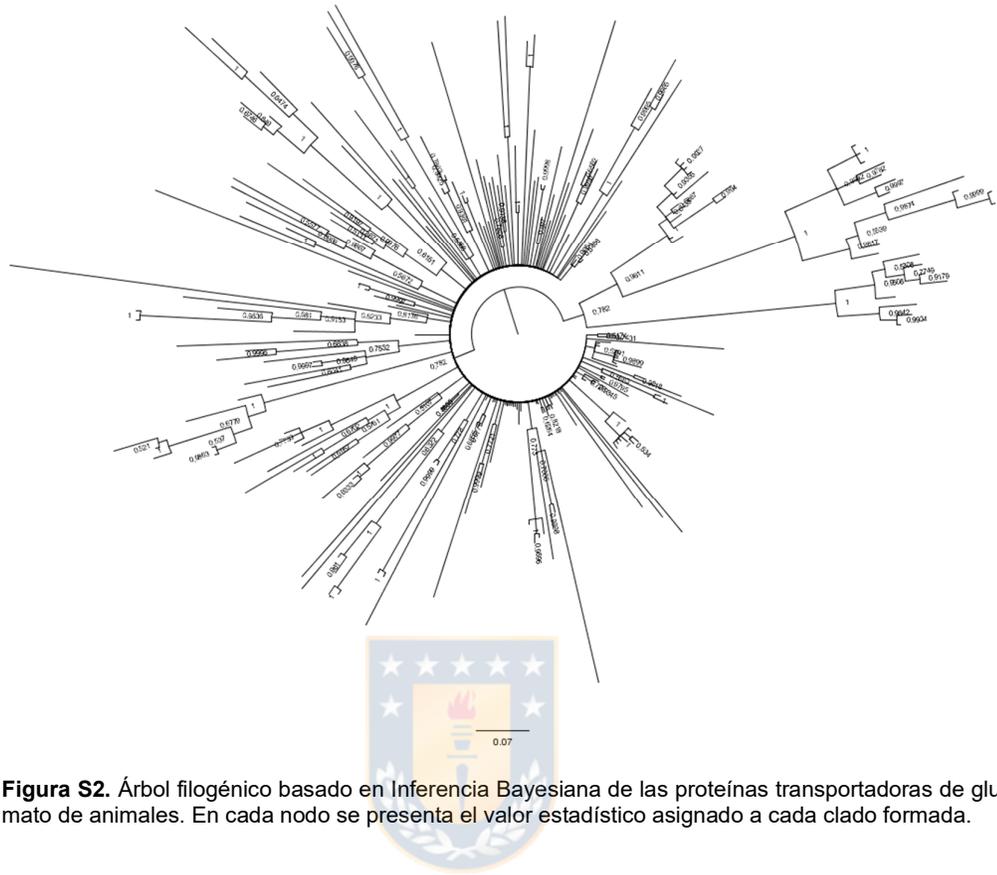


Figura S2. Árbol filogenético basado en Inferencia Bayesiana de las proteínas transportadoras de glutamato de animales. En cada nodo se presenta el valor estadístico asignado a cada clado formada.

Tabla S1. Especies utilizadas para análisis filogenéticos y estructurales, junto con la base de datos o repositorio utilizado para obtener sus secuencias de proteínas.

Código Interno	Especie	Base de datos utilizada
Mmul	<i>Macaca mulatta</i>	Ensembl vertebrates
Csab	<i>Chloroceus sabaeus</i>	Ensembl vertebrates
Cjac	<i>Callithrix jacchus</i>	Ensembl vertebrates
Cpor	<i>Cavia porcellus</i>	Ensembl vertebrates
Hgla	<i>Heterocephalus glaber</i>	Ensembl vertebrates
Ocun	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Ensembl vertebrates
Tbel	<i>Tupaia belangeri</i>	Ensembl vertebrates
Btau	<i>Bos Taurus</i>	Ensembl vertebrates
Sscr	<i>Sus scrofa</i>	Ensembl vertebrates
Cfam	<i>Canis familiaris</i>	Ensembl vertebrates
Fcat	<i>Felis catus</i>	Ensembl vertebrates
Mput	<i>Mustela putorius furo</i>	Ensembl vertebrates
Mdom	<i>Monodelphis domestica</i>	Ensembl vertebrates
Shar	<i>Sarcophilus harrisii</i>	Ensembl vertebrates
Ttru	<i>Tursiops truncatus</i>	Ensembl vertebrates
Oana	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Ensembl vertebrates
Hsap	<i>Homo Sapiens</i>	Ensembl vertebrates
Rnor	<i>Rattus norvegicus</i>	Ensembl vertebrates
Nper	<i>Nothoprocta perdicaria</i>	Ensembl vertebrates
Dnov	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	Ensembl vertebrates
Ggal	<i>Gallus gallus</i>	Ensembl vertebrates
Tgut	<i>Taeniopygia guttata</i>	Ensembl vertebrates
Acar	<i>Anolis carolinensis</i>	Ensembl vertebrates
Pvit	<i>Pogona vitticeps</i>	Ensembl vertebrates
Psin	<i>Pelodiscus sinensis</i>	Ensembl vertebrates
Amex	<i>Ambystoma mexicanum</i>	https://www.axolotl-omics.org/
Xlea	<i>Xenopus leavis</i>	Xenbase
Xtro	<i>Xenopus tropicalis</i>	Ensembl vertebrates
Trub	<i>Takifugu rubripes</i>	Ensembl vertebrates
Drer	<i>Danio rerio</i>	Ensembl vertebrates
Aper	<i>Amphiprion percula</i>	Ensembl vertebrates
Tngv	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Ensembl vertebrates
Onil	<i>Oreochromis niloticus</i>	Ensembl vertebrates
Lcha	<i>Latimeria chalumnae</i>	Ensembl vertebrates
Ebur	<i>Eptatretus burgeri</i>	Ensembl vertebrates
Pmar	<i>Petromyzon marinus</i>	Ensembl vertebrates
Bflo	<i>Branchiostoma floridae</i>	https://genome.jgi.doe.gov/
Blan	<i>Branchiostoma lancealatum</i>	http://amphiencode.github.io
Cint	<i>Ciona intestinalis</i>	Ensembl vertebrates

Oiko	<i>Oikopleura dioica</i>	http://www.genoscope.cns.fr
Csav	<i>Ciona savignyi</i>	Ensembl vertebrates
Skow	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	OIST Molecular Genomics
Pfla	<i>Ptychodera flava</i>	OIST Molecular Genomics
Tnig	<i>Tetrapygyus niger</i>	
Lvar	<i>Lytechinus variegatus</i>	Echinobase
Pmin	<i>Patiria minata</i>	Echinobase
Spur	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Ensembl Metazoa
Ctel	<i>Capitella teleta</i>	Ensembl Metazoa
Hrob	<i>Helobdella robusta</i>	Ensembl Metazoa
Pfuc	<i>Pinctada fucata</i>	OIST Marine Genomics Unit
Lgig	<i>Lottia gigantea</i>	Ensembl Metazoa
Cgig	<i>Crassostrea gigas</i>	Ensembl Metazoa
Octo	<i>Octopus bimaculoides</i>	Ensembl Metazoa
Ngen	<i>Notospermus geniculatus</i>	OIST Marine Genomics Unit
Paus	<i>Phoronis australis</i>	OIST Marine Genomics Unit
Lana	<i>Lingula anatina</i>	Ensembl Metazoa
Emul	<i>Echinococcus multicularis</i>	WormBase ParaSite
Hmic	<i>Hymenolepsis microstoma</i>	WormBase ParaSite
Smed	<i>Schimedtea mediterranea</i>	WormBase ParaSite
Mlig	<i>Macrostomum lignano</i>	WormBase ParaSite
Sman	<i>Schistosoma mansoni</i>	Ensembl Metazoa
Ilin	<i>Intoshia linei</i>	NCBI
Hduj	<i>Hypsibius dujardini</i>	tardigrades.org
Rvar	<i>Ramazzottius varieornatus</i>	tardigrades.org
Hmia	<i>Hofstenia miamia</i>	http://srivastavalab.rc.fas.harvard.edu/
Pnai	<i>Praesagitifera naikaiensis</i>	OIST Marine Genomics Unit
Avag	<i>Adineta vaga</i>	Ensembl Metazoa
Bmal	<i>Brugia malayi</i>	Ensembl Metazoa
Cele	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Ensembl Metazoa
Lloa	<i>Loa</i>	Ensembl Metazoa
Ovol	<i>Onchocerca volvulus</i>	Ensembl Metazoa
Ppac	<i>Pristionchus pacificus</i>	Ensembl Metazoa
Tspi	<i>Trichinella spiralis</i>	Ensembl Metazoa
Srat	<i>Strongyloides ratti</i>	Ensembl Metazoa
Tcas	<i>Tribolium castaneum</i>	Ensembl Metazoa
Agam	<i>Anopheles gambiae</i>	Ensembl Metazoa
Dmel	<i>Drosophila melanogaster</i>	Ensembl Metazoa
Amel	<i>Apis mellifera</i>	Ensembl Metazoa
Nvit	<i>Nasonia vitripennis</i>	Ensembl Metazoa
Hmel	<i>Heliconius melpomene</i>	Ensembl Metazoa

Phum	<i>Pediculus humanos</i>	Ensembl Metazoa
Dpul	<i>Daphnia pulex</i>	Ensembl Metazoa
Isca	<i>Ixodes scapularis</i>	Ensembl Metazoa
Smar	<i>Strigamia maritima</i>	Ensembl Metazoa
Nvec	<i>Nematostella vectensis</i>	Ensembl Metazoa
Hmag	<i>Hydra magnipapillata</i>	Compagen
Adig	<i>Acropora digitifera</i>	OIST Marine Genomics Unit
Aaur	<i>Aurelia aurita</i>	OIST Marine Genomics Unit
Mvir	<i>Morbakka virulenta</i>	OIST Marine Genomics Unit
Aque	<i>Amphimedon queenslandia</i>	Ensembl Metazoa
Lcom	<i>Leucosolenia complicata</i>	Compagen
Ocar	<i>Oscarella carmela</i>	Compagen
Scil	<i>Sycon ciliatum</i>	Compagen
Mlei	<i>Mnemiopsis leidyi</i>	Ensembl Metazoa
Pbac	<i>Pleurobranchia bachei</i>	Neurobase
Mbre	<i>Monosiga brevicolis</i>	Ensembl Protist
Sros	<i>Salpingoeca rosetta</i>	Ensembl protist
Cowc	<i>Capsaspora owczarzaki</i>	Ensembl protist
Scer	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ensembl Fungi
Ncra	<i>Neurospora crassa</i>	Ensembl Fungi
Amus	<i>Amanita muscaria</i>	Ensembl Fungi
Anig	<i>Aspergillus niger</i>	Ensembl Fungi
Atha	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ensembl Plants
Osat	<i>Oryza sativa</i>	Ensembl Plants
Natt	<i>Nicotiana attenuata</i>	Ensembl Plants
Zmay	<i>Zea mays</i>	Ensembl Plants
Csat	<i>Cannabis sativa</i>	http://genome.ccb.utoronto.ca/downloads.html
Esil	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Joint Genome Institute

Tabla S2. Estadísticas de los valores de energía (ΔG) obtenidos en “docking” ciego del motivo di-leucina-like de diferentes especies de animales con la proteína AP-2 de *Mus musculus*.

	Mean	SD	SEM
<i>A. queenslandica</i>	-4,933	0,2082	0,1202
<i>H. miamia</i>	-5,48	0,507	0,2267
<i>S. purpuratus</i>	-6,5	0,781	0,4509
<i>B. floridae</i>	-5,65	0,4359	0,2179
<i>C. intestinalis</i>	-5,425	0,2062	0,1031
<i>H. sapiens</i>	-6,34	0,1517	0,06782
<i>M. musculus</i>	-6,38	0,3701	0,1655
<i>X. laevis</i>	-6,34	0,2881	0,1288
<i>C. gigas</i>	-5,5	0,3464	0,1732
<i>N. geniculatus</i>	-5,45	0,1291	0,06455
<i>D. melanogaster</i>	-6,35	0,2646	0,1323

