



Inducción de la regeneración y adquisición del diseño corporal en planarias:

Señalización de las vías JNK y Wnt no canónica

María Almuedo Castillo

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

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

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

Inducción de la regeneración y adquisición del diseño corporal en planarias:

Señalización de las vías JNK y Wnt no canónica

María Almuedo Castillo

Tesis doctoral

En portada, “Prométhée enchaîné” (Prometeo encadenado), 1762, Museo del Louvre. Nicolas Sébastien Adam (Nancy, 22 de marzo de 1705; París, 27 de marzo de 1778).

Esta estatua representa a Prometeo, el Titán protector de la civilización humana según la mitología griega. Tras engañar a Zeus y devolver a la humanidad el fuego del que éste les había privado, Prometeo fue encadenado en el Cáucaso y castigado eternamente a que un águila se comiera su hígado todos los días, ya que al ser inmortal, el hígado volvía a regenerarle cada noche.

**Sólo cabe progresar cuando se piensa en grande,
sólo se puede avanzar cuando se mira lejos.**

Ortega y Gasset

FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO
AÑO 2009

Inducción de la regeneración y adquisición del diseño corporal en planarias: Señalización de las vías JNK y Wnt no canónica

Memoria presentada por
María Almuedo Castillo

Para obtener el grado de
Doctora por la Universidad de Barcelona

Tesis doctoral realizada bajo la dirección del Dr. Emili Saló i Boix y la Dra. Teresa Adell
Creixell en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la
Universidad de Barcelona

Firmado,
Los directores:

Firmado,
La doctoranda,

Dr. Emili Saló i Boix

Dra. Teresa Adell Creixell

María Almuedo Castillo

Barcelona, 6 mayo de 2014

ÍNDICE

ÍNDICE	I
INTRODUCCIÓN	3
1. La planaria: organismo modelo para el estudio de la regeneración y del recambio tisular	3
1.1. La planaria Schmidtea mediterranea	5
1.2. Los neoblastos, las células madre de planaria	6
1.2.1. Genes necesarios para el mantenimiento de los neoblastos.....	9
1.2.2. Genes necesarios para la diferenciación de los neoblastos.....	11
2. Procesos regenerativos en planaria	16
2.1. Cicatrización de la herida o “wound healing”	16
2.2. Muerte celular programada	20
2.2.1. Apoptosis.....	20
2.2.2. Autofagia.....	22
2.3. Respuesta proliferativa de los neoblastos	23
2.4. Información Posicional	27
2.4.1. Especificación del eje Antero-Posterior (AP).....	27
2.4.1.1. Posterior versus Anterior: la vía Wnt canónica o β -catenin-dependiente.....	28
2.4.1.2. Apoyando a la β -catenin: la vía Hedgehog.....	35
2.4.1.3. Comunicación a través de las “gap-junctions” y transporte de iones.....	37
2.4.1.4. Establecimiento y mantenimiento de la identidad AP durante las primeras fases de la respuesta regenerativa.....	38
2.4.1.5. Regeneración de los polos AP y establecimiento de la línea media.....	40
2.4.2. Especificación del eje Dorso-Ventral (DV).....	43
2.4.3. Especificación del eje Medio-Lateral (ML).....	47
3. Los órganos de planaria y su regeneración	50
3.1. El sistema nervioso	50
3.1.1. Regeneración del sistema nervioso.....	53

3.1.2. Regeneración del sistema visual.	56
3.2. El sistema digestivo.	57
3.2.1. Regeneración del sistema digestivo.	58
3.3. El sistema excretor.	59
3.3.1. Regeneración del sistema excretor.	60
3.4. El sistema muscular.	62
3.4.1. Regeneración del sistema muscular.	63
4. “Remodeling”: recambio celular, crecimiento y decrecimiento.	64
5. La vía Wnt: Dishevelled como núcleo organizador.	68
5.1. Dishevelled en la vía Wnt canónica/ β -catenin dependiente.	69
5.2. Dishevelled en la vía Wnt no canónica/ β -catenin independiente.	70
5.2.1. Migración celular durante los movimientos de “Convergent-Extension” (CE).	73
5.2.2. Migración neuronal.	73
5.2.3. Ciliogénesis y posicionamiento de los MTOC.	74
6. La vía JNK: mecanismo de respuesta a estrés.	76
6.1. Elongación celular y el cierre dorsal embrionario (embryonic dorsal closure) de <i>Drosophila</i>	78
6.2. Muerte celular programada: inducción de la apoptosis.	79
6.3. Biología de las células madre.	80
6.4. Neurogénesis.	81
6.5. Cicatrización o “wound healing”.	81
<u>OBJETIVOS</u>.	85
<u>RESULTADOS</u>.	89
Informe de los directores sobre la participación de la doctoranda y el índice de impacto de las publicaciones.	89
Artículo 1: “Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians”	93
Resumen en castellano.	95
Artículo.	97
Material Suplementario.	103

Artículo 2: “Wnt5-Ror and Slit signaling generates a mutually dependent system to establish a corridor for nervous system regeneration and maintenance in planarians”	115
Resumen en castellano.....	117
Artículo.....	119
Material Suplementario.....	135
Artículo 3: “JNK controls the onset of mitosis in planarian stem cells and triggers apoptotic cell death required for regeneration and remodeling”	139
Resumen en castellano.....	141
Artículo.....	143
Material Suplementario.....	164
<u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	177
1. Segregación funcional de los parálogos de Dishevelled en planaria.	179
2. La vía PCP en planarias.....	182
3. La ciliogénesis en planarias.....	184
4. Conservación funcional de la señalización wnt5/Ror en restringir la migración neuronal durante la regeneración del Sistema Nervioso. ...	185
5. La línea media: elongación y “patterning” ML del blastema.....	189
6. La vía JNK coordina la respuesta regenerativa.....	194
7. La vía JNK durante el cierre de la herida o “wound closure”.....	196
8. La vía JNK y la especialización de los neoblastos: El modelo de “Specialized neoblasts”.....	199
9. La vía JNK durante el “remodeling”.....	203
10. La JNK como un mecanismo de respuesta al estrés a gran escala.	205
<u>CONCLUSIONES</u>	211
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	215

<u>ANEXOS</u>	239
Artículo 4: “Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by Wnt/β-catenin pathway”	239
Resumen en castellano.....	241
Artículo.....	243
Material Suplementario.....	254
Revisión 1: “Wnt signaling in planarians: new answers to old questions”	265
Resumen en castellano.....	267
Artículo.....	269
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	285

INTRODUCCIÓN

1. La planaria: organismo modelo para el estudio de la regeneración y del recambio tisular

The word "regeneration" has come to mean, in general usage, not only the replacement of a lost part, but also the development of a new, whole organism, or even a part of an organism, from a piece of an adult, or of an embryo, or of an egg. We must include also these cases in which the part replaced is less than the part removed, or even different in kind (Morgan, 1901)

La capacidad de regenerar estructuras tras una amputación ha capturado la atención de generaciones de biólogos ya desde principios del siglo XVIII, cuando por ejemplo, Pieter S. Pallas realizó los primeros experimentos datados sobre la regeneración de planaria (Pallas, 1774). A lo largo de los años, se ha demostrado que la habilidad de regenerar se extiende a lo largo del reino animal, con especies capaces de regenerar pertenecientes a todos los phyla, como los cnidarios, platelmintos, anélidos, moluscos y cordados vertebrados (Figura 1).

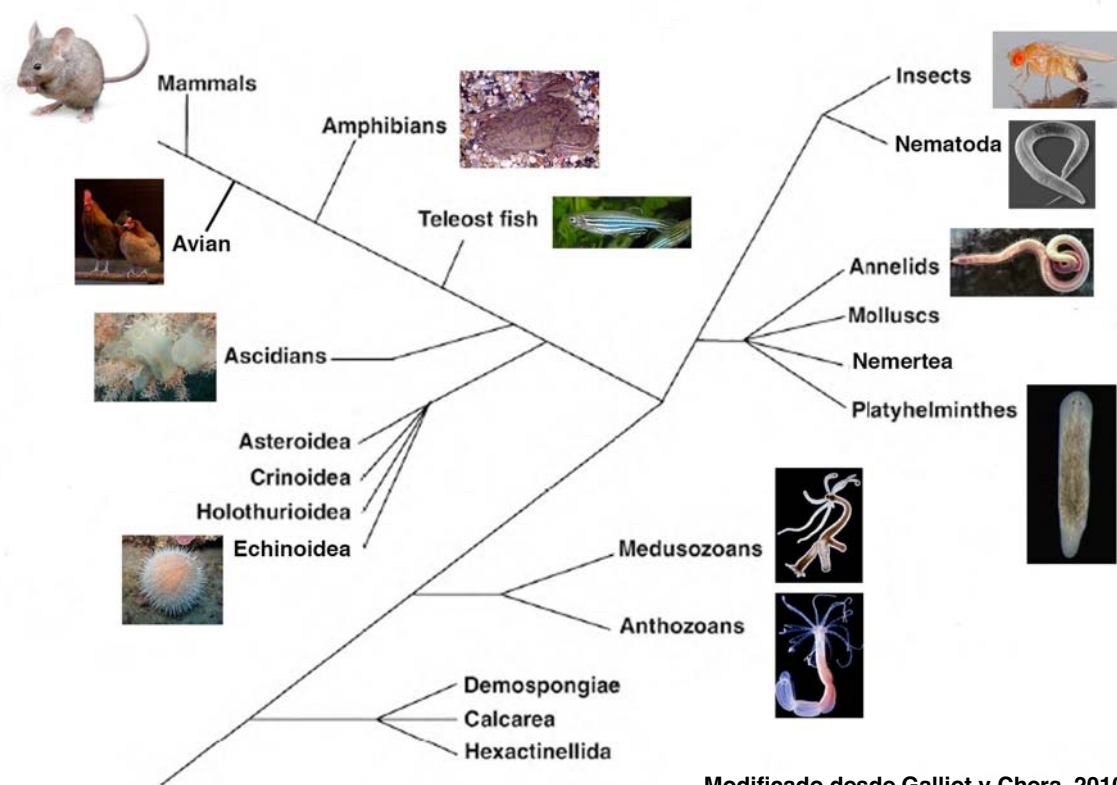


Figura 1: Árbol filogenético mostrando imágenes de especies con capacidad regenerativa en todos los grandes clados de Metazoa. Modificado desde Galliot y Chera, 2010.

Sin embargo, aunque la comparación de la respuesta regenerativa resulta subjetiva y problemática, el alcance de ésta varía considerablemente entre especies. Mientras la planaria y la Hydra son capaces de regenerar un nuevo organismo a partir de cualquier fragmento de su cuerpo, la mayor parte de los anélidos, moluscos y cordados son sólo capaces de regenerar específicamente alguna estructura de su cuerpo, ya sea la cola, extremidades u otros apéndices. La regeneración de la planaria es especialmente destacable ya que, por ejemplo, es el único organismo capaz de regenerar completamente *de novo* un sistema nervioso central complejo recuperando su funcionalidad y proporción (Cebrià, 2007).

1.1. La planaria *Schmidtea mediterranea*

Las planarias son platelmintos, miembros del superphylum de los lophotrochozoa (Figura 1). Son gusanos bilateralmente simétricos y le deben su nombre a que son dorsoventralmente planos. La especie *Schmidtea mediterranea* se encuentra en ríos y lagos de agua dulce europeos, pero existen otras especies de planarias de hábitats marinos y terrestres.

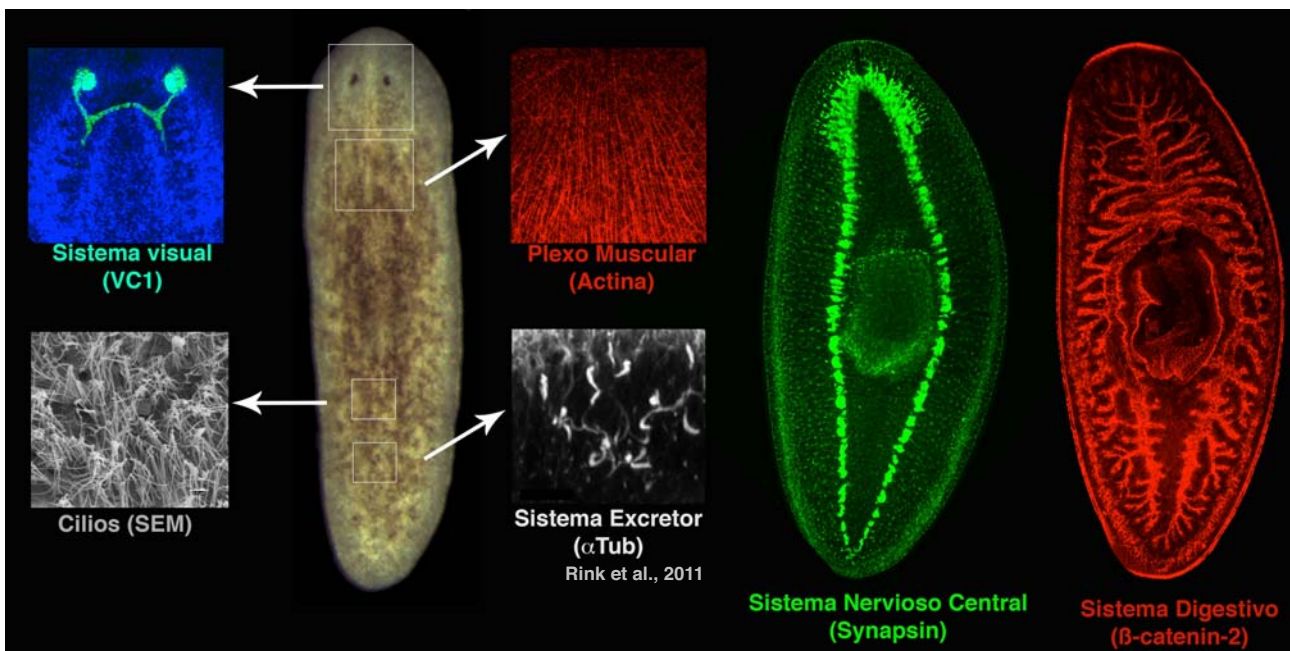


Figura 2: Anatomía de la planaria *Schmidtea mediterranea*. Se representan los sistemas de órganos más importantes de la planaria marcados por inmunohistoquímica con distintos anticuerpos o por microscopía de barrido (SEM, "Scanning Electron Micorscopy") en el caso de los cilios. Aunque sólo se muestra una ampliación de zonas específicas del sistema ciliar, del plexo muscular y del sistema excretor, estos están presentes en toda la superficie del animal.

Las planarias son animales acelomados y poseen derivados de las tres capas germinales. Poseen un sistema nervioso ventral que consiste en un cerebro bilobulado conectado a dos cordones nerviosos longitudinales, que a su vez, están interconectados por otros cordones transversales (Cebrià et al., 2002a) (Figura 2). Dos fotorreceptores proyectan entre sí y hacia el cerebro formando el quiasma óptico (Okamoto et al., 2005) (Figura 2). Su sistema digestivo es ciego y consiste en una rama anterior y dos posteriores que conectan con la faringe, un órgano enervado y muscularmente extensible que utilizan tanto para la ingesta como para el desecho de alimentos (Saló, 2006) (Figura 2).

También poseen una musculatura subepitelial con cuatro capas de fibras musculares longitudinales, diagonales y circulares (Cebrià et al., 1997) (Figura 2) así como un plexo nervioso submuscular que conecta con los cordones nerviosos (Hyman, 1951). El sistema excretor de planarias consiste en un conjunto de protonefridios distribuidos ampliamente a lo largo de todo el animal (McKanna, 1968). El espacio mesenquimático entre los diferentes órganos se conoce como parénquima (Hyman, 1951). Para su locomoción, las planarias poseen un epitelio ventral multiciliado que emplean junto con la contracción muscular para deslizarse sobre la superficie (Reddien et al., 2005a) (Figura 2).

Finalmente, aunque la regeneración se analiza en la cepa asexuada de *S. mediterranea*, que se divide por fisión transversal de la cola, existe también una cepa sexuada hermafrodita que puede reproducirse por fisión o fertilización cruzada (Hyman, 1951).

La secuenciación del genoma de *S. mediterranea* (Sánchez Alvarado et al., 2002) junto con la disponibilidad de secuencias transcriptómicas (Abril et al., 2010; Blythe et al., 2010; Resch et al., 2012) y la incorporación de métodos celulares y moleculares ha revolucionado el estudio de la regeneración en planarias. Entre estos métodos se pueden destacar la detección de expresión génica por hibridación *in situ* (Pearson et al., 2009; Umesono et al., 1999), la detección de proteínas por inmunohistoquímica gracias a una cantidad cada vez mayor de anticuerpos disponibles, el uso de citometría de flujo (Hayashi et al., 2006; Moritz et al., 2012), la detección de muerte celular (González-Estévez et al., 2007; Pellettieri et al., 2009), diferentes métodos de análisis de la proliferación (BrdU, pH3) y diferenciación de las células madre (linajes celulares) (Lapan y Reddien, 2011; Lapan y Reddien, 2012; Newmark y Sánchez Alvarado, 2000; Scimone et al., 2011) y sobretodo, la posibilidad de realizar análisis funcionales gracias a la inhibición de la expresión génica a través de la técnica de interferencia con dsRNA (RNAi) (Sánchez Alvarado y Newmark, 1999). Una ronda de interferencia suele constar de 3 días

consecutivos de inyección del RNAi seguidos de una amputación al día siguiente (Pineda et al., 2000). Si la perdurabilidad de la proteína es muy alta, se pueden realizar rondas adicionales. Así mismo, para estudiar el recambio tisular homeostático y no la regeneración, los tratamientos suelen ser más prolongados en el tiempo (Figura 3).

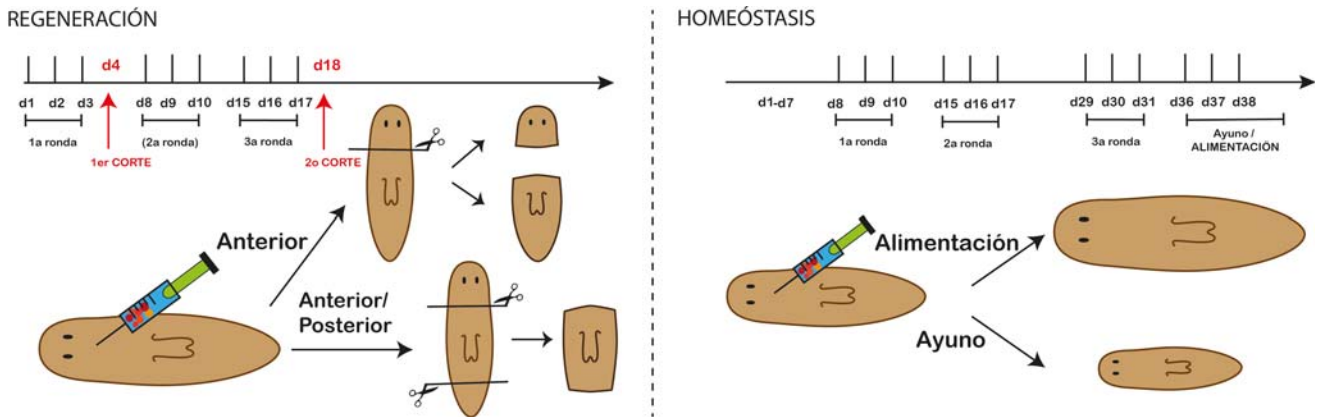


Figura 3: Esquema del diseño experimental de la interferencia de la expresión por dsRNA (RNAi) Se muestran los diseños durante la regeneración tras la amputación y durante el crecimiento y decrecimiento homeostático tras la alimentación o el ayuno.

1.2. Los neoblastos, las células madre de planaria

La regeneración en planarias tiene lugar a través de la inducción de la proliferación celular para formar una masa de tejido epitelio-mesenquimático, conocido como blastema, donde se diferenciarán todos los tejidos perdidos tras la amputación. Las planarias deben su robusta capacidad regenerativa a la presencia de células madre pluripotentes con capacidad mitótica, los neoblastos. Estos neoblastos están localizados en el tejido parenquimático a lo largo de todo su cuerpo exceptuando la región anterior por delante de los fotorreceptores y la faringe, así como entre las ramas del sistema digestivo (Forsthoefel et al., 2011; Newmark y Sánchez Alvarado, 2000) (Figura 4). Son una población de células de pequeño diámetro con un gran ratio núcleo/citoplasma que representan entre un 25-30% del número total de células de la planaria y se caracterizan por la presencia de unas estructuras electrodensas denominadas cuerpos cromatoides ("cromatoid bodies" o CB) (Baguña et al., 1989) (Figura 4). El primero en utilizar el término neoblasto en planarias fue J. William Buchanan en 1933 (Buchanan, 1936; Stéphan-Dubois, 1965) para referirse a este tipo celular que se parecía al descrito y

nombrado así en un anélido por Harriet Randolph ya en 1891 (Randolph, 1891; 1892). Desde entonces, la biología e implicación de los neoblastos durante la regeneración ha sido objeto de estudio hasta el día de hoy (Baguña, 2012)

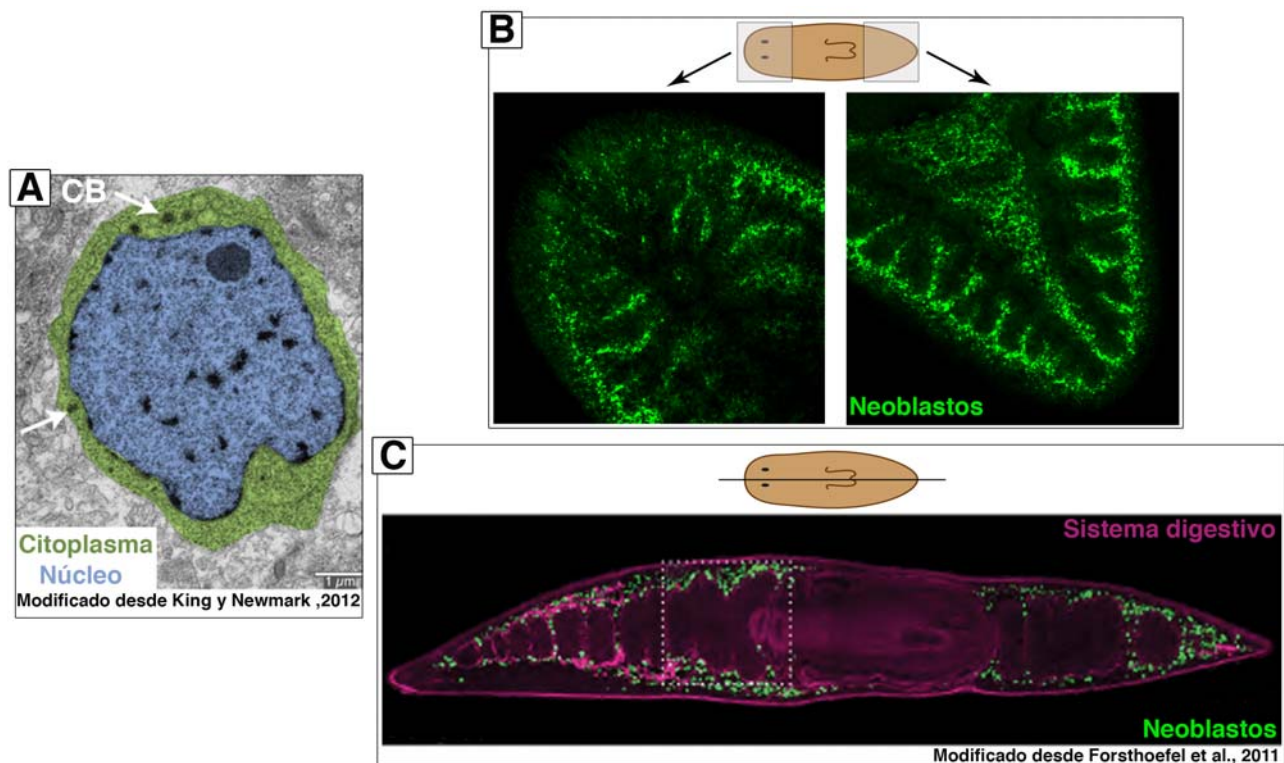


Figura 4: Los neoblastos, las células madre de planaria. (A) Imagen de microscopía electrónica de un neoblasto (King y Newmark, 2012). (B y C) Imágenes mostrando la localización de los neoblastos en la planaria a través de la FISH de *piwi1*, un marcador de neoblastos, en regiones anterior y posterior (B) y a través de la detección de BrdU en un corte longitudinal de la planaria (C) (Forsthoefel et al., 2011).

Las primeras evidencias de que la proliferación de los neoblastos es necesaria para la formación del blastema provienen de experimentos de irradiación en los que se observó que ésta causaba la muerte de los neoblastos y prevenía la regeneración (Bardeen y Baetjer, 1904; Dubois y Wolff, 1947). La irradiación se emplea para eliminar las células con capacidad proliferativa, ya que genera daño en el ADN y las células no superan la transición G1/S, siendo eliminadas por la maquinaria apoptótica.

Experimentos posteriores han demostrado que esta población de neoblastos con capacidad proliferativa es la fuente principal de la regeneración de nuevos tejidos en planarias. Por ejemplo, transplantar un fragmento de un donador dentro de una planaria huésped irradiada rescata la respuesta regenerativa del huésped (Lender, 1965; Wolff, 1961), así como la rescata la incorporación de una población de células morfológicamente parecidas a los neoblastos en el huésped irradiado (Baguña et al., 1989). Finalmente, experimentos de marcaje con BrdU identifican que las células que incorporan este

análogo del DNA tienen una morfología típica de neoblastos y que estas son las primeras en contribuir a la formación del blastema (Newmark y Sánchez Alvarado, 2000). Sin embargo, aunque los neoblastos son la fuente principal de la capacidad regenerativa, se desconoce si células diferenciadas están a su vez contribuyendo. De hecho, algunos datos de experimentos basados en observaciones histológicas y microscopía electrónica sugieren que ocurren procesos de dediferenciación o transdiferenciación en planarias (Coward, 1969; Gremigni y Miceli, 1980; Hay y Ball, 1979; Woodruff y Burnett 1965). Sin embargo, el trabajo de Baguñà y colaboradores sugiere que las células diferenciadas no participan en el proceso de regeneración, ya que la capacidad regenerativa de planarias irradiadas sólo se recupera cuando se les inyecta una solución de células que está enriquecida en neoblastos. También observan que las células del organismo huésped irradiado de la cepa asexual adquieren el cariotipo típico de las células del donador de la cepa sexual (Baguñà et al., 1989). Por otro lado, lo que sí sabemos que ocurre es que durante las primeras horas tras la amputación se produce una reprogramación generalizada de la identidad celular del tejido preexistente independiente de la proliferación de los neoblastos (Gurley et al., 2010; Petersen y Reddien, 2009a). Si este proceso puede entenderse como transdeterminación, transdiferenciación o ninguno de ellos, pasa a ser más bien un problema semántico sobre qué entendemos por célula determinada o diferenciada.

Recientemente, el trabajo de Wagner y colaboradores ha demostrado que al menos un subgrupo de neoblastos (clonogenic neoblasts o cNeoblasts) son pluripotentes y tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares de planaria (Wagner et al., 2011). En este trabajo consiguen implantar un solo neoblasto aislado en una planaria huésped previamente irradiada. La capacidad proliferativa y pluripotente de un solo neoblasto es capaz de reemplazar todas las células y restaurar la capacidad regenerativa del organismo huésped previamente irradiado a dosis letales. Sin embargo, no defienden la naturaleza totipotente de estos cNeoblasts, ya que cuando se inyecta en un huésped de la cepa sexual, los órganos sexuales no se recuperan y estas planarias pasan a reproducirse asexualmente por fisión (Wagner et al., 2011). Este hecho tiene dos explicaciones alternativas: i) estos cNeoblasts no son capaces de diferenciarse hacia tipos celulares sexuales ya que provienen de un donador asexual, o ii) que como es sabido, en situaciones de estrés o falta de alimento, las planarias sexuales deciden sacrificar en primer lugar sus órganos sexuales (Hoshi et al., 2003).

En definitiva, la capacidad de proliferación es la principal fuente de la capacidad regenerativa de las planarias. Pero a parte de dividirse y dar lugar a más de ellas, estas células pluripotentes deben ser capaces de dar lugar a una progenie celular con capacidad de diferenciarse a todos los tipos celulares que faltan, así como de interpretar las señales de identidad e información posicional que aseguren la integración funcional del tejido regenerado con los preexistentes. En este apartado de la introducción, sin embargo, me voy a centrar en resumir la información que poseemos sobre las vías moleculares encargadas de mantener la pluripotencia y permitir su diferenciación. Las vías genéticas encargadas de aportar información posicional a los neoblastos se encuentran en el apartado de “Información posicional”.

La identificación de los genes responsables de la biología de los neoblastos se ha llevado a cabo principalmente a partir de estudios comparativos entre animales irradiados versus no irradiados, y el establecimiento de la secuenciación a gran escala (“next generation sequencing o NGS”) ha sido clave para la obtención de una amplia lista de genes “downregulados” en animales irradiados, muchos de ellos esenciales para la biología de los neoblastos (Blythe et al., 2010; Eisenhoffer et al., 2008; Friedländer et al., 2009; Galloni, 2012; Labbé et al., 2012; Onal et al., 2012; Reddien et al., 2005a; Rouhana et al., 2010; Salvetti et al., 2000; Shibata et al., 2010; Shibata et al., 1999; Solana et al., 2012; Wagner et al., 2012). Voy a intentar agrupar estos genes en dos grupos principales: a) Genes necesarios para mantener la pluripotencia de los neoblastos y b) Genes necesarios para su salida del estado proliferativo y diferenciación hacia linajes celulares específicos (Figura 5).

1.2.1. Genes necesarios para el mantenimiento de los neoblastos

La identificación de este tipo de genes requiere que se cumplan todas o al menos una de estas premisas: i) que tengan un patrón de expresión relacionado con la posición de los neoblastos, es decir, en el parénquima y alrededor de las ramas del digestivo, ii) que su expresión desaparezca en estas zonas a las 24 horas tras la irradiación y iii) que tras la interferencia de su función por RNAi se reproduzca a nivel fenotípico lo que ocurre tras someter las planarias a dosis letales de irradiación; es decir, incapacidad de regenerar tras la amputación, regresión anterior, curvatura de los laterales ventrales (ventral curling) y, a veces, daños epiteliales.

- El primer grupo de genes en esta categoría son los que guardan una relación con los cuerpos cromatoides (CBs) de los neoblastos. Estos CBs son unas estructuras perinucleares electro-densas, morfológicamente similares a los gránulos de la línea germinal de muchos organismos. También se ha propuesto que existe conservación funcional entre ambas estructuras, ya que muchos de los homólogos de los genes de los CBs en planaria tienen una función importante en la línea germinal de otros organismos (Rink, 2012; Shibata et al., 2010; Solana et al., 2012; Wagner et al., 2012; Wang et al., 2010). Los primeros genes en identificarse fueron los tres parálogos *piwi-1*, *-2* y *-3*, de la familia de los piwi/Argonaute. Todos se expresan en neoblastos y el RNAi de *piwi-2* y *-3* fenocopia los efectos de la eliminación de los neoblastos por irradiación (Reddien et al., 2005b). Estas proteínas piwi tienen una función conservada en el silenciamiento de transposones a través de piRNA (piwi-associated small RNAs) (Thomson y Lin, 2009). Aunque no hay evidencias de que esta sea su función en planarias, recientemente se ha identificado el ortólogo de PRMT5 en planarias, una metiltransferasa de componentes de los CBs, entre ellos *piwi-3*. El RNAi de *PRMT5* inhibe la capacidad regenerativa ya que resulta en la reducción de los neoblastos y CBs, así como en un incremento de los niveles de transcritos de transposones y piRNAs. Por lo tanto, este trabajo sugiere que la familia piwi está implicada en el mantenimiento de los neoblastos a través del silenciamiento de transposones (Rouhana et al., 2012). Otros genes relacionados con los CBs y el mantenimiento de los neoblastos son los ortólogos de *TUDOR* (Solana et al., 2009), y de proteínas de unión al ARN, como *SmB* (Fernández-Taboada et al., 2010) y *vasa-1* (Wagner et al., 2012). El RNAi de estos genes resulta en la pérdida de los neoblastos y de la capacidad regenerativa. Este grupo de genes descritos anteriormente forman parte de un red génica con una función evolutivamente conservada en el ensamblaje de complejos ribonucleoproteicos, como son los gránulos de las células de la línea germinal o los CBs de los neoblastos (Rink, 2012). Otras proteínas de unión al ARN, como el homólogo de *bruno* (Guo et al., 2006) y *pumilio* (Salveti, 2005) también son necesarios para el mantenimiento de los neoblastos.
- Otro grupo importante de genes relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia en otros organismos han sido recientemente descritos en planarias por Wagner y colaboradores (Wagner et al., 2012). Primero identifican *soxP1*, que es requerido para la pluripotencia de los neoblastos y aunque no se puede encuadrar dentro de ninguna

subfamilia de genes Sox conocida, contiene un dominio transcripcional Sox. La importancia de relacionar un Sox con el mantenimiento de los neoblastos, radica en que forma parte del conocido "cocktail Yamanaka", formado por Sox2, Oct4 (factor de transcripción que contienen un dominio POU), KLF4 y cMyc, descrito en células IPS como necesarios y suficientes para mantener su pluripotencia (Takahashi y Yamanaka, 2006). En este trabajo también identifican tres genes de planarias similares a componentes del "Polycomb Repressive Complex 2 o PCR2", *Ezh*, *Sz12-1* y *Eed-1* que se expresan en neoblastos y son necesarios para el mantenimiento de su actividad proliferativa.

- Por último, el mantenimiento y la proliferación de los neoblastos depende de *inexin-11*, una proteína estructural del canal de comunicación intracelular o "gap-junction". *inx-11* se expresa en los neoblastos y su RNAi inhibe la proliferación de éstos y en consecuencia la regeneración (Oviedo y Levin, 2007).

1.2.2. Genes necesarios para la diferenciación de los neoblastos

Eisenhoffer y colaboradores aportan por primera vez datos sobre el control de la diferenciación de la progenie de los neoblastos (Eisenhoffer et al., 2008). En este trabajo describen dos categorías de genes expresados secuencialmente en el espacio y en el tiempo en la progenie postmitótica de los neoblastos. Denominan estos grupos de genes como de categoría 2 o progenie temprana ("early progeny") y de categoría 3 o progenie tardía ("late progeny"), basándose en la cinética de desaparición de estos genes tras la irradiación y de la incorporación de BrdU. Es decir, la expresión de los genes de neoblastos (categoría 1 en este trabajo) desaparece 1 día después de la irradiación y las células que lo expresan, los neoblastos, incorporan el BrdU 8 horas después del pulso. Los genes de categoría 2 y 3, desaparecen 2 y 4 días respectivamente tras la irradiación y las células que los expresan, progenie temprana y tardía, incorporan BrdU también 2 y 4 días tras el pulso (Eisenhoffer et al., 2008). Sin embargo, aún se desconoce la identidad de las células que expresan estos genes debido a la falta de datos sobre su implicación funcional. Especialmente, desconocemos si la expresión de estos genes determina una transición común en la diferenciación de los neoblastos o si por el contrario cada uno de

ellos determina la especificación hacia un linaje determinado (Currie y Pearson, 2013; Scimone et al., 2010).

En los últimos años se han identificado muchos genes necesarios para la diferenciación de los neoblastos:

- Dos componentes del complejo polycomb remodelador de la cromatina (polycomb chromatin remodeling complex), homólogos de los genes *CDH-4* y *RbAp48*, son necesarios para que la regeneración tenga lugar. *CDH-4* es necesario para la expresión de los genes de categoría 3 y por lo tanto para la transición a progenie tardía (Scimone et al., 2010). Así mismo, aunque no hay datos sobre la expresión de estos marcadores de categorías en la especie *Dugesia japonica*, *RbAp48* parece ser necesario para la diferenciación de los neoblastos ya que el RNAi de ese gen inhibe la regeneración de nuevos tejidos aún cuando la respuesta mitótica de los neoblastos no está severamente afectada (Bonuccelli et al., 2010).
- También se han identificado dos genes necesarios para la salida de los neoblastos de su estado proliferativo: los homólogos de *p53* y de *ERK*. La expresión de genes de categoría 2 y la consecuente transición de los neoblastos a su estado postmitótico temprano requiere la acción de *p53*, que a su vez es crucial para el mantenimiento a largo plazo de los neoblastos (Pearson y Alvarado, 2010). *ERK-A*, de manera similar, es necesario para que los neoblastos dejen de expresar marcadores de pluripotencia como *piwi* o *histone-2b* (Tasaki et al., 2011a). El RNAi de ambos genes lleva a la aparición ectópica de células proliferativas en el blastema (Pearson y Alvarado, 2010; Tasaki et al., 2011a).
- Fraguas y colaboradores también describen uno de los parálogos de planaria del receptor de EGF, *egfr-3*, como necesario para el crecimiento del blastema y la regeneración de estructuras dentro de este (Fraguas et al., 2011). El RNAi de *egfr-3* no inhibe la respuesta proliferativa de los neoblastos ni la acumulación de células que expresan genes de categoría 2 y 3. Esto lleva a los autores a sugerir que *Egfr-3* está implicado exclusivamente en la diferenciación de linajes celulares nerviosos y que es la falta de un sistema nervioso la que impide el crecimiento y la regeneración del blastema (Fraguas et al., 2011).
- La identificación de genes específicamente requeridos para la diferenciación de un linaje celular en particular está progresando mucho actualmente. El primer gen descrito necesario para la especificación de un linaje celular en particular fue *nanos*, expresado

en las células madre de la línea germinal y esencial para la regeneración y mantenimiento de esta línea germinal (Handberg-Thorsager y Saló, 2007; Sato et al., 2006; Wang et al., 2007). Recientemente, Lapan y Reddien han descrito la red génica necesaria durante el proceso de diferenciación de un neoblasto hacia los distintos tipos celulares del ojo de la planaria (Lapan y Reddien, 2011; Lapan y Reddien, 2012). Un neoblasto pasa a determinar el linaje progenitor que dará lugar a las células del ojo al expresar *six-1/2*, *eya* y *ovo*. Más tarde, la expresión adicional de *otxA* especificará el linaje de células fotorreceptoras y la de *sp6-9* junto con *dlx* especificará el de células pigmentarias del ojo. Todos estos genes coexpresan al principio con el marcador de neoblastos *h2b* y su RNAi resulta en la incapacidad de regenerar el linaje celular que especifican (Lapan y Reddien, 2011; Lapan y Reddien, 2012; Mannini et al., 2004; Pineda et al., 2000). También se ha descrito un conjunto de genes necesarios para la especificación del linaje celular de los protonefridios. Estos genes se expresan al principio en células que aún conservan la proteína PIWI-1 (marca del inicio de la diferenciación de los neoblastos) y son *POU2/3*, *Sall*, *Osr*, *eya* y *six1/2-2*, estos dos últimos compartidos con la red génica que especifica el linaje celular del ojo (Scimone et al., 2011). Wenemoser y colaboradores también describen un gen, *runt-1* que se expresa en los neoblastos en respuesta a una herida y es necesario para la especificación de tejidos neurales y visuales (Wenemoser et al., 2012). Finalmente, la especificación del linaje de neuronas serotoninérgicas requiere la expresión del factor de transcripción *pitx* (Currie y Pearson, 2013; März et al., 2013).

En definitiva, el estudio de la regeneración en planarias está contribuyendo a entender la biología celular de las células madre (Aboobaker, 2011; Baguña, 2012; Reddien, 2013; Rink, 2012). Aún así, muchas preguntas importantes siguen sin resolver. Por ejemplo, se ha demostrado la pluripotencia de algunos neoblastos, los cNeoblasts (Wagner et al., 2011), pero ¿son todos los neoblastos pluripotentes?. El bajo porcentaje de éxito en la recuperación de la respuesta regenerativa de un animal irradiado al inyectar un sólo neoblasto (resulta ser de alrededor de un 1%) (Wagner et al., 2011), podría interpretarse como limitaciones de la técnica o como que sólo un bajo porcentaje de los neoblastos son realmente pluripotentes o cNeoblasts. Si asumimos que sólo existe una subpoblación de neoblastos pluripotentes, ¿dónde se localizan? y ¿habría alguna relación con aquellos neoblastos que son más resistentes a la irradiación? (Reddien, 2013; Rink, 2012; Salvetti

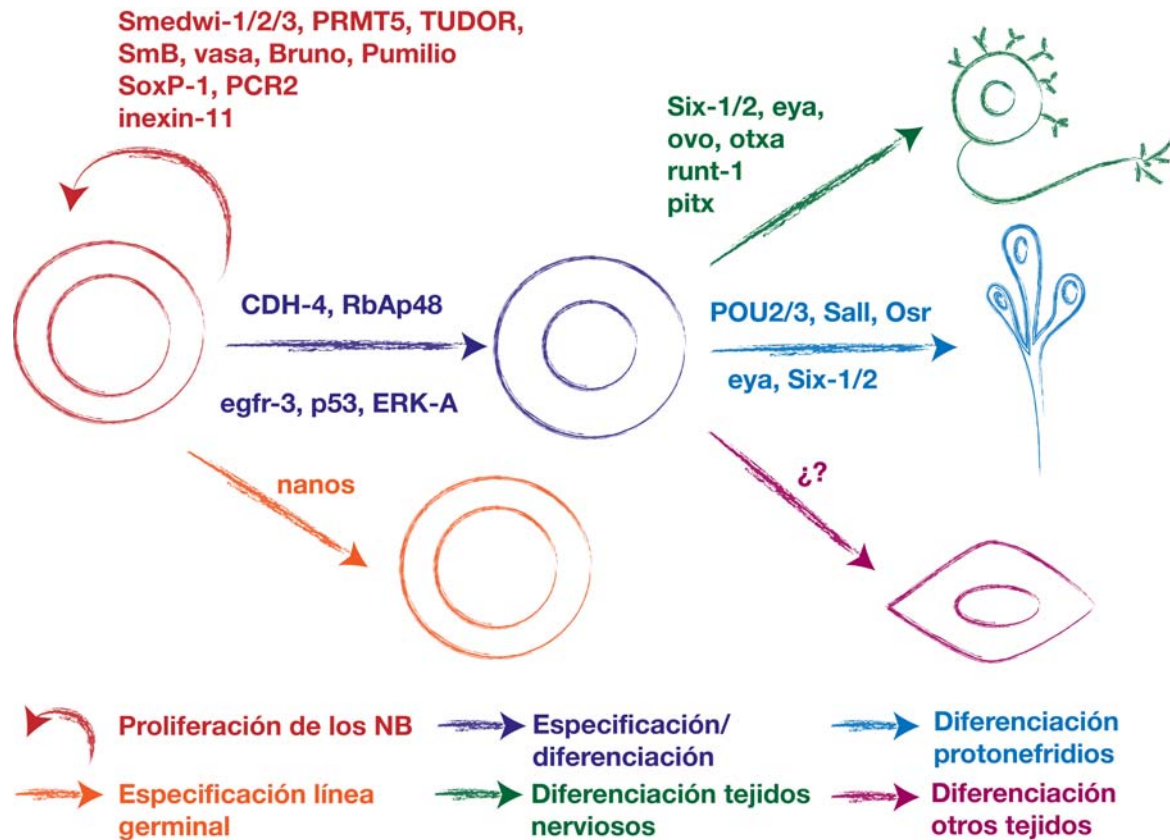


Figura 5: Esquema de los genes involucrados en los distintos aspectos de la biología del neoblasto.

et al., 2009). Otra cuestión de la que no se sabe nada es sobre la regulación de las divisiones de los neoblastos o los mecanismos moleculares encargados de la decisión entre amplificación vs. diferenciación de éstos. El desarrollo de la transgénesis así como de marcadores de la maquinaria de división celular que permitan un análisis a nivel celular son claves para responder estas preguntas.

Otra pregunta relacionada que Reddien comienza a plantear es si los neoblastos dan lugar a células postmitóticas multipotentes que se diferenciarán específicamente dependiendo de las señales que reciban de su contexto posicional (“naïve neoblast model”) o si estos neoblastos abandonan su estado proliferativo ya determinados a formar un linaje celular en particular (“specialized neoblast model”) (Reddien, 2013). Datos recientes apuntan a que el segundo escenario es el más plausible. Por ejemplo, todos los ejemplos de genes expresados para determinar un linaje específico expuestos en el apartado anterior, apoyan este modelo del “specialized neoblast”, ya que subpoblaciones de neoblastos coexpresan genes de pluripotencia (*piwi-1* y *h2b*) junto con genes que van a determinar el tipo celular al que van a diferenciarse. Es importante destacar que en el

caso del linaje progenitor de ojo, se observan células progenitoras cercanas al ojo en un animal intacto, lo cual indica que también hay neoblastos especializados para dar lugar a ese tipo celular durante el recambio tisular de una planaria adulta (Lapan y Reddien, 2012). La heterogeneidad de los neoblastos ha sido sugerida y defendida en trabajos anteriores, ya que al aislar células mitóticas (neoblastos o células X1) por FACs se observa que poseen distintos perfiles de expresión génica (Baguña, 2012; Hayashi et al., 2010; Moritz et al., 2012; Shibata et al., 2012). Dentro de este modelo, sin embargo, quedan algunas preguntas por resolver; como por ejemplo si los cNeoblasts dan lugar a neoblastos potencialmente más restringidos o si por el contrario, los cNeoblasts son una subpoblación independiente que permanece en un estado más quiescente. Por último, creo que es importante apuntar que este modelo del “specialized neoblast” no le resta importancia a la información que aporta el contexto posicional dónde debe producirse la diferenciación específica de los neoblastos.

2. Procesos regenerativos en planarias

En este apartado recopilaré todos los datos con los que contamos sobre la regeneración de la planaria, presentándolos en un orden temporal relativo, ya que todos los procesos que comprenden la respuesta regenerativa temprana ocurren de manera simultánea durante las primeras horas de regeneración. Así mismo, intentaré resaltar aquellos aspectos más enigmáticos y discutir posibles escenarios e hipótesis.

2.1. Cicatrización de la herida o “wound healing”

La herida o daño de un tejido es el estímulo responsable de la respuesta regenerativa (Needham, 1952). Sin embargo, todos los animales somos capaces de cerrar y curar una herida, cuando sólo algunos, como la planaria, lo son de acompañar esta cicatrización con el desencadenamiento de una serie de procesos esenciales para la correcta regeneración de la estructura dañada o amputada. Pero ¿qué es lo que desencadena esta respuesta? aunque existen algunas evidencias provenientes de la literatura “pre-genética”, ésta es la mayor incógnita que aún existe en el campo de la regeneración.

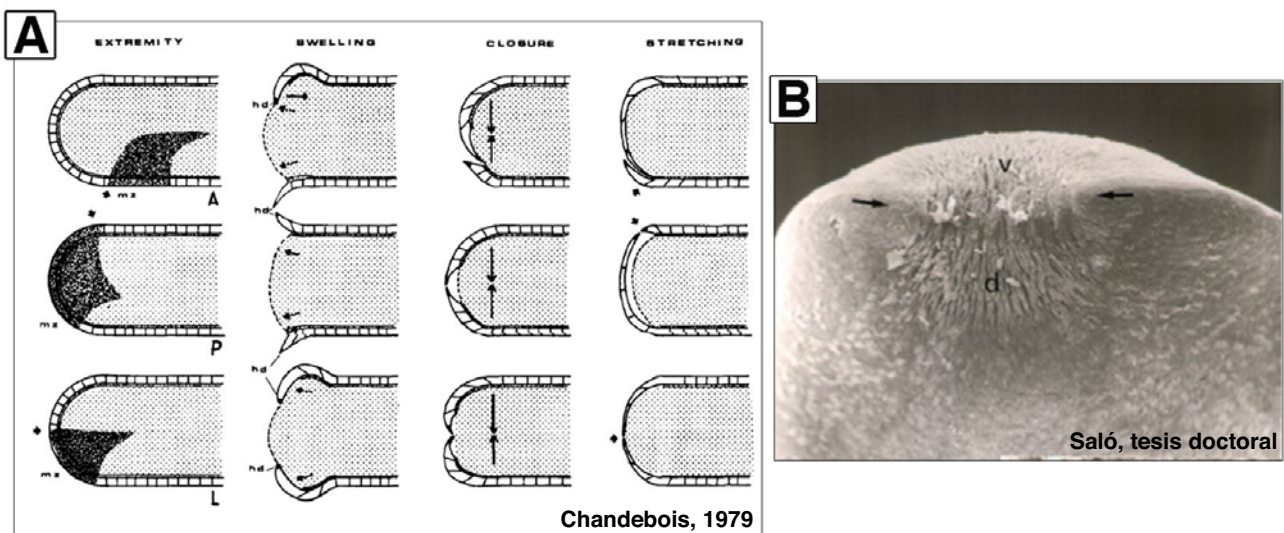


Figura 6: Cicatrización de la herida en planaria. (A) Esquema de la secuencia temporal del cierre de la herida tras distintos tipos de amputaciones (Chandebois, 1979) (B) Imagen de microscopía de barrido o SEM que muestra la cicatrización por contacto de los epitelios dorsal y ventral 6 horas tras la amputación (Emili Saló, tesis doctoral). d, dorsal; v, ventral.

El cierre de la herida tras la amputación en planarias tiene lugar en segundos gracias a una fuerte contracción muscular, que minimiza la superficie y tiempo de contacto de la región dañada con el exterior (Chandebois, 1979; Chandebois, 1980) (Figura 6A). A su vez, la secreción de mucosidad por parte de los rhabdómeros, genera una superficie mucosa protectora (Smales y Blankespoor, 1978). La exposición de planarias amputadas a una solución de $MgCl$ que inhibe la contracción muscular, impide el cierre de la herida y la respuesta regenerativa no tiene lugar (Schürmann y Peter, 1998).

Tras la contracción muscular, aproximadamente 30 minutos tras la amputación, los epitelios dorsal y ventral se extienden para recubrir la herida sin necesidad de proliferación celular (Baguñà et al., 1994; Chandebois, 1979; Chandebois, 1980) (Figura 6A). El tratamiento con cytochalasin B, que afecta a la conformación de los filamentos de actina y por lo tanto a la movilidad celular, impide el recubrimiento epitelial de la herida, que parece tener lugar por migración de células epiteliales (Pascolini et al., 1984). Esta interacción de los epitelios dorso-ventral (DV) se ha propuesto como el desencadenante de la regeneración (Chandebois, 1979; Chandebois, 1980; Chandebois, 1985a; Chandebois, 1985b; Kato et al., 1999; Schilt, 1970), también basándose en los resultados de los experimentos de trasplantes; el trasplante de un fragmento de una planaria donadora generará la regeneración de dos ejes/planarias diferentes, una hacia dorsal y

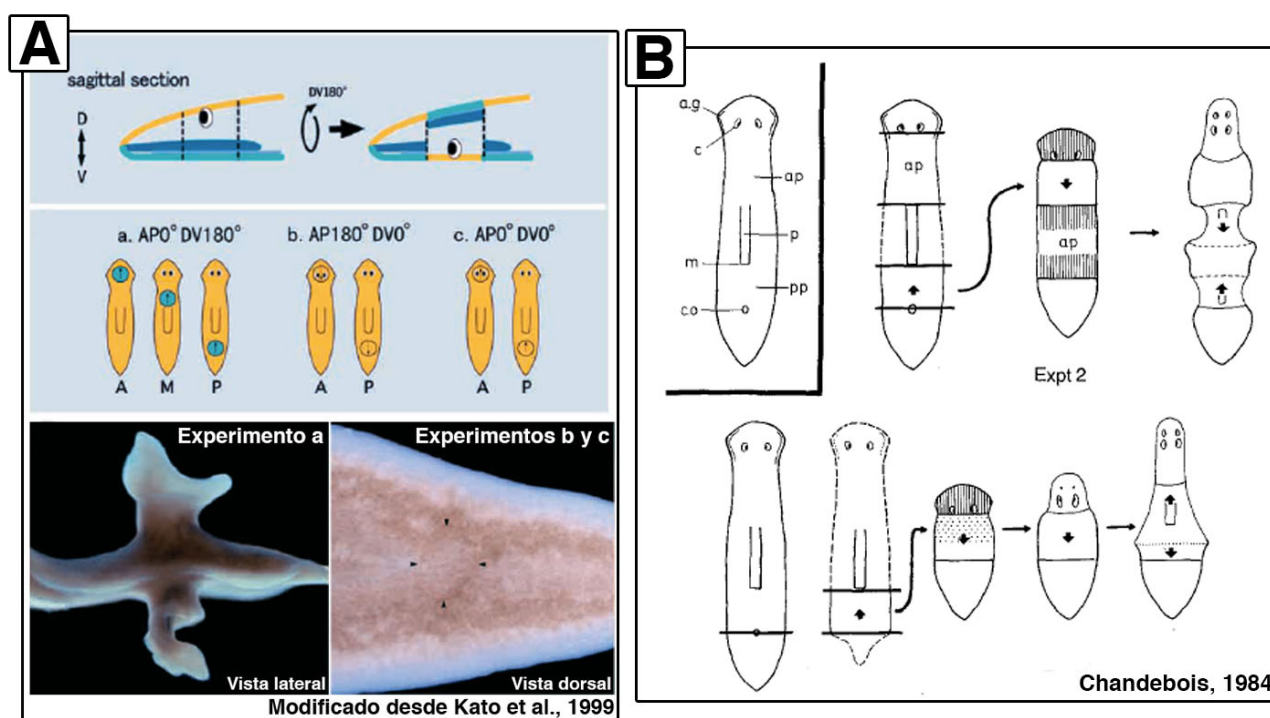


Figura 7: Esquema representativo de los experimentos de trasplantes en planaria. (A) Los trasplantes con inversión DV del fragmento donador generan nuevas confrontaciones DV que se traducen en la formación de nuevos ejes AP (Kato et al., 1999). **(B)** Los trasplantes de fragmentos con distinta identidad AP inducen la regeneración intercalar entre ellos (Chandebois, 1984).

otra hacia ventral, si previamente se gira en sí mismo dorsoventralmente (Kato et al., 1999; Schilt, 1970) (Figura 7A). Es decir, que el hecho de generar dos confrontaciones DV debido a la inversión DV del fragmento donador induce la regeneración de dos nuevos ejes. Así mismo, otros experimentos de trasplantes en los que no existe una confrontación DV también desencadenan la regeneración; por ejemplo, cuando dos fragmentos anterior y posterior son puestos en contacto, se produce regeneración intercalar entre ellos; es decir, que los tejidos intermedios que faltan entre los fragmentos anterior y posterior van a ser regenerados (Agata et al., 2003; Chandebois, 1984) (Figura 7B). Sin embargo, si los dos fragmentos puestos en contacto poseen la misma posición en el eje Antero-Posterior (AP), la regeneración no tiene lugar (Chandebois, 1984; Chandebois, 1985b; Saló y Baguñà, 1985). Por lo tanto, para que la respuesta regenerativa se induzca, son necesarios uno de estos dos estímulos: (i) La interacción epitelial DV, que generará la formación de nuevos ejes AP o (ii) la confrontación de dos fragmentos con identidades posicionales diferentes en el eje AP, que promoverá la regeneración intercalar entre ambos. Aunque la respuesta regenerativa inducida no parece ser exactamente la misma (formación de un nuevo eje/regeneración intercalar), sería muy interesante investigar hasta qué punto los mecanismos moleculares responsables se comparten o no.

Aunque la participación del epitelio en iniciar la respuesta regenerativa está generalmente aceptada, cuáles son las señales genéticas responsables sigue siendo un misterio. Varios grupos han conseguido identificar un conjunto de genes que se activan en respuesta a la herida empleando análisis de expresión diferencial (Sandmann et al., 2011; Wenemoser et al., 2012). Wenemoser y colaboradores, describen tres clases de genes inducidos en tejidos diferenciados en respuesta a la herida: W1, W2 y W3, así como una cuarta clase, W4, que se expresa en neoblastos (Figura 8). Genes de la clase W1 se expresan a los 30 minutos tras la herida e incluyen homólogos de genes como *jun-1*, *fos-1* y *egr-1,4*, conocidos como “immediate early genes” (Figura 8A). Dentro del grupo W3, que se expresan más tarde, entre 6-12 horas tras la herida, se encuentran homólogos de remodeladores de la matriz extracelular, como *delta-1*, ligando de la vía Notch, y *plasminogen-1* (Figura 8A). Los genes de estos dos grupos se expresan independientemente de la traducción proteica, lo cual sirve para agruparlos como genes de respuesta inmediata, necesarios para responder rápidamente a numerosos estímulos a escala genómica (Abraham et al., 1991). Dentro del grupo de genes W2, expresados entre 3-12 horas tras la herida, se encuentran muchos homólogos de genes responsables

del establecimiento de la identidad como *wntless*, *wnt1*, *nlg1* o *follistatin* (Figura 8A). La expresión de estos genes de polaridad en cualquier tipo de herida es importante por que apoyan la hipótesis planteada por Petersen y Reddien en la que proponen que la herida desencadena una respuesta regenerativa independientemente de la identidad del tejido que se ha perdido y que las consecuencias de esa respuesta variarán dependiendo del contexto local del tejido en la que se produce (Petersen y Reddien, 2009a). Por último, dentro del grupo W4 se encuentran genes que se expresan en neoblastos, pero que serán requeridos para la diferenciación de nuevos tejidos, como *runt-1*, descrito como un factor necesario para la especificación del linaje celular nervioso. La identificación de genes como *runt-1*, expresado en neoblastos que ya han debido tomar alguna decisión con respecto a su identidad celular, en este caso identidad neural, es importante ya que llevan a postular que la herida promueve la especialización de los neoblastos hacia diferentes linajes celulares (Figura 8B y C). Por lo tanto, apoyaría el “specified neoblast model” en contra del “naive neoblast model” expuestos anteriormente, ya que sugiere que neoblastos especializados hacia un destino celular previo a la producción de su progenie serían los encargados de instruir la regeneración de tejidos específicos (Reddien, 2013; Wenemoser et al., 2012).

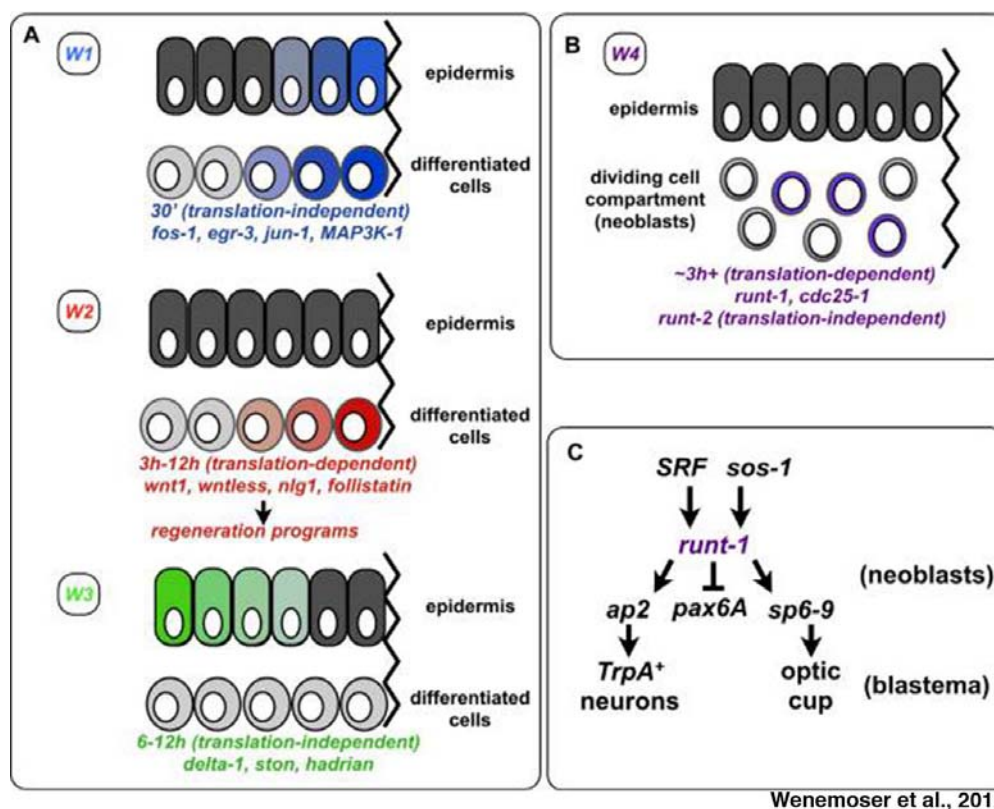


Figura 8: Esquema de los distintos grupos de genes expresados en respuesta a la herida. (A) Grupos de genes W1, W2 y W3 expresados en células diferenciadas. **(B)** Genes W4 expresados en neoblastos. **(C)** Cascada de señalización propuesta mostrando el papel de *runt-1* durante la especificación de linajes neurales (Wenemoser et al., 2012)

Finalmente, este trabajo plantea la existencia de un mecanismo evolutivamente conservado que incluye genes de respuesta rápida y cuya expresión es independiente de la traducción proteica. Sin embargo, la interferencia funcional de ninguno de estos genes resulta en la inhibición del “wound healing”. Con lo cual, la pregunta de qué genes o procesos génicos, si los hubiera, son los responsables de iniciar la respuesta regenerativa permanece sin respuesta. En esta línea, se ha descrito recientemente que la herida induce la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y que éstos actúan como un “master regulator” durante la regeneración del renacuajo de *Xenopus* (Love et al., 2013). La participación de estos radicales libres de oxígeno como una señal “upstream” a la regulación y activación de todas estas vías necesarias para producir la respuesta regenerativa parece muy lógica, ya que su producción es inmediata, masiva, independiente de la identidad del tejido donde se produce y con efectos biológicos muy pleiotrópicos.

2.2. Muerte celular programada

La regeneración se basa en el control exhaustivo y coordinación entre la proliferación y diferenciación de las células madre para generar nuevos tejidos y la muerte celular para moldear y proporcionar las estructuras. En planarias, la proliferación y la muerte celular por apoptosis permanecen activas a niveles basales para mantener el recambio celular de sus tejidos somáticos. A su vez, en respuesta al daño o amputación se disparan y muestran cinéticas temporal y espacialmente distinguibles.

2.2.1. Apoptosis

La apoptosis es el mecanismo de muerte celular programada más ampliamente estudiado en Metazoa. La regulación de la apoptosis es crítica durante el desarrollo, el recambio celular y la reparación o regeneración de tejidos, y su desregulación o inhibición potencia el desarrollo del cáncer (Fuchs y Steller, 2011). Un paso generalmente común en la ejecución de todo tipo de muerte celular es la activación de las caspasas, proteasas que responden a muchos tipos de estímulos de estrés celular, como daño del DNA, infecciones, hipoxia, pérdida de adhesión celular y daños en el citoesqueleto, entre

muchos otros (Kumar, 2006). La puesta a punto del ensayo de detección de muerte celular TUNEL (terminal de-oxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) por Pellettieri y colaboradores permitió demostrar que la apoptosis se activa en planarias durante el “wound healing” y la remodelación de tejidos en respuesta a la amputación y durante periodos prolongados de ayuno (Pellettieri et al., 2009). En respuesta a la amputación, se producen dos picos de activación de la apoptosis: el primero, 4 horas tras el corte y el segundo pico a los 3 días post-amputación (Figura 9). Mientras que el primer pico está restringido a la zona de la herida, el segundo pico ocurre a nivel sistémico y se asocia con un papel de la apoptosis en la remodelación de los tejidos, ya que este segundo pico apoptótico en regiones alejadas de la herida es más acentuado cuanto mayor es la cantidad de tejido amputado (Pellettieri et al., 2009). Al analizar estas respuestas apoptóticas tras la eliminación de los neoblastos por irradiación, comprobaron que ni la magnitud ni las cinéticas temporales y espaciales están afectadas. Por lo tanto, la apoptosis parece ocurrir en células diferenciadas y su desencadenamiento es independiente de la señalización por parte de los neoblastos (Pellettieri et al., 2009).

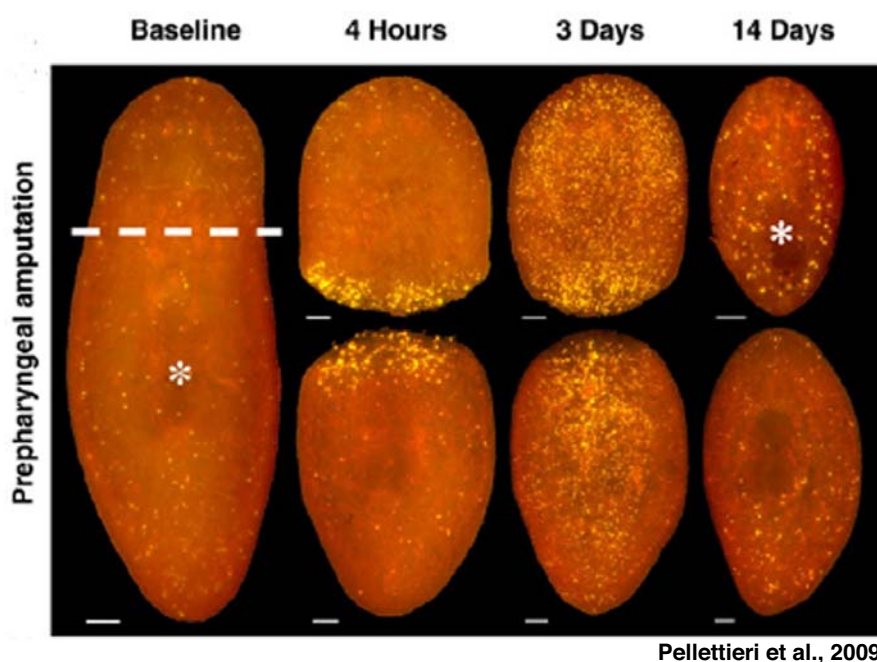


Figura 9: La apoptosis durante la regeneración de planarias. Visualización por TUNEL de la muerte celular por apoptosis. Los asteriscos señalan la posición de la faringe. La línea discontinua señala el plano de corte. Barras de escala, 100 μ M (Pellettieri et al., 2009)

Pellettieri et al., 2009

Junto con la formación de nuevas estructuras, la planaria debe reescalar y reubicar todos sus órganos para integrar los tejidos regenerados. Aunque estos procesos que ocurren en los tejidos preexistentes son críticos para generar un organismo proporcionado tras la amputación, es ahora cuando empiezan a ser estudiados en profundidad. Beane y colaboradores identifican por primera vez un sistema necesario exclusivamente para la

inducción de la apoptosis durante el “remodeling”. Al inhibir la función de H⁺,K⁺-ATPasa en el bombeo de iones por RNAi, se produce una hiperpolarización de la membrana (Beane et al., 2013). Tras la amputación anterior, esto se traduce en la formación de blastemas reducidos y en faringes desproporcionadamente grandes con respecto al tamaño final del animal. Al analizar la proliferación y la muerte celular por fosforilación de la Histona 3 (pH3) y de la caspasa 3, respectivamente, observan que lo único que se ve afectado es el segundo pico apoptótico que ocurre en todo el animal a 3 días post-amputación. Por lo tanto, concluyen que este incremento sistémico de la apoptosis es el responsable de remodelar y proporcionar las estructuras acorde con el tamaño final del animal, así como proponen que la apoptosis es la conexión entre las señales bioeléctricas y el establecimiento del tamaño de los órganos durante la regeneración (Beane et al., 2013).

2.2.2. Autofagia

La autofagia es un mecanismo evolutivamente conservado para mantener la homeóstasis tisular que se activa en respuesta a estímulos de estrés como mecanismo de protección celular o como mecanismo alternativo de muerte celular. Se basa en la formación de una doble vacuola, llamada autofagosoma, que dependiendo de la necesidad del organismo, puede i) mantenerse para proteger la célula y suprimir su muerte por apoptosis, ii) ser degradada por apoptosis fusionándose al compartimento lisosomal o iii) morir por muerte celular autofágica (Levine y Deretic, 2007). Este tipo de muerte celular se emplea como reciclaje de nutrientes para mantener procesos biológicos y se diferencia de la apoptosis en que mantiene la conformación del DNA nuclear hasta que el proceso está bastante avanzado. Aún así, generalmente comparte la maquinaria de la apoptosis (González-Estévez y Saló, 2010). En planarias, las primeras observaciones de autofagia y autólisis (muerte celular por autofagia) celular las hicieron Bowen y Rider en la especie *Polycelis tenuis* (Bowen y Ryder, 1974; González-Estévez y Saló, 2010). González-Estévez y colaboradores demostraron la existencia de la autofagia ya a nivel molecular en la especie *Girardia tigrina*, gracias al estudio funcional del homólogo de *DAP-1*, un regulador positivo de la autofagia (González-Estévez et al., 2007). *DAP-1* se expresa en el blastema y en los tejidos preexistentes que deben remodelar. Además, en algunas de las células que expresan *DAP-1* se detecta la caspasa-3 activa, pero nunca marcaje de TUNEL. El RNAi de *DAP-1* resulta en planarias que no son capaces de remodelar y dar lugar a

organismos proporcionados tras la amputación, así como en una reducción de la proliferación de los neoblastos y en consecuencia, del tamaño del blastema regenerante. El hecho de que nunca se observe marcaje de TUNEL en células positivas para *DAP-1*, puede sugerir que en planarias, el mecanismo de autólisis es independiente de la maquinaria de apoptosis o que por otro lado, la fragmentación del DNA no se detecta por que durante el proceso de autofagia, la célula *DAP-1* positiva es fagocitada previamente a la desintegración nuclear (González-Estévez y Saló, 2010).

Estos datos sugieren que en planarias, la autofagia actúa como un mecanismo de muerte celular necesario para el “remodeling” de los tejidos preexistentes y que a su vez, parece que aporta suplemento energético para la proliferación de los neoblastos durante la regeneración (González-Estévez et al., 2007).

2.3. Respuesta proliferativa de los neoblastos

En respuesta a una herida, los neoblastos proliferan con el objetivo de generar nuevas células que restaurarán los tejidos que faltan. Esta respuesta proliferativa de los neoblastos es bimodal y tiene lugar de manera coordinada en el espacio y en el tiempo (Baguñà, 1976; Saló y Baguñà, 1984; Wenemoser y Reddien, 2010) (Figura 10). El primer pico proliferativo tiene lugar 6 horas después del daño de manera generalizada en todo el organismo y en respuesta a cualquier tipo de herida, ya sea una amputación o una incisión que no conlleve falta de tejido (Wenemoser y Reddien, 2010). El segundo pico de proliferación de los neoblastos tiene lugar 48 horas post-amputación y sólo se observa tras heridas que suponen una pérdida de tejido. Además, a diferencia del pico inicial, se requiere la migración local de los neoblastos hacia la herida, centrándose la proliferación en la región cercana a ésta o postblastema. Ya que sólo las heridas que suponen pérdida de tejido inducen el segundo pico de proliferación, se ha propuesto que en respuesta a la herida existen dos fases de respuesta proliferativa de los neoblastos, que se activarían a través de distintos eventos de señalización. Así mismo, se ha descrito que los neoblastos que entran en mitosis durante el primer pico proliferativo (6 horas post-lesión) se encuentran predominantemente en la fase G2 o al final de la fase S del ciclo celular, sugiriendo que la señalización temprana a la herida actúa predominantemente en la

progresión de G2 a M (G2/M) del ciclo celular (Saló y Baguñà, 1984; Wenemoser y Reddien, 2010). Entre los dos picos proliferativos, tiene lugar un descenso general de los números mitóticos, llegando a un mínimo a las 18 horas post-amputación (Figura 10).

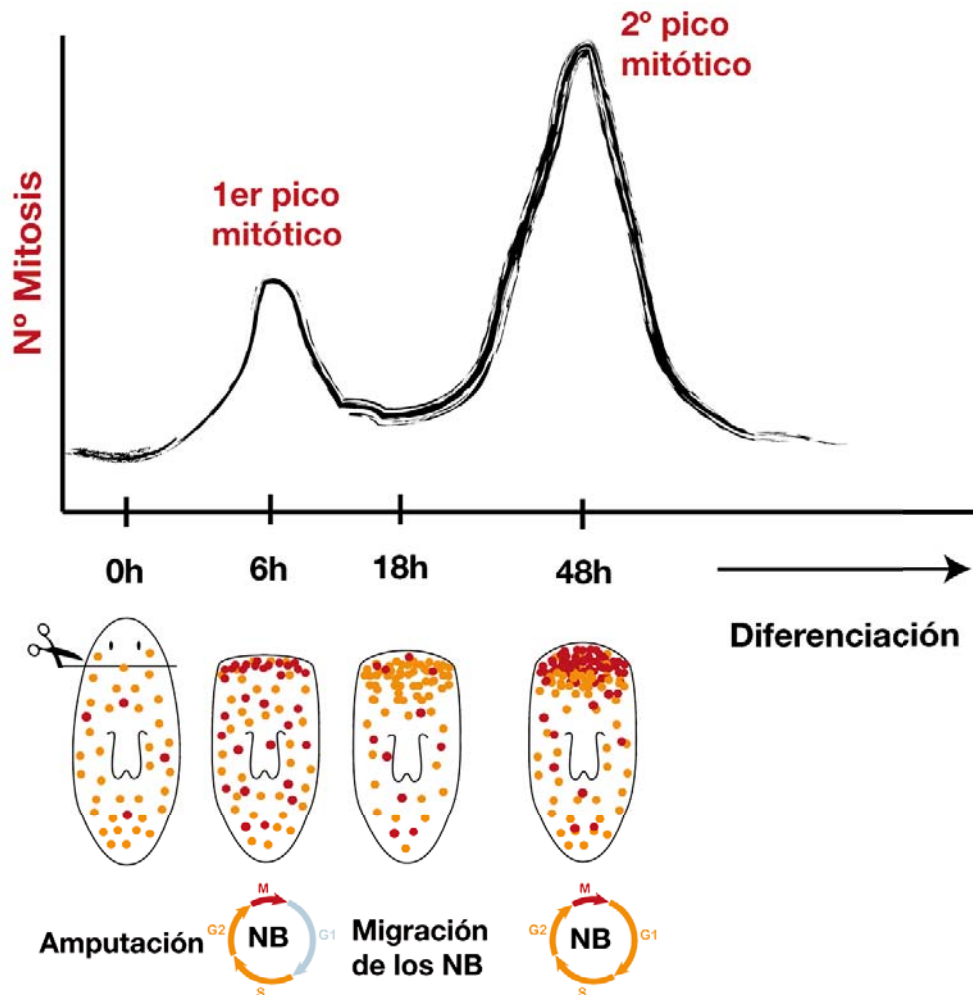


Figura 10: Esquema representativo de los picos proliferativos durante la regeneración de planarias

Este mínimo, sin embargo, no se debe al cese de señalización desde la herida, ya que una segunda amputación 6 horas antes de que los animales alcancen este mínimo mitótico no es suficiente para aumentar el número de mitosis. Por lo tanto, los dos picos mitóticos generados por la amputación parecen responder a una misma cascada de señalización desde la herida (Wenemoser y Reddien, 2010). Probablemente, los neoblastos que participan en estos dos picos proliferativos se encuentran en distintas fases del ciclo, siendo los que se encuentran en G2 o al final de S los que entran primero en mitosis y generan el primer pico proliferativo y la otra gran mayoría de neoblastos que están en G0/G1, producirán el segundo pico mitótico, más tardío, ya que necesitan tiempo

para completar el ciclo y entrar en mitosis. Por lo tanto, la detección de falta de tejido y no tan sólo una lesión, sería necesaria para que este segundo grupo de neoblastos (G0/G1) migren hacia la herida y entren en mitosis generando el segundo pico proliferativo.

Aunque existen evidencias de que los neoblastos detectan la lesión y la falta de tejido de manera probablemente independiente, la naturaleza de los mecanismos moleculares subyacentes aún nos son desconocidos. Así mismo, muchos aspectos de esta señalización permanecen desconocidos. Por ejemplo, aún se desconoce si la señal proliferativa producida tras una lesión con o sin pérdida de tejido es diferente o por el contrario, la misma. En el escenario más probable de que fuera la misma, otra señal independiente producida exclusivamente tras la detección de la falta de tejido sería la que activaría la migración de los neoblastos y activación de éstos que estaban en las fases G0/G1 del ciclo. Por otro lado, la existencia de una subpoblación de neoblastos arrestados en G2 para explicar la rápida inducción mitótica a las 6 horas post-lesión había sido propuesta por Saló y Baguñà (Baguñà, 1974; Saló y Baguñà, 1984). Sin embargo, Newmark y Sánchez-Alvarado proponen que todos los neoblastos están activos y se dividen continuamente, basándose en experimentos de pulso y caza con BrdU, en los que observan que 3 días tras el pulso con BrdU todos los neoblastos lo han incorporado y por lo tanto están dividiéndose activamente (Newmark y Sánchez Alvarado, 2000).

Se ha descrito que durante el desarrollo de los discos de ala de *Drosophila*, células apoptóticas liberan factores mitogénicos, como Dpp o Wg, que podrían estar induciendo la proliferación de las células vecinas que sobreviven (Mollereau et al., 2012; Pérez-Garijo et al., 2009; Ryoo et al., 2004). Este proceso, conocido como “apoptotic-induced proliferation” (previamente “compensatory proliferation”) también parece operar durante la regeneración de la cabeza de la Hydra (Chera et al., 2009). En ambos organismos, Wg (Ryoo et al., 2004) o Wnt3 (Chera et al., 2009) se presentan como los candidatos a ser el factor liberado por las células apoptóticas e inducir la proliferación, aunque su función directa durante el proceso no está demostrada (Mollereau et al., 2012; Pérez-Garijo et al., 2009).

En planarias se ha sugerido que la “apoptotic-induced proliferation” puede estar operando durante la respuesta proliferativa temprana basándose en la cinética de los picos apoptótico y proliferativo, ya que el pico apoptótico tiene lugar a las 4 horas, seguido por el pico proliferativo a las 6 horas post-amputación. Sin embargo, aún no existen

evidencias funcionales de que la abolición o reducción del primer pico apoptótico afecte a la magnitud del pico proliferativo. Tu y colaboradores proponen que la vía TOR es la encargada de generar un equilibrio entre proliferación y apoptosis (Tu et al., 2012). Sin embargo, los resultados que obtienen sobre la función de TOR en la activación de la apoptosis son contradictorios, ya que no sería necesaria para la respuesta apoptótica durante la regeneración, pero sí durante el decrecimiento homeostático. Así mismo, la función de TOR es necesaria para el control de la proliferación de los neoblastos exclusivamente en respuesta a la amputación, que es cuando parece no ser requerido para la inducción de la respuesta apoptótica (Tu et al., 2012). Además, sus resultados sobre la función de TOR durante la homeóstasis se contradicen con el trabajo publicado por Peiris y colaboradores en el que reportan que la vía TOR sí es necesaria para el mantenimiento de la proliferación de los neoblastos (Peiris et al., 2012). Sin embargo, el papel de TOR en la inducción de la respuesta proliferativa está respaldado no sólo por el trabajo de Peiris y colaboradores, sino también por el de González-Estévez y colaboradores (González-Estévez et al., 2012b). Por lo tanto, lo que parece estar claro es que la vía TOR sí sería esencial para la activación de la proliferación en respuesta a la amputación (González-Estévez et al., 2012b; Peiris et al., 2012; Tu et al., 2012) y no en la de la inducción de la apoptosis (Tu et al., 2012), en cuyo contexto no está justificado el papel de TOR en establecer un equilibrio entre proliferación y apoptosis, sino en el control de la proliferación de los neoblastos durante la regeneración (González-Estévez et al., 2012b).

2.4. Información posicional

Uno de los eventos más fascinantes que tienen lugar durante la regeneración es cómo el tejido preexistente reconoce la identidad del que le falta y en consecuencia, las estructuras que corresponden reaparecen (Figura 11). Cómo se consigue que la producción del tejido copie la identidad y proporción del que se ha perdido continúa siendo un misterio.

En este apartado de la introducción voy a resumir toda la información de la que disponemos sobre la determinación y mantenimiento de la identidad en planarias.

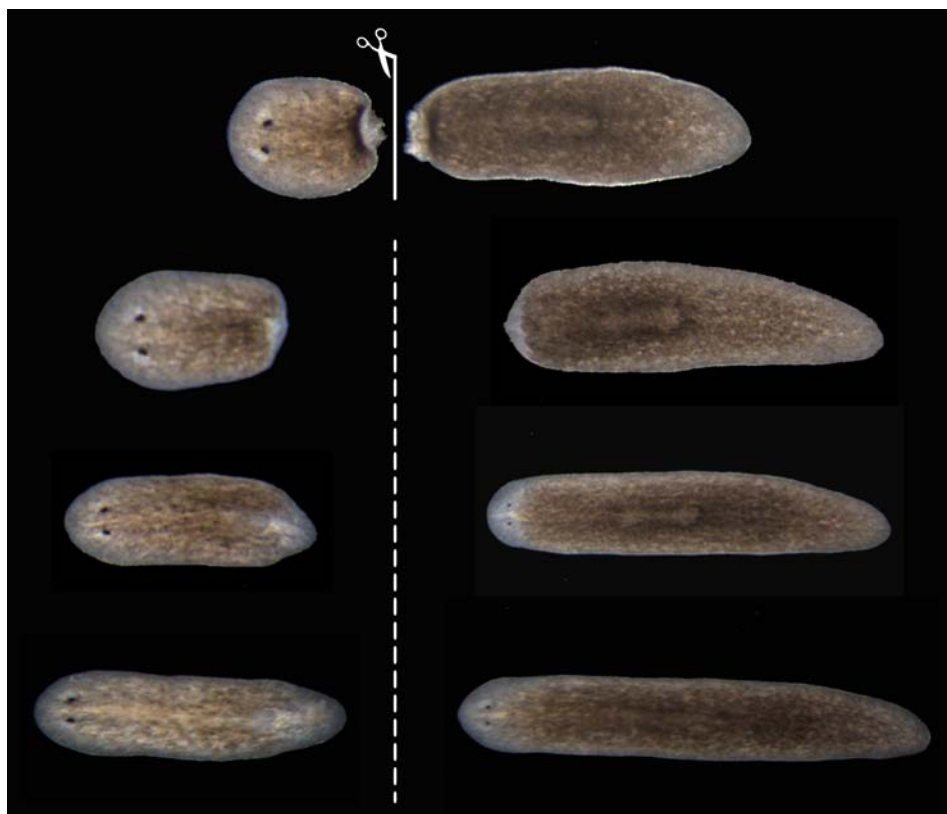
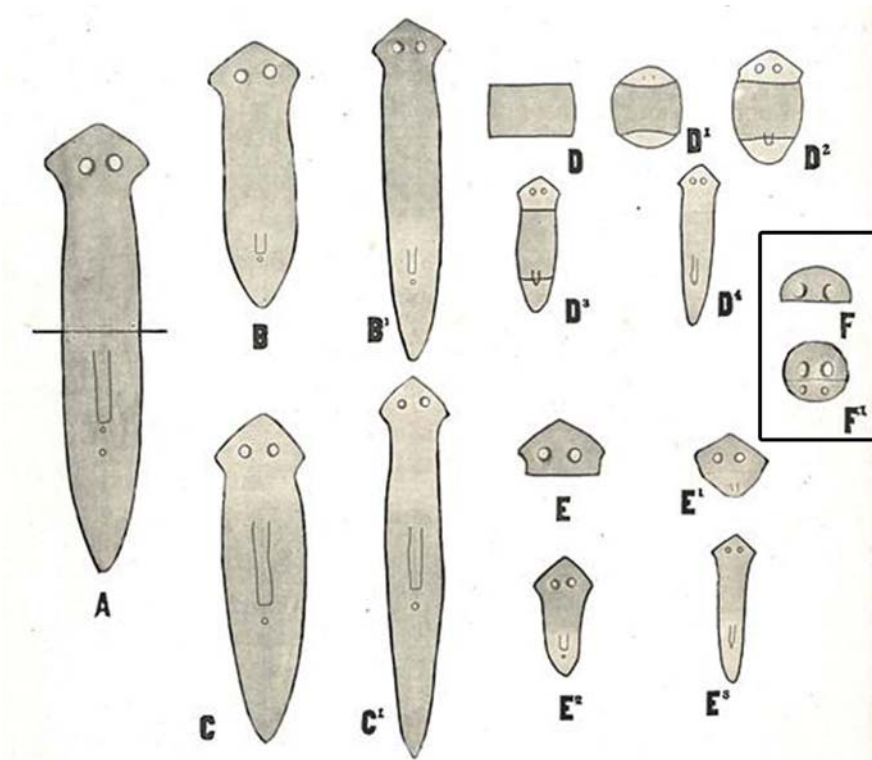


Figura 11: Información posicional durante la regeneración de planaria. Existen mecanismos moleculares que permiten que tras la amputación, los tejidos reconozcan cuáles son las estructuras que faltan para regenerarlas de manera coordinada con los tejidos preexistentes.

2.4.1. Especificación del eje Antero-Posterior (AP)

Morgan y Child ya observaron hace más de un centenar de años, que si cortaban una planaria en fragmentos muy estrechos, se generaban planarias con dos cabezas (Child, 1911; Child, 1940; Morgan, 1898), a las que llamaron “janus headed planarians” inspirado en el mito romano de Janus, dios de las transiciones, representado siempre con dos cabezas por que mira tanto al futuro como al pasado (Figura 12). Morgan planteó que “algo en el propio fragmento determina que una cabeza deba regenerarse en la superficie del corte anterior y una cola en la superficie del corte posterior” (Morgan, 1904). Estas y otras observaciones les llevaron, junto con Brönsted, a proponer la existencia de un “gradiente físico/químico” (Morgan, 1905), “gradiente metabólico” (Child, 1911; Child, 1940) o un “gradiente temporal del campo regenerante” (Brönsted, 1956) responsable de establecer la polaridad AP. Según sus hipótesis, si el tamaño del fragmento amputado es

muy pequeño, no se producirá la diferencia del gradiente necesaria para instruir diferentes identidades a los dos bordes.



Morgan, 1898

Figura 12: Esquema de los experimentos de regeneración realizados por Morgan.

(F) muestra como fragmentos muy pequeños no son capaces de restaurar el gradiente y regeneran otra cabeza en lugar de una cola (Morgan, 1904). Le dio el nombre de “Janus head” por la similitud con la representación del dios Janus, tal y como se observa en esta moneda.

El desarrollo de técnicas moleculares de manipulación génica ha posibilitado la identificación de la información molecular necesaria para determinar y mantener la identidad anterior versus posterior, así como para el “patterning” del eje AP. Esta información comprende vías conservadas evolutivamente en la determinación del eje AP durante el desarrollo embrionario, como la vía Wnt canónica o β catenin-dependiente (Niehrs, 2010; Petersen y Reddien, 2009b) o la vía Hedgehog (Hh) (Ingham, 2001; Lum, 2004).

2.4.1.1. Posterior versus Anterior: Via Wnt canónica o β -catenin-dependiente

Los ligandos Wnts son una familia de glicoproteínas secretables que tras la unión a sus receptores, mayoritariamente pertenecientes a la familia Frizzled (Fz), reclutan y activan a Dishevelled, responsable de la activación de las ramas de la vía Wnt, conocidas como

Wnt canónica/ β catenin-dependiente o, por el contrario, Wnt no canónica/ β catenin independiente. Esta segunda vía no canónica será introducida más adelante en su apartado correspondiente, ya que es exclusivamente la vía Wnt canónica la responsable de la especificación del eje AP. La captación de Dishevelled a la membrana supone la ruptura del complejo de destrucción de la β -catenin, compuesto principalmente por Axin, APC y GSK-3, y la consecuente estabilización y nuclearización de ésta, donde se unirá a los represores de transcripción Lef/Tcf y activará sus factores de transcripción diana (Huang y He, 2008) (Figura 13).

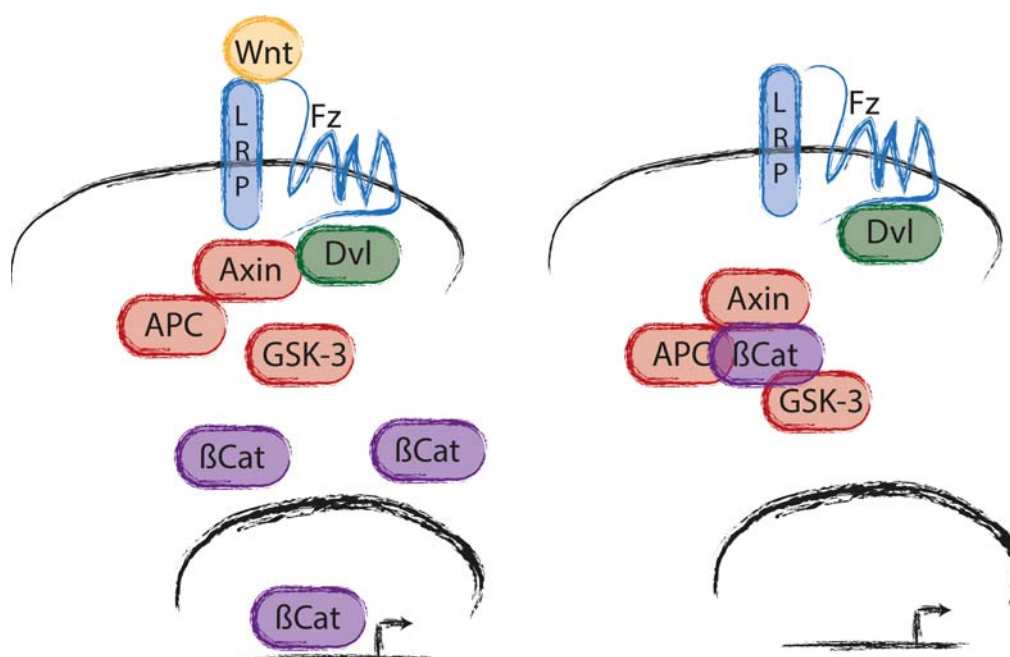


Figura 13: Esquema simplificado de los componentes encargados de la señalización de la vía Wnt canónica/ β -catenin dependiente.

La primera evidencia acerca de la información molecular responsable del establecimiento de la identidad AP se obtuvo a través del silenciamiento de la *β -Catenin-1*. El RNAi de la *β -Catenin-1* resulta en la pérdida de la identidad posterior (Gurley et al., 2008; Iglesias et al., 2008; Petersen y Reddien, 2008a), llegando a producir animales completamente anteriorizados (Iglesias et al., 2008). La progresión del fenotipo a lo largo de la regeneración ocurre de acuerdo con el papel de la *β -Catenin-1* como un efector de un supuesto gradiente morfogenético generado por los ligandos wnts. Así mismo, distintas dosis de *β -Catenin-1* RNAi genera fenotipos graduales con respecto a la afectación del eje AP, que corresponderían a una afectación gradual del putativo gradiente de actividad de la β -Catenin-1 (Adell et al., 2010; Iglesias et al., 2008) (Figura 14). Los fenotipos generados después de una amputación bipolar, del más débil al más penetrante serían: i)

fenotipo “Tailless” (sin cola), en el que la planaria ha perdido la morfología típica de la región posterior, ya que la cola no se alarga y los VNCs quedan fusionados con una morfología redondeada; ii) fenotipo “Two-headed” (2 cabezas), en el que las planarias regeneran una cabeza en lugar de una cola tras la amputación de la región posterior y iii) fenotipo “Radial-like hypercephalized” (hipercefalizado con morfología radial), en el que las planarias no sólo regeneran una cabeza en lugar de una cola, sino que los tejidos preexistentes con identidad central acaban transformándose también en tejidos anteriores, caracterizados por la aparición de tejidos cerebrales y la desaparición de la faringe (Adell et al., 2010; Iglesias et al., 2008) (Figura 14).

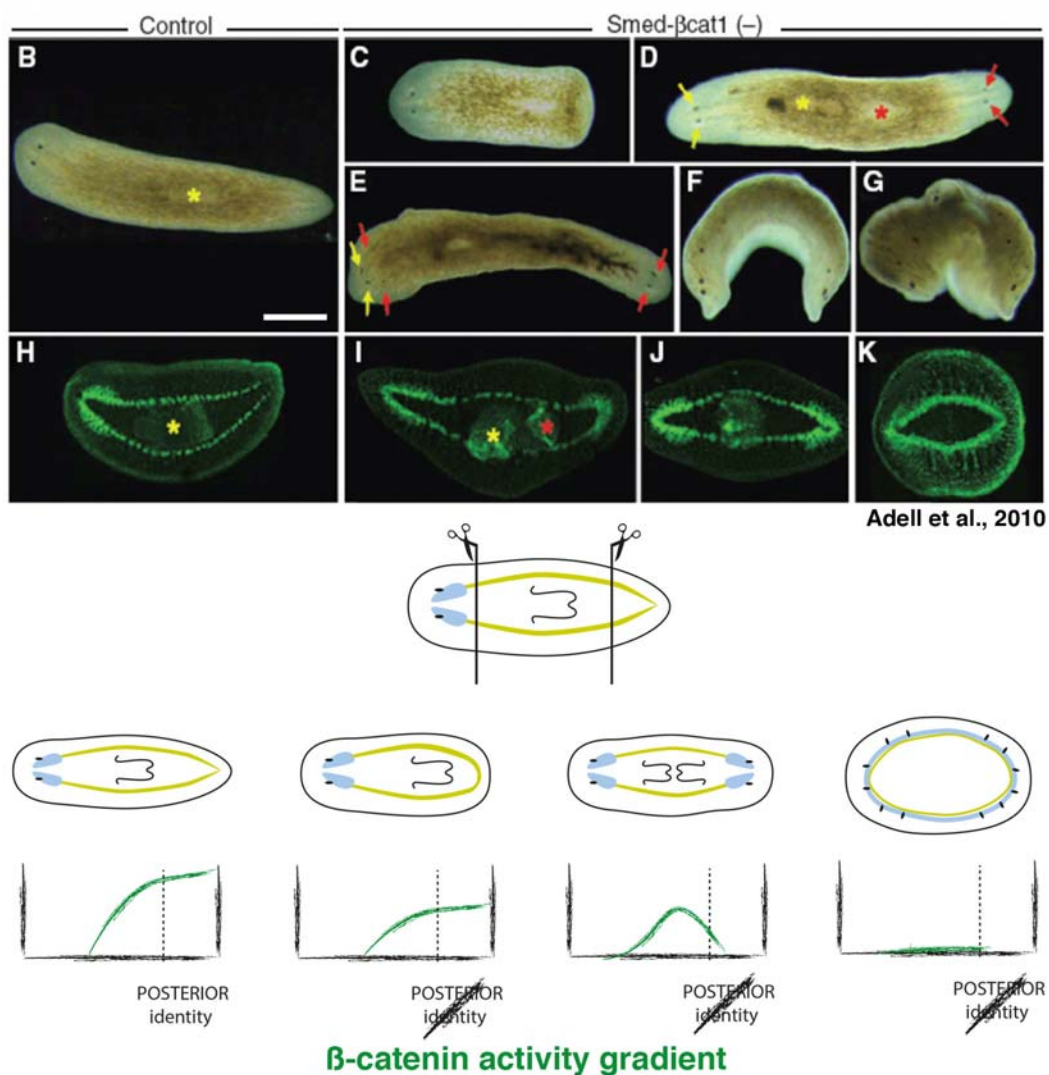


Figura 14: La progresión del fenotipo de las planarias β -catenin-1(RNAi) parece responder a la existencia de un gradiente de actividad de la β -catenin. Imágenes *in vivo* y mostrando el sistema nervioso marcado con anti-Synapsin, un marcador pan-neural, de animales β -catenin-1(RNAi) en las que se observa la progresión del fenotipo (Adell et al., 2010). El fenotipo control se representa en (B) y (H), el fenotipo “Tailless” en (C), el “Two-headed” en (D) e (I) y el “Radial-like hypercephalized” en (G) y (K). Las imágenes intermedias (E), (F) y (J) muestran la progresión entre estos dos últimos fenotipos. Debajo se muestra un esquema representando los cambios en el supuesto gradiente de actividad de la β -catenin en cada uno de los tres fenotipos relacionados con la inhibición de la β -catenin-1.

El fenotipo “two-headed” se reproduce al inhibir *evi/wls*, una proteína transmembrana requerida para la secreción de todos los ligandos Wnts (Adell et al., 2009) (Figura 15).

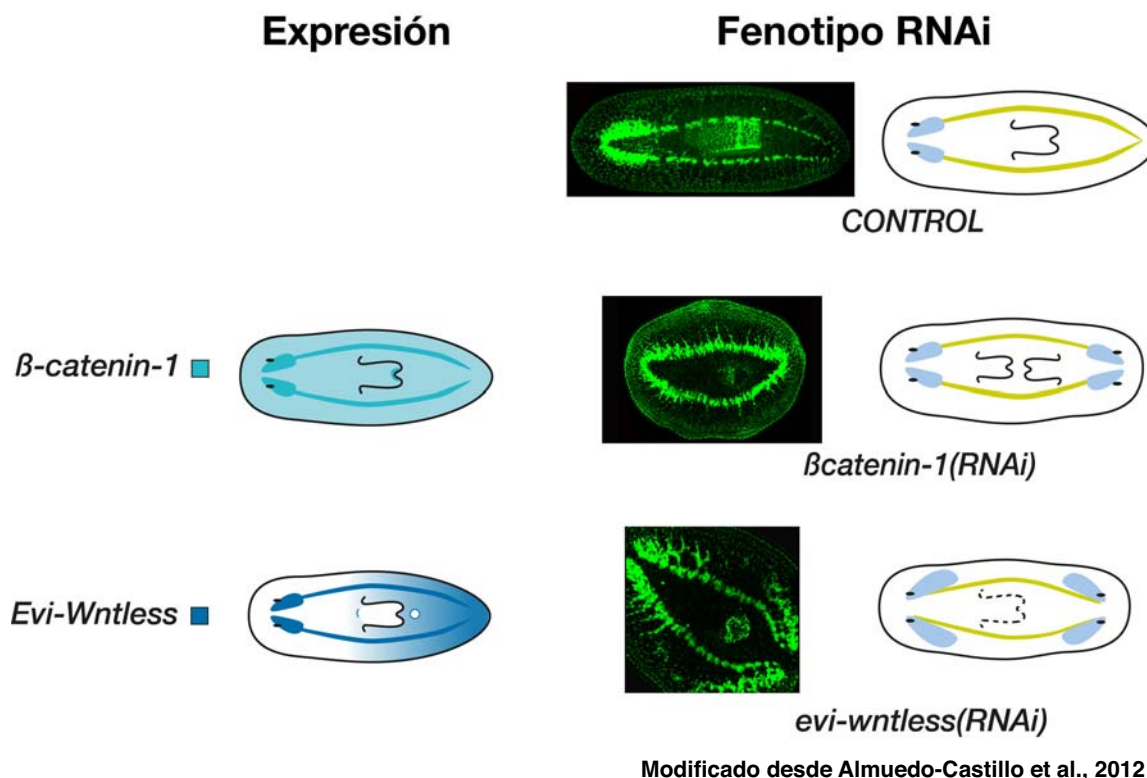
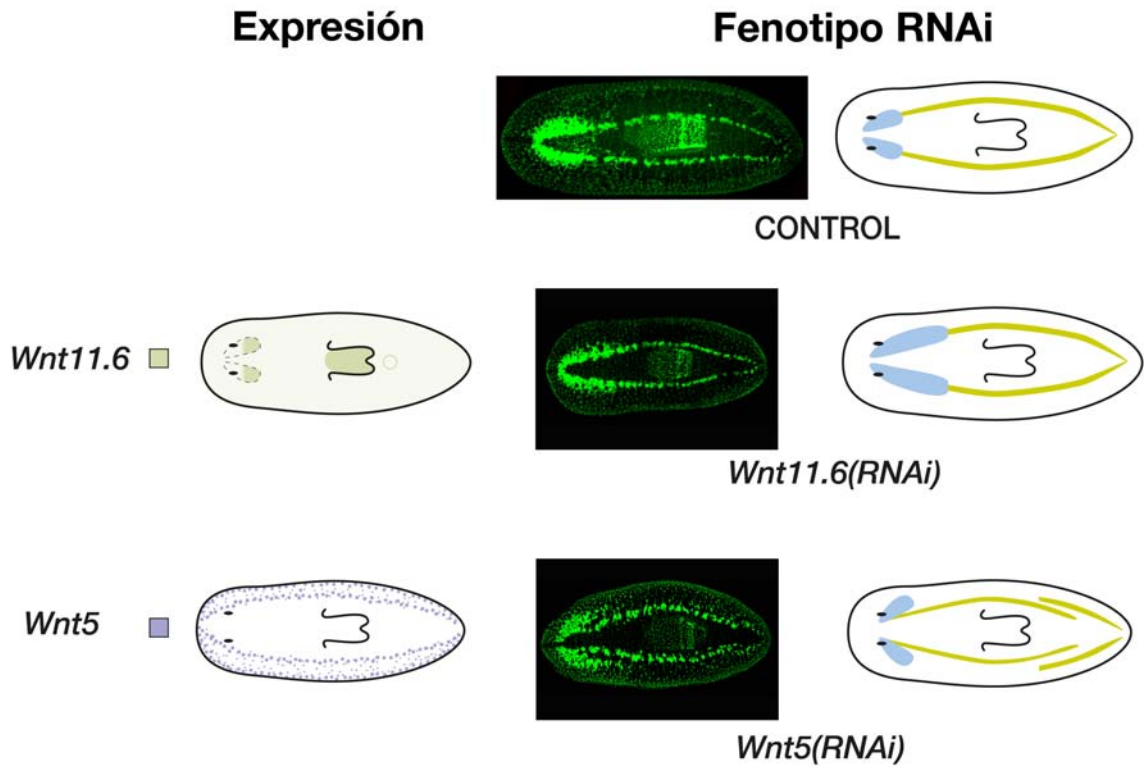


Figura 15: RNAi de *evi-wntless* reproduce el fenotipo “Two-headed” de animales *β-catenin-1(RNAi)*. Esquema mostrando la expresión de la *β-catenin-1* y *evi-wntless* y los fenotipos relacionados con su inhibición. Las imágenes corresponden al análisis del sistema nervioso con el marcador pan-neural anti-Synapsin.

En el genoma de *Schmidtea mediterranea* se han identificado 9 ligandos Wnts, que han experimentado varias reclasificaciones filogenéticas (Adell et al., 2009; Gurley et al., 2010). La más aceptada ahora mismo es que existe un *wnt1* (previamente *wntP-1*), un *wnt2*, un *wnt5* y seis parálogos de *wnt11*: *wnt11.1*, *wnt11.2*, *wnt11.3* (previamente *wntP-4*), *wnt11.4* (previamente *wntP-3*), *wnt11.5* (previamente *wntP-2*) y *wnt11.6* (previamente *wnt-A*). Más recientemente, un estudio filogenético más exhaustivo, incluyendo nuevos Wnts de especies más cercanas y restringiendo los análisis a los lophotrocozoa, reclasifican cuatro de los *wnt11* (*wnt11.3-6*) como parálogos de la subfamilia Wnt4 (Riddiford y Olson, 2011). Las células que expresan los ligandos *wnts* se localizan en dominios muy definidos a lo largo del eje AP y su inhibición por RNAi, genera fenotipos que concuerdan con la idea de que actúan a nivel local en lugares relativamente cercanos a su síntesis.

Dos de estos ligandos *wnts* se expresan en dominios relacionados con el cerebro, aunque no exclusivamente: (i) *wnt11.6* se expresa en la región más posterior del cerebro y su inhibición supone la expansión de la región más posterior del cerebro (Adell et al., 2009;

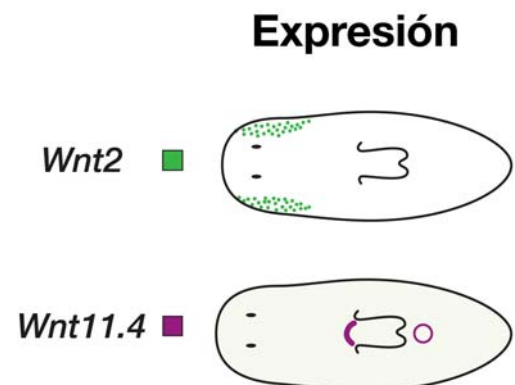
Kobayashi et al., 2007) y (ii) *wnt5* se expresa desde la región más externa del Sistema Nervioso Central (“Central Nervous System” o CNS) hacia los bordes de la planaria y al inhibirlo, se genera la expansión lateral de todo el CNS (Adell et al., 2009; Gurley et al., 2010) (Figura 16).



Modificado desde Almuedo-Castillo et al., 2012

Figura 16: La función de Wnt-5 y Wnt-11.6 está relacionada con la correcta regeneración del cerebro. Esquema mostrando la expresión de *wnt5* y *wnt11.6* y los fenotipos relacionados con su inhibición. Las imágenes corresponden al análisis del sistema nervioso con el marcador pan-neural anti-Synapsin.

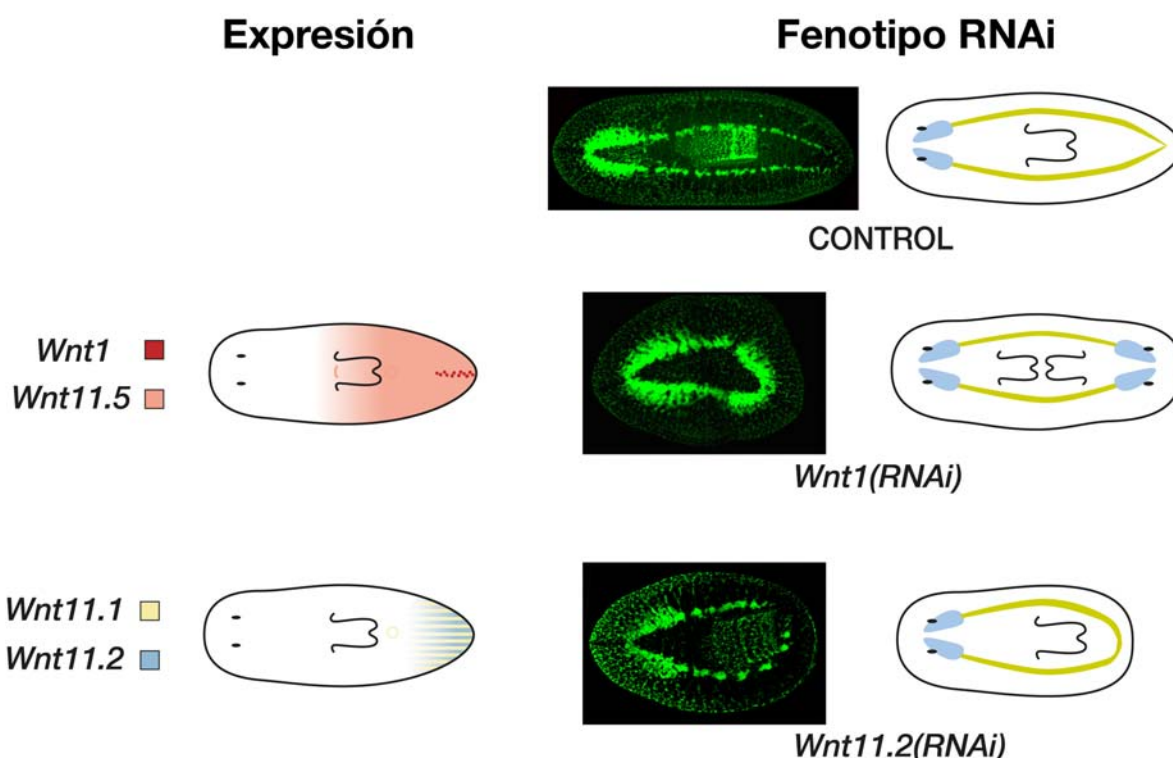
La interferencia de otros dos *wnts*, *wnt-2*, expresado en los laterales de región de la cabeza y *wnt11.4*, expresado de manera más definida en el esófago de la faringe y en la boca (Figura 17), no genera ningún fenotipo observable (Adell et al., 2009; Gurley et al., 2010; Petersen y Reddien, 2008a).



Modificado desde Almuedo-Castillo et al., 2012

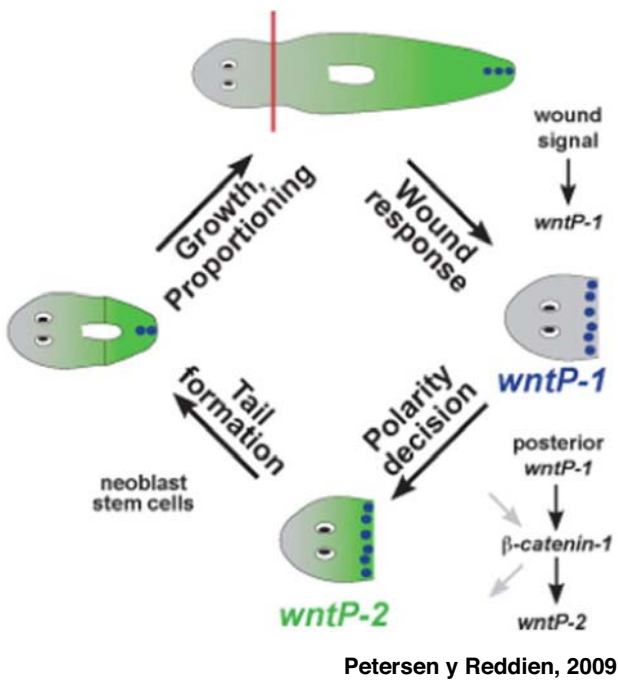
Figura 17: RNAi de *wnt-2* y *wnt11.4* no genera ningún fenotipo observable. Esquema mostrando la expresión de *wnt2* y *wnt11.4*.

Los ligandos Wnts más interesantes dentro de esta sección de establecimiento de identidad AP, son aquellos expresados en regiones posteriores. *wnt-1* está expresado en una fila discreta de células localizadas en la línea media dorsal de la planaria, *wnt11.5* en forma de gradiente desde la zona pre-faringea hasta la cola, donde se expresa más intensamente, *wnt11.1* en la boca y a su vez en forma de gradiente hasta el límite posterior de la cola y *wnt11.2* en un dominio más definido en el borde y línea media posteriores (Adell et al., 2009; Gurley et al., 2010; Petersen y Reddien, 2008a). La interferencia de los dos wnts, *wnt11.1* y *wnt11.2*, que serían los únicos verdaderos ortólogos de *wnt11* de acuerdo con todas las clasificaciones filogenéticas, genera un fenotipo “tailles” en los que la línea media no se establece correctamente, pero que nunca evoluciona a una transformación AP o fenotipo “two-headed” observado al interferir β -catenin-1 (Adell et al., 2009; Gurley et al., 2010). Apoyado por la función evolutivamente conservada de Wnt11 en la elongación AP durante el desarrollo embrionario, puede ser que Wnt11.1 y Wnt11.2 estén involucrados en controlar la migración celular durante la elongación posterior y no en el establecimiento de la identidad a través de la β -catenin-1 (Figura 18).



Modificado desde Almuedo-Castillo et al., 2012

Figura 18: Los ligandos Wnts expresados en regiones posteriores se encargan de la elongación de estas regiones y/o del establecimiento de la identidad posterior. Esquema mostrando la expresión de *wnt1*, *wnt11.5*, *wnt11.1* y *wnt11.2* y los fenotipos relacionados con su inhibición. Las imágenes corresponden al análisis del sistema nervioso con el marcador pan-neural anti-Synapsin.



Petersen y Reddien, 2009

Figura 19: Modelo propuesto sobre la interacción entre Wnt-1 (wntP-1) y Wnt11.5 (wntP-2) a través de la β -catenin-1. (Petersen y Reddien, 2009a)

El único *wnt* cuya interferencia conlleva la transformación AP, es *wnt1*. Sin embargo, la penetrancia del fenotipo “two-headed” al inhibir *wnt1* es muy baja, siendo el fenotipo “tailles” el más penetrante. La expresión de *wnt11.5* durante la regeneración depende de Wnt1 y β -catenin-1 y además, la inhibición conjunta de *wnt1* y *wnt11.5* aumenta la penetrancia del fenotipo “two-headed” (Figura 18). Esto llevó a Petersen y Reddien a proponer un modelo en el que *wnt1* activa a *wnt11.5* a través de β -catenin-1 y que entre los dos serían los responsables de establecer la identidad posterior (Petersen y Reddien, 2009a) (Figura 19).

Es importante destacar que la inhibición de estos *wnts* posteriores, así como la inhibición de *evi-wntless* nunca reproduce el fenotipo más penetrante producido al inhibir la β -catenin-1, que es el “hypercephalized”. Esto podría explicarse por que la interferencia de componentes intracelulares de corta vida media es siempre más eficiente que la de proteínas extracelulares más estables.

La ganancia de función de la β -catenin-1 a través de la inhibición de componentes de su complejo de destrucción, como APC o las axinas (*axins-A/B*) conlleva la transformación AP opuesta, es decir, la generación de planarias “two-tailed” (dos colas), ya que son incapaces de formar una cabeza tras la amputación de la región anterior (Gurley y Sánchez Alvarado, 2008; Iglesias et al., 2011) (Figura 20). Así mismo, la inhibición del ortólogo de *notum*, una hidrolasa secretable que modula la actividad de los ligandos Wnts, genera animales “two-tailed” (Petersen y Reddien, 2011). *notum* está expresado en unas células discretas localizadas en la región dorsal de la punta anterior de la planaria, lo que es consistente con el papel de Notum como un inhibidor de la actividad de la β -catenin-1, y por lo tanto, en el establecimiento de la identidad anterior (Petersen y Reddien, 2011) (Figura 20). Así mismo, se han identificado otros inhibidores de la β -catenin-1, como los “secreted-Frizzled-related proteins” o sFRPs. *sFRP-1* de entre los tres parálogos

descritos, también se expresa en un dominio discreto de la punta anterior del animal. Sin embargo, no se ha descrito ningún fenotipo relacionado con su inhibición.

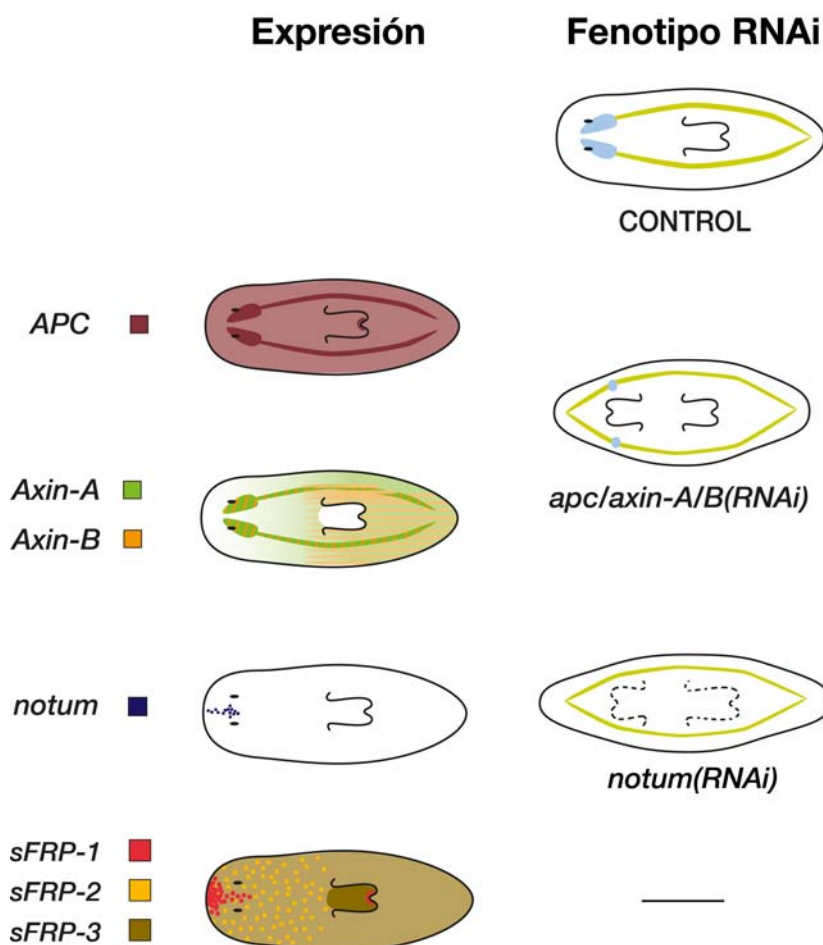


Figura 20: Inhibidores de la β -catenin. Esquema mostrando la expresión de *APC*, *axin-A/B*, *notum* y *sFRP-1/2/3* y los fenotipos relacionados con su inhibición.

En definitiva, inhibir la actividad de la β -catenin-1 es totalmente necesario para la regeneración de la identidad anterior. Recientemente se ha descrito que la inhibición de la *β -catenin-1* es capaz de restaurar por sí sola la capacidad de regenerar una cabeza en fragmentos posteriores de especies de planarias que evolutivamente habían perdido esa capacidad (Liu et al., 2014; Sikes y Newmark, 2014; Umesono et al., 2014)

2.4.1.2. Apoyando a la β -catenin: La vía Hedgehog

La unión del ligando Hedgehog (Hh) a su receptor Patched (Ptc) anula la actividad inhibidora de éste sobre el receptor Smoothness (Smo), que es que realmente activa la cascada de señalización de la vía, que termina con la estabilización del factor de transcripción Ci/GLI y la activación de los genes diana de la vía (Ingham, 2001) (Figura

21). La inhibición de *patched*, el receptor-inhibidor de la vía, de lugar a planarias “two-tailed”, mientras que la inhibición de *hh*, *smo* o *gli*, generará planarias “tailles” y en casos de inhibición de varios elementos a la vez, planarias “two-headed”, lo que lleva a asumir

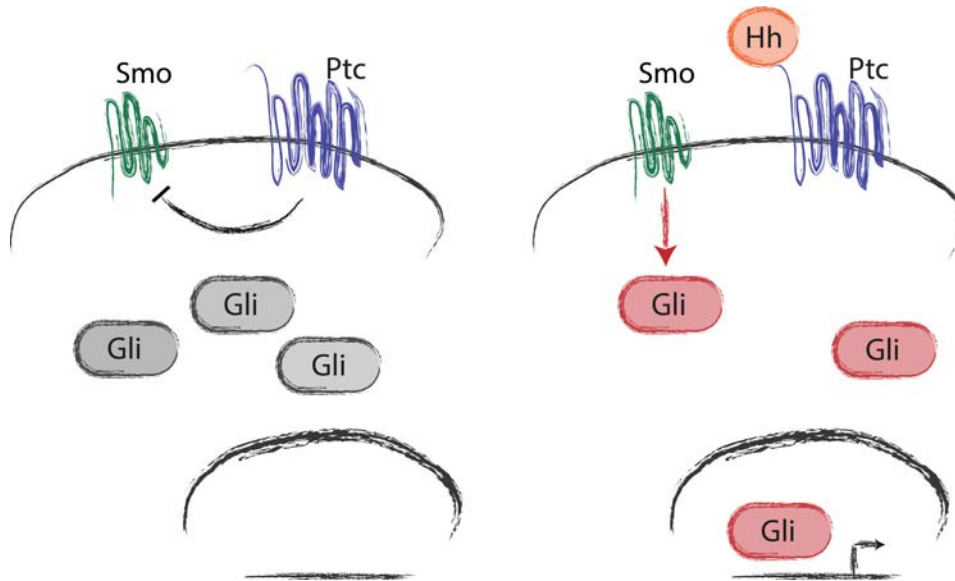


Figura 21: Esquema simplificado de los componentes encargados de la señalización de la vía Hedgehog

que la vía Hedgehog también está involucrada en el establecimiento de la identidad posterior probablemente a través de la regulación de la actividad de la β -catenin-1 (Rink et al., 2009; Yazawa et al., 2009) (Figura 22).

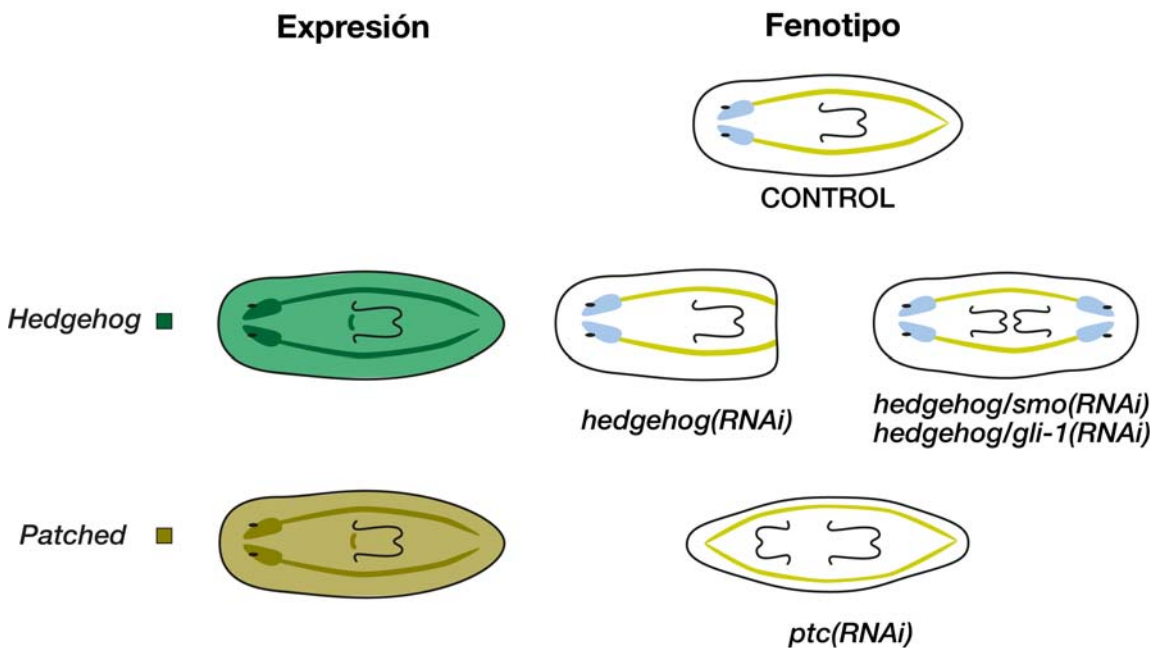
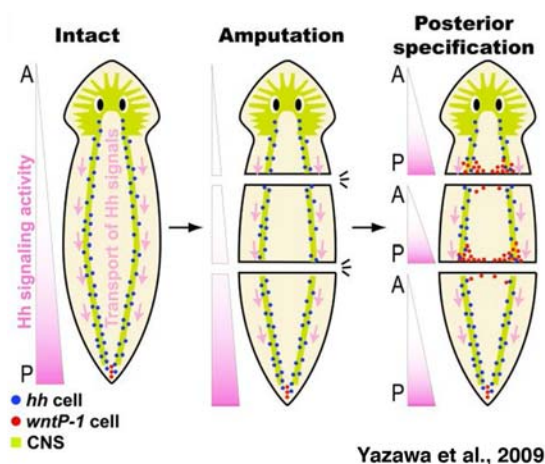


Figura 22: La vía Hedgehog en planarias. Esquema mostrando la expresión de *hedgehog* y su receptor-inhibidor *patched* y los fenotipos relacionados con su inhibición.

Aunque las células que expresan *hh* no están posteriormente polarizadas, sino que se encuentran a lo largo de todo el CNS, se ha descrito que *hh* es necesario para la expresión de *wnt1* en la línea media posterior y así mismo para la expresión posterior de



Yazawa et al., 2009

Figura 23: Modelo propuesto de actuación de la vía Hedgehog. (Yazawa et al., 2009)

wnt11.2. Por lo tanto, se ha propuesto un modelo en el que Hh viajaría a lo largo de los cordones nerviosos para activar la transcripción en posterior de *wnt1* y a su vez, de *wnt11.2* a través de la activación de la β -catenin-1 (Yazawa et al., 2009) (Figura 23).

Sin embargo, este modelo tampoco es fácil de reconciliar ya que tampoco las células que expresan el receptor *ptc* están posteriormente polarizadas ni en el animal intacto ni durante la regeneración (Rink et al., 2009).

Recientemente, Lin y Pearson han propuesto que Yorkie (elemento efector de la vía Hippo, (Oh y Irvine, 2010)) actuaría restringiendo dominios de identidad posterior. El RNAi de *yorkie* impide que las planarias restrinjan los dominios de expresión de los *wnts* posteriores e inhibe la expresión de los inhibidores anteriores durante la regeneración, al igual que impide la re-especificación de sus dominios de expresión en organismos no amputados. Esto les lleva a sugerir que como ocurre en otras especies, Yorkie puede estar interaccionando con la β -catenin-1 y estar restringiendo su actividad (Lin y Pearson, 2014). Sin embargo, aunque muy interesantes, existen muchas inconsistencias en sus resultados, y los defectos observados en el restablecimiento de la identidad parecen ser más bien una consecuencia indirecta de la incapacidad que tienen las planarias *yorkie(RNAi)* de regenerar y remodelar correctamente.

2.4.1.3. Comunicación a través de las “gap junctions” y transporte de iones

Las “gap junctions” son canales de membrana que conectan el citoplasma de dos células posibilitando la comunicación célula-célula y el libre intercambio de pequeñas moléculas o iones. Las proteínas estructurales que conforman estos canales se conocen en

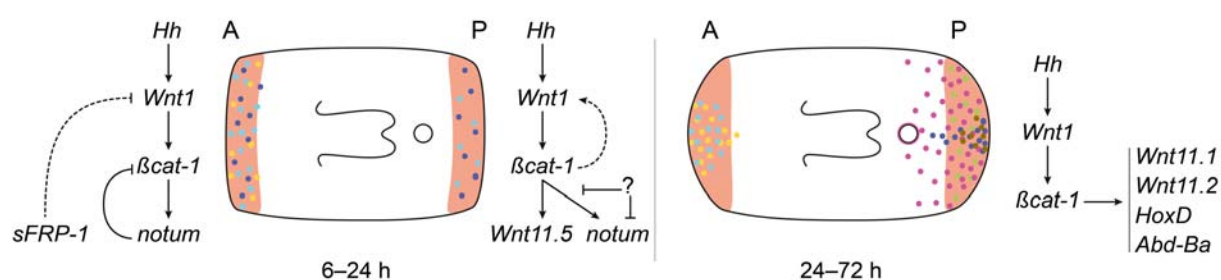
invertebrados como *Inexins* (Hervé y Derangeon, 2012). La inhibición de algunas de estas *inexins*, también produce planarias “two-headed”, lo que pone en evidencia la necesidad del transporte de ciertas moléculas a larga distancia para el establecimiento de la identidad posterior versus anterior (Nogi y Levin, 2005; Oviedo et al., 2009). Oviedo y colaboradores describen que tras el RNAi de las *inexins*, fragmentos que no contienen previamente el cerebro, siempre regenerarán una cabeza en lugar de una cola en heridas posteriores, mientras que los que sí que contienen el cerebro, siempre regenerarán correctamente la cola en heridas posteriores. Sólo regenerarán erróneamente una cabeza en lugar de una cola si se interrumpe mecánicamente la continuidad del cordón nervioso conjuntamente a la inhibición de las *inexins*, y por lo tanto de la comunicación a través de las “gap junctions”. Estos experimentos llevan a proponer que i) el cerebro podría ser una fuente de señalización que inhibiría la formación de otro cerebro y en consecuencia de regiones anteriores y que ii) la información relacionada con la especificación de la identidad posterior versus anterior podría ser transportada a través de los cordones nerviosos y/o de las “gap junctions” (Oviedo et al., 2009).

Otro estudio que demuestra la importancia del transporte de iones es el realizado por Beane y colaboradores, en el que muestran que la despolarización de la membrana es suficiente para generar un fenotipo “two-headed” (Beane et al., 2011). Además, de acuerdo con lo propuesto por Zhang y colaboradores, identifican la señalización a través de calcio como un mecanismo regulador del voltaje de la membrana requerido para el establecimiento de la identidad AP (Beane et al., 2011; Zhang et al., 2011)

2.4.1.4. Establecimiento y mantenimiento de la identidad AP durante las primeras fases de la respuesta regenerativa

La decisión sobre la identidad que debe de adquirir el tejido regenerante se toma durante las primeras horas tras la amputación. A lo largo de los últimos años se ha ido generando mucha información sobre las cinéticas de expresión de los genes responsables del establecimiento de la identidad y sus relaciones entre ellos (Adell et al., 2009; Gurley et al., 2008; Gurley et al., 2010; Iglesias et al., 2008; Petersen y Reddien, 2008b; Petersen y Reddien, 2009a; Petersen y Reddien, 2011; Rink et al., 2009; Yazawa et al., 2009). Reuniendo toda esta información, se ha propuesto que habría dos fases independientes: una temprana de establecimiento de la identidad y otra más tardía en la que mecanismos

alternativos se activan para mantener la identidad previamente establecida. Durante la primera fase, *hh* sería el primero en expresarse y activaría la expresión de *wnt1* en cualquier herida, tanto anterior como posterior, para acabar polarizándose en posterior al cabo de 1-2 días tras la amputación (Petersen y Reddien, 2009a; Rink et al., 2009). *wnt1* sería el responsable de la activación, a través de la β -catenin-1 de la expresión de *notum*, que aunque se expresa preferentemente en heridas anteriores, presenta una expresión temporal en heridas posteriores entre 18-48 horas (Petersen y Reddien, 2011). *sFRP-1* también muestra una expresión muy temprana polarizada en heridas anteriores (Sureda et al., resultados no publicados). *Notum* y probablemente *sFRP-1* estarían evitando la activación de la β -catenin-1 en heridas anteriores, posibilitando la regeneración de la cabeza (Petersen y Reddien, 2011). La activación de la β -catenin-1 en heridas posteriores desencadenaría a su vez la expresión de *wnt11.5* (Petersen y Reddien, 2009a). Durante la segunda fase, en la que *Hh* continua manteniendo la expresión de *wnt1* en posterior, se empezarán a expresar genes dianas de la β -catenin-1, como los *wnt11.1*, *wnt11.2* y algunos genes *Hox* como *HoxD* y *AbdbA* (Gurley et al., 2010; Iglesias et al., 2008; Rink et al., 2009; Yazawa et al., 2009) (Figura 24).



Almuedo-Castillo et al., 2012

Figura 24: Modelo propuesto para la especificación y posterior mantenimiento de la identidad AP y las interacciones entre los distintos elementos encargados.

En este modelo, sin embargo, aún faltan muchos componentes, ya que quedan muchas preguntas por resolver, por ejemplo: ¿cuál es la justificación funcional de la expresión de *wnt1* y *hh* en cualquier herida y no sólo en posterior? ¿o de la expresión transitoria de *notum* en posterior? y así mismo, ¿qué mecanismos se encargarían de inhibir más tarde su expresión allí donde no les corresponde durante la segunda fase?.

Gurley y colaboradores aportan un dato muy interesante a este modelo, y es que la primera fase de establecimiento de la identidad ocurre de manera independiente de los neoblastos, mientras que la segunda depende de la nueva producción de células a través de la proliferación de éstos. Esto sugiere que el mantenimiento de la identidad y el crecimiento o elongación del tejido son dos eventos que ocurren de manera simultánea y

que dependen el uno del otro. Esto dificulta, por lo tanto, la identificación de mecanismos necesarios para el crecimiento o exclusivamente para el mantenimiento de la identidad del tejido.

2.4.1.5. Regeneración de los polos AP y establecimiento de la línea media

El laboratorio de Peter Reddien introduce un concepto muy interesante para agrupar un grupo de genes descritos con un papel en la regeneración anterior, posterior o ambas, pero que no son necesarios para el establecimiento inicial de la identidad, o lo que es lo mismo, para la toma de decisión de anterior versus posterior. Estos genes serían necesarios para la regeneración de los polos y por lo tanto para el “patterning” del eje AP una vez ya la polaridad está fijada (Chen et al., 2013; Scimone et al., 2014). Estos genes pueden dividirse en dos grupos principales:

- Genes necesarios para la regeneración del polo posterior, entre los que se encuentran un gen de la familia de los “LIM-homeobox”, *islet* (Hayashi et al., 2011), otro de la familia de los “TALE-homeodomain”, *pbx* (Blassberg et al., 2013; Chen et al., 2013) y otro de la familia de los “paired class/pituitary homeobox”, *pitx* (März et al., 2013). La función de estos genes es necesaria para la formación y crecimiento del polo posterior así como para la expresión más tardía de *wnt1* y de otros genes relacionados con el mantenimiento de la identidad posterior, como *wnt11.1*, *wnt11.2* y *wnt11.5*. Ninguno de estos genes presenta un patrón de expresión polarizado en el organismo intacto, pero durante la regeneración posterior, al menos *islet* y *pitx* se expresan en las mismas células que expresan *wnt1* en la línea media dorsal posterior (März et al., 2013) (Figura 25).

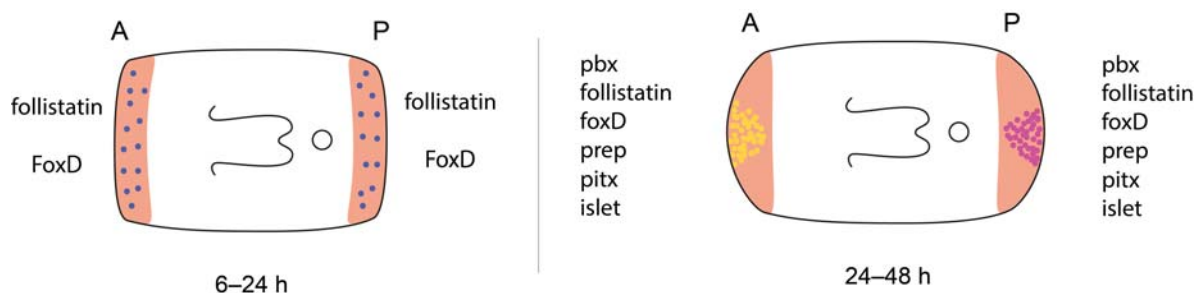


Figura 25: Expresión de los genes encargados de la regeneración de los polos durante las primeras horas de regeneración.

La inhibición de estos genes genera un fenotipo muy parecido al “tailles”, observado al inhibir *wnt11.1/11.2* o bajas dosis de inhibición de *wnt1* o *β -catenin-1* (Blassberg et al., 2013; Chen et al., 2013; Hayashi et al., 2011; März et al., 2013) (Figura 26).

- Genes necesarios para la regeneración del polo anterior, entre los que se encuentra nuevamente *pbx*, junto con otro gen de su misma familia de los “TALE-homeodomain”, *prep* (Felix y Aboobaker, 2010), otro gen de la familia “Forkhead”, *FoxD* (Scimone et al., 2014) y *follistatin*, una molécula secretable reguladora de proteínas TGF- β (Roberts-Galbraith y Newmark, 2013). Por su parte, estos genes serían necesarios para la formación y crecimiento del polo anterior que viene acompañado por la expresión más tardía de *notum* y de los genes relacionados con el mantenimiento de la identidad anterior, como *sFRP-1* y *ndl-4* (*nou darake-like gen 4*). *prep*, *follistatin* y *FoxD* tienen una expresión anterior polarizada en el organismo intacto (Felix y Aboobaker, 2010; Roberts-Galbraith y Newmark, 2013; Scimone et al., 2014). Durante la regeneración, estos tres genes junto con *pbx* se co-expresan en las mismas células que a su vez están expresando *notum* en la línea media anterior dorsal (Scimone et al., 2014) (Figura 25). Al inhibir estos genes, se generan planarias incapaces de regenerar estructuras anteriores como el cerebro (Blassberg et al., 2013; Chen et al., 2013; Felix y Aboobaker, 2010; Roberts-Galbraith y Newmark, 2013; Scimone et al., 2014) (Figura 26).

Aunque muy atractiva, esta división funcional de los genes en responsables de regeneración anterior y/o posterior puede ser artificiosa. März y colaboradores describen que la inhibición de *pitx* e *islet*, no sólo afecta a la regeneración posterior, sino también a la anterior, ya que produce planarias cíclopes, un fenotipo menos penetrante generado también al inhibir *prep* y *FoxD* (Felix y Aboobaker, 2010; März et al., 2013; Scimone et al., 2014). Además, durante la regeneración anterior, tanto *islet* como *pitx* se coexpresan en la línea media dorsal anterior (März et al., 2013) (Figura 25). Esto podría sugerir que Pitx e Islet, junto con Pbx, son también necesarios para la regeneración de ambos polos, anterior y posterior.

Por otro lado y de acuerdo con el concepto de regeneración de los polos, es muy interesante el hecho de que la expresión de todos estos genes, al menos durante la regeneración, esté relacionada con la línea media. De hecho, la expresión de otros genes relacionados con la línea media, como *slit* o *admp*, se ve afectada al inhibir, al menos,

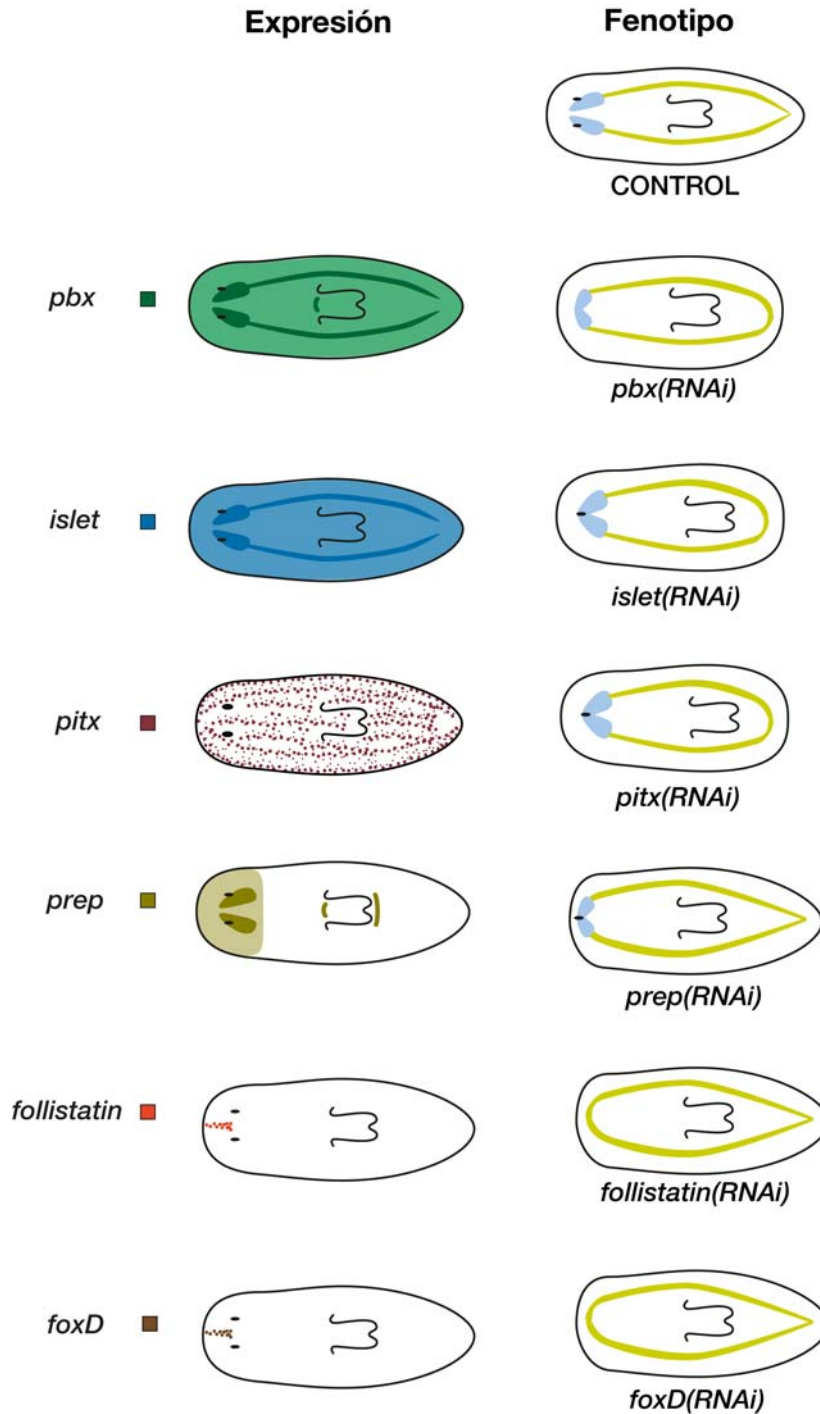


Figura 26: Regeneración y crecimiento de los polos. Esquema mostrando la expresión de los genes involucrados y los fenotipos relacionados con su inhibición.

FoxD, *pbx* y *pitx*. Es posible que la función común de estos genes sea la regeneración y establecimiento de la línea media, y en consecuencia, el crecimiento y el “patterning” de las estructuras regenerantes. Entonces, su función de mantenimiento de la identidad podría estar supeditada a su función durante el crecimiento morfogénico, ya que cómo pueden expresarse los genes de información posicional en un organismo RNAi cuando la región donde deben hacerlo no ha regenerado. Esto también pone en evidencia que en ninguno de los estudios funcionales de estos genes se realizan análisis exhaustivos de la

afectación de la proliferación durante la regeneración. De hecho, un segundo trabajo sobre la función de Follistatin realizado por Gaviño y colaboradores, destaca que este gen puede tener un efecto más general sobre la regeneración y no exclusivamente durante la formación de estructuras anteriores, ya que observan que la inhibición de *follistatin* previene la aparición del segundo pico proliferativo y por lo tanto la formación de cualquier tipo de blastema, independientemente de su identidad (Gaviño et al., 2013).

Un aspecto que queda sin resolver es que todos estos genes, al igual que los encargados del establecimiento temprano de la identidad (*hh*, *notum*, *wnt1*), se expresan durante la regeneración en ambos blastemas, anterior y posterior (Figura 25). Puede ser que esto refleje la falta de otros mecanismos sin identificar encargados de inhibirlos y por lo tanto, de generar la polaridad funcional. Por otro lado, puede ser que la robustez de este sistema genético dependa de que las vías estén activas también para garantizar la expresión de sus inhibidores. Un ejemplo de esto es el caso del inhibidor anterior de la β -catenin-1, Notum, que a la vez requiere de la actividad de esta para su expresión (Petersen y Reddien, 2011).

En conjunto, toda la información generada a lo largo de los últimos años en relación al establecimiento del eje AP pone en evidencia la importancia de la integración de la información posicional y la existencia de redundancia molecular en la señalización de dos eventos principales: i) garantizar la activación de la β -catenin-1 exclusivamente en posterior junto con su inhibición en anterior y ii) el crecimiento morfogenético de los polos a través del restablecimiento de la línea media.

2.4.2. Especificación del eje Dorso-Ventral (DV)

Junto con el eje AP, los animales bilaterales también están regionalizados a lo largo de su otro eje cartesiano, el eje DV (Niehrs, 2010). El establecimiento del eje DV en planarias depende de los organizadores BMP/ADMP (Bone Morphogenetic Protein/ Anti-Dorsalizing Morphogenetic Protein) (Gaviño y Reddien, 2011; Molina et al., 2011; Molina et al., 2007; Orii y Watanabe, 2007; Reddien et al., 2007). Los BMPs son un grupo de ligandos que

forman parte de la superfamilia de los TGF- β (Transforming Growth Factors). La unión del ligando BMP a su receptor conlleva la activación del componente intracelular de la vía, Smad1/5/8 que junto a Smad4 se unen para formar el complejo Smad que sería translocado al núcleo y una vez allí, activaría la transcripción de los genes diana de la vía (De Robertis, 2009). En *Xenopus* se ha demostrado que la unión de ligandos antagonistas de BMP, como Chordin o Noggin impide la unión de BMP con su receptor, y por lo tanto bloquea la activación de la cascada de señalización (Zakin y De Robertis, 2010) (Figura 27). La presencia de los inhibidores Noggin y Chordin junto con ADMP en el polo opuesto a BMP garantiza la activación de BMP en un solo polo (Zakin y De Robertis, 2010). Además, ADMP y BMP están sometidos a una regulación transcripcional opuesta (BMP inhibe a ADMP y se auto-activa mientras que ADMP activa a BMP y se auto-inhíbe), que permite que los embriones autorregulen el establecimiento de su eje DV (Reversade y De Robertis, 2005) (Figura 27).

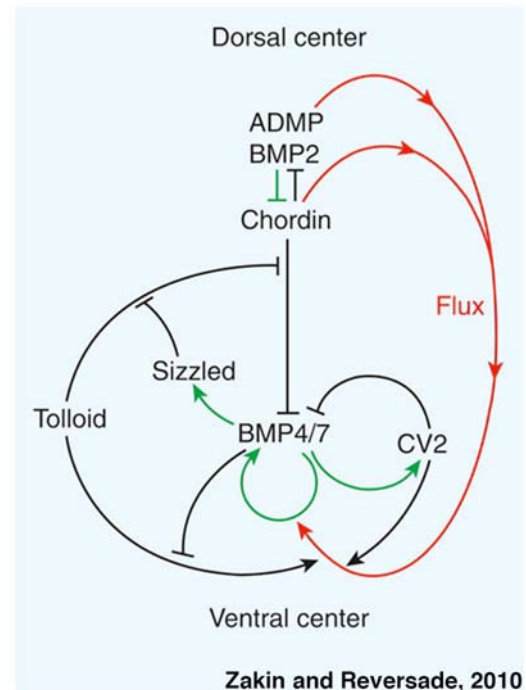


Figure 27. Auto-regulación del sistema BMP/ADMP durante el establecimiento del eje DV en *Xenopus*. (Zakin y Reversade, 2010).

En planarias se han identificado ortólogos de todos los genes de la vía a excepción de *chordin*: *bmp*, *smad1*, *smad4*, *admp* y dos parálogos de *noggin* (*noggin1/2*), así como 8 parálogos dentro de una nueva familia denominada “noggin-like” (*nlg1-8*) (Figura 28A). El análisis de la vía BMP en planarias revela que su función está evolutivamente conservada, siempre teniendo en cuenta que los animales invertebrados, como *Drosophila* o la planaria, presentan el eje DV invertido con respecto a los animales vertebrados, como *Xenopus*. Es decir, mientras que el sistema nervioso en *Xenopus* es dorsal, en la planaria, es ventral (De Robertis, 2008) (Figura 28B).

bmp en planarias se expresa en la línea media dorsal y su inhibición, así como la de sus efectores intracelulares, *smad1* o *smad4*, genera la ventralización de los organismos, en los que estructuras típicamente ventrales, como el CNS, la boca o los cilios ventrales, aparecen ectópicamente en dorsal. Por lo tanto, BMP funcionaría en la especificación y mantenimiento de la identidad dorsal y en consecuencia, inhibiendo la diferenciación de

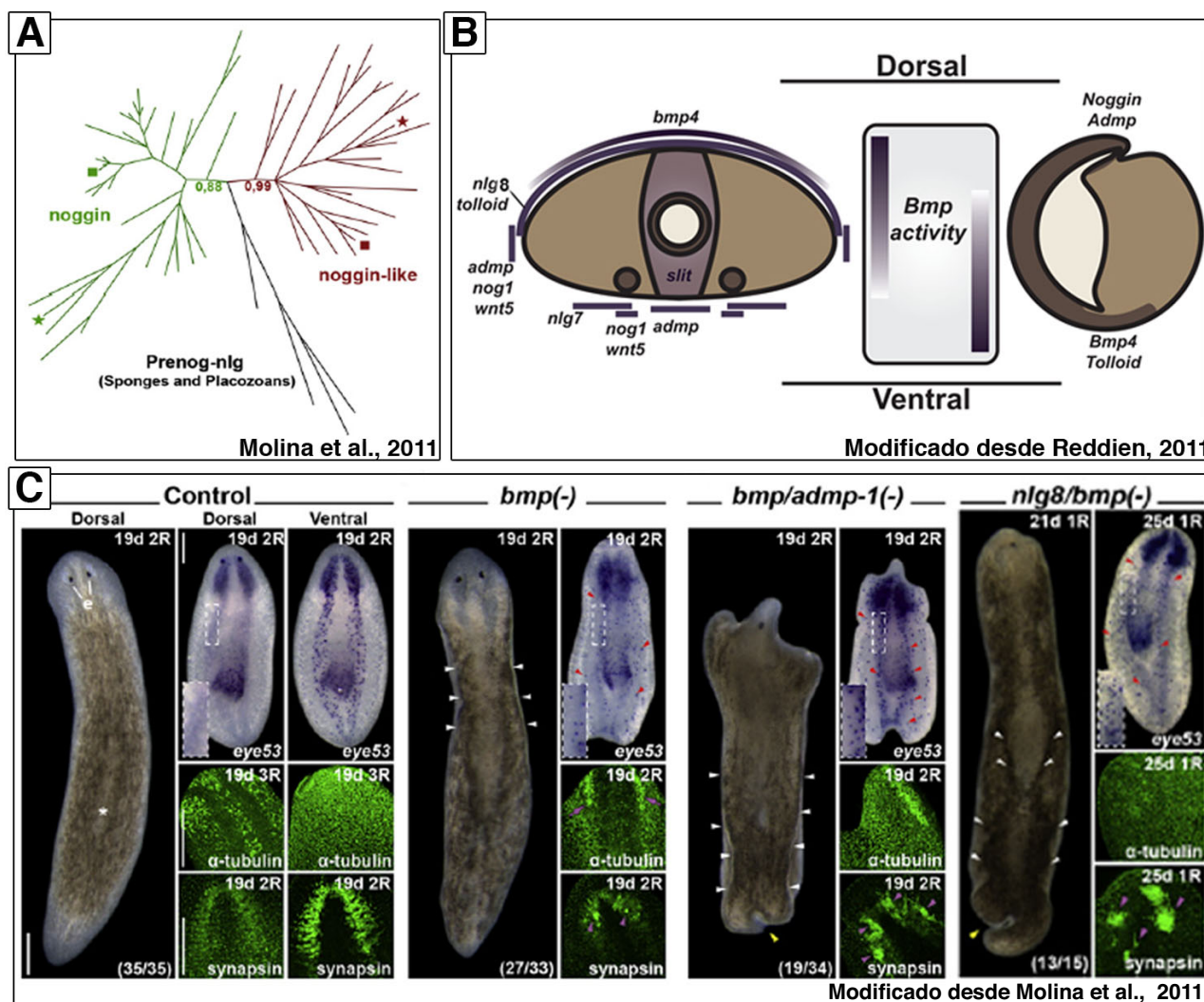


Figure 28. El sistema BMP/ADMP se encarga de la especificación del eje DV en planaria. (A) Análisis filogenético que muestra que *noggin* (verde) y *noggin-like* (rojo) son dos familias génicas diferentes en todos los eumetazoans (Molina et al., 2011). **(B)** Esquema que propone la función conservada de BMP/ADMP asumiendo la inversión de los ejes propuesta durante la evolución de los deuteróstomos. Se muestran: i) una sección transversal de la planaria donde el círculo central correspondería a la rama anterior del digestivo y los dos círculos ventrales a los cordones nerviosos, junto con ii) una sección sagital del embrión de *Xenopus*. *bmp* y *admp/noggin* se expresan en polos opuestos en los dos organismos (Reddien, 2011). **(C)** El RNAi de *admp* y *nlg8* aumenta la penetrancia del fenotipo *bmp(RNAi)*. Se muestran imágenes de animales *in vivo* (izquierda); expresión del marcador ventral *eye-53* (derecha, primera fila); inmunohistoquímica con anti- α Tubulina, que presenta un patrón homogéneo de cilios en ventral pero concentrado en una línea en dorsal (derecha, segunda fila) e inmunohistoquímica con anti-Synapsin que marca el plexo nervioso muscular en dorsal y el CNS en ventral (Molina et al., 2011).

tejidos nerviosos (Molina et al., 2007; Molina et al., 2011; Orii y Watanabe, 2007; Reddien et al., 2007). El silenciamiento de los inhibidores de BMP, *noggin-1* y *2*, genera el fenotipo dorsalizante opuesto (Molina et al., 2011). *admp* se expresa complementariamente a *bmp* en la línea media ventral y se ha sugerido que se establece el mismo sistema de regulación transcripcional que en *Xenopus*, donde BMP inhibe a *admp* y ADMP activaría a *bmp* (Gaviño y Reddien, 2011; Molina et al., 2011). Además, la doble inhibición del sistema *admp/bmp* genera un fenotipo más penetrante que al inhibir exclusivamente *bmp*,

apoyando que el circuito regulador ADMP/BMP se encarga del establecimiento del eje DV (Molina et al., 2011) (Figura 28C).

El trabajo de Molina y colaboradores en planarias ha permitido la identificación de una nueva familia de reguladores positivos de BMP, la de los “noggin-like”, que además están presentes desde cnidarios hasta vertebrados y cuya función está conservada en *Xenopus* (Molina et al., 2011). En planarias existen 8 parálogos de *nlg*, pero sólo *nlg-8* parece funcionar como un regulador positivo de BMP. La inhibición de *nlg-8*, al menos en lo referente a tejidos nerviosos, supone la ventralización del animal (Figura 28C).

En definitiva, este complejo circuito compuesto por BMP y sus reguladores positivos (ADMP, Nlg-8) y negativos (Noggin) garantizan la activación de BMP exclusivamente en el polo dorsal y restringen, en consecuencia, la diferenciación del CNS en ventral.

Niehrs propone la existencia de un sistema de coordenadas cartesianas generado por la interacción entre la vía Wnt y la vía BMP para garantizar el establecimiento de la axialidad de los organismos (Niehrs, 2010). Esta idea se basa en que en *Xenopus*, el organizador de Spemann, un clúster de células de la región dorsal-anterior del embrión, expresa tanto los inhibidores de la vía Wnt como los de la vía BMP. Este organizador, al ser transplantado a una zona opuesta del embrión, tiene la capacidad de inducir un nuevo eje AP y DV que están perfectamente integrados (De Robertis, 2009; Niehrs, 2010). Trasladar este concepto a planarias es extremadamente interesante, pero a la vez confuso, ya que comparar la regeneración de un organismo adulto con una identidad predeterminada, con el desarrollo del embrión temprano de *Xenopus* es difícil. Aún así, algunas observaciones apuntan a ciertos paralelismos entre los dos sistemas: i) experimentos de trasplantes que generan un borde DV ectópico (invirtiendo la orientación DV del fragmento transplantado) inducen a su vez la formación de un nuevo eje AP y DV. Esto ha llevado a hipotetizar que el borde DV en planarias actuaría como un centro organizador (Schilt, 1970), ii) Aunque no hay evidencias de que la inhibición de la vía Wnt o BMP tenga algún efecto sobre la otra, recientemente se ha descrito que inhibir la formación de los polos AP en animales *pbx(RNAi)*, afecta la expresión de genes de establecimiento del eje DV (Chen et al., 2013) y iii) una vez más, la expresión de muchos de estos genes de polaridad AP en la línea media dorsal, ya sea anterior o posterior, donde también se expresarían *bmp/admp*.

2.4.3. Especificación del eje Medio-Lateral (ML)

La especificación del eje ML se relaciona en la literatura de planarias con la función del ortólogo de *slit* (Cebrià et al., 2007). Slit es una proteína extracelular que tiene un papel muy conservado en repeler el crecimiento hacia la línea media de los axones que expresan su receptor Robo (Killeen y Sybingco, 2008). *slit* en planarias se expresa en la línea media dorsal y ventral y su inhibición genera planarias en las que el CNS regenerante colapsa en la línea media (Figura 29).

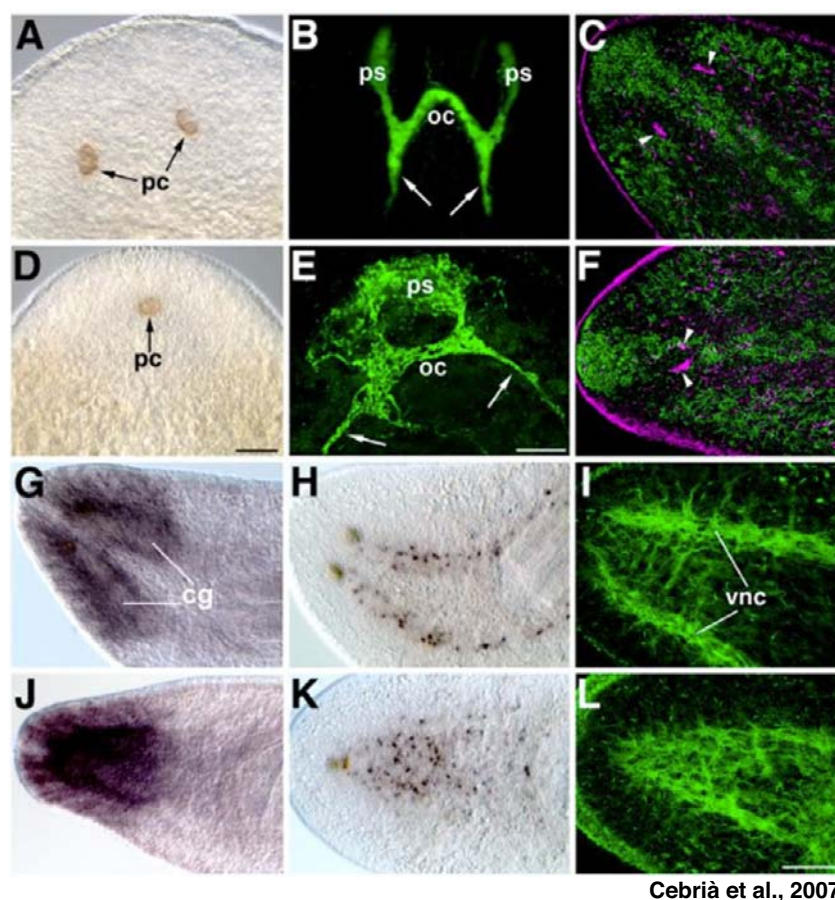


Figure 29. Slit inhibe la regeneración de tejidos nerviosos en la línea media. (A-C y G-I) Planarias control; **(D-F y J-L)** Planarias *slit(RNAi)*. **(A,D)** Imágenes de microscopía de contraste de las células pigmentarias de los ojos; **(B, E)** inmunohistoquímica con anti-arrestin (VC1) que marca el sistema visual; **(C,F)** inmunohistoquímica con anti- α Tubulina que marca los cilios en secciones más dorsales (verde) y los fotorreceptores en secciones más ventrales (magenta); **(G,J)** expresión de *H.10.2f* en los ganglios cefálicos; **(H,K)** expresión de *netrin2* en los ganglios cefálicos y en los cordones nerviosos; **(I, L)** inmunohistoquímica con anti- α Tubulina que también marca los cordones nerviosos en las secciones aún más ventrales (Cebrià y Newmark, 2007).

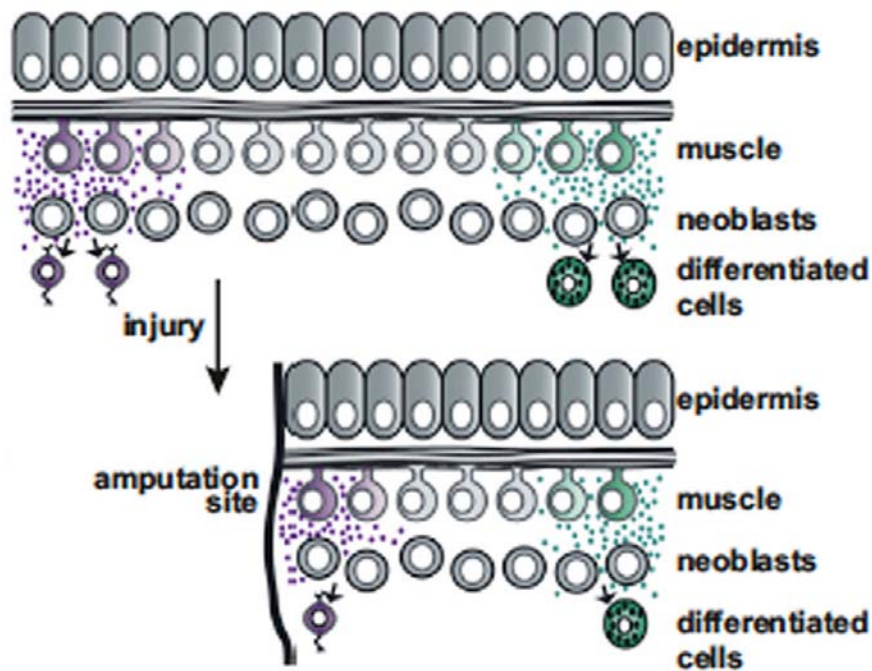
El patrón de expresión y el fenotipo de las planarias *slit(RNAi)* encaja perfectamente con una función de Slit como una señal repelente al crecimiento de los tejidos en la línea media (Cebrià et al., 2007). Sorprendentemente, el fenotipo generado al inhibir el receptor

de *Slit*, *robo*, no fenocopia el de las planarias *slit(RNAi)*. Aunque animales *robo(RNAi)* presentan defectos en la morfogénesis del CNS, no parecen estar relacionados con el establecimiento del eje ML (Cebrià y Newmark, 2007; Cebrià et al., 2007), lo que sugiere que pueden existir otros receptores Robo no identificados o que *Slit* puede funcionar en ese contexto de forma independiente a Robo (Cebrià y Newmark, 2007).

admp también se ha relacionado no sólo con el establecimiento del eje DV, sino también con el ML (Gaviño y Reddien, 2011). Como he mencionado anteriormente, *admp* se expresa en la línea media ventral y su inhibición impide la regeneración lateral de las planarias tras un corte longitudinal. Tras cortes transversales, los blastemas anterior y posterior regeneran indentados en la línea media, fenotipo también observado al inhibir *bmp* (Gaviño y Reddien, 2011; Molina et al., 2007; Molina et al., 2011; Reddien et al., 2007). Finalmente, la inhibición de *admp* durante la homeóstasis normal de la planaria también afecta a la expresión ventral de *slit*, ya que en lugar de permanecer confinada a la línea media, aparecen células expresando *slit* a lo largo de todo el eje ML (Gaviño y Reddien, 2011). Esto sugiere, una vez más, una relación entre el establecimiento de la axialidad, en este caso el eje DV, con la línea media.

Toda esta información generada sugiere que los mecanismos encargados de aportar información posicional están expresados de manera constitutiva en la planaria. Es decir, que están siempre activos no sólo para garantizar la identidad del tejido regenerante, sino en el organismo intacto para asegurar un correcto reemplazo celular durante la homeóstasis (Almuedo-Castillo et al., 2012; Reddien, 2011). Encuadrado dentro de este concepto de expresión constitutiva, Witchley y colaboradores identifican que son las células del plexo muscular subepidermal las que expresan todos estos genes de control posicional secretables, a los que llaman PCGs. Además, estas células musculares expresan a la vez múltiples PCGs encargados de establecer ambos, el eje AP y DV. Este estudio revela que las células musculares tendrían una función dual en contracción muscular y en establecer un sistema de coordenadas de información posicional en el organismo adulto de la planaria. Además, estas células musculares son capaces de cambiar su perfil de expresión de PCGs en respuesta a la amputación sin necesidad de

los neoblastos. Esto les lleva a proponer un modelo muy atractivo, en el que la regeneración y el recambio tisular de la planaria dependen de la capacidad de estas células musculares de variar dinámicamente su perfil de expresión de PCGs e instruir a los neoblastos para adquirir la identidad correcta (Witchley et al., 2013) (Figura 30).



Witchley et al., 2013

Figura 30: El plexo muscular de la planaria actúa como un sistema de coordenadas de información posicional. La expresión de los PCGs en las células musculares del plexo subepidermal se encargaría de especificar la identidad de nuevas células durante el recambio tisular. Además, tras la amputación, las células musculares cambian su perfil de expresión de PCGs para instruir la identidad que debe adquirir el tejido regenerante (Witchley et al., 2013).

Por último, otra idea que se hace muy evidente es la estrecha relación de todos estos genes encargados de establecer la axialidad (AP, DV y ML) con la línea media. Al igual que durante el desarrollo embrionario de vertebrados, la línea media funcionaría como un organizador común e integrador para asegurar la coordinación de la información posicional en los tres ejes espaciales.

3. Los órganos de la planaria y su regeneración

3.1. El sistema nervioso

El sistema nervioso de las planarias consiste básicamente en un cerebro anterior compuesto por dos ganglios cefálicos (“cephalic ganglia” o CG) unidos por una comisura anterior y localizados en una posición más dorsal en relación a los dos cordones nerviosos ventrales (“ventral nerve cords” o VNCs) sobre los que descansan (Cebrià, 2007). A lo largo de los VNCs, se disponen de manera regular clústers de células que forman pequeños ganglios, desde los que proyectan comisuras transversales que conectan los dos VNCs así como proyecciones laterales hacia los bordes de la planaria (Cebrià, 2007) (Figura 31). Se han identificado otros plexos nerviosos como el plexo subepidérmico, el plexo alrededor del sistema digestivo, los plexos de la faringe y el de los órganos sexuales de planarias sexuadas (Baguñà y Ballester, 1978; Cebrià, 2007).

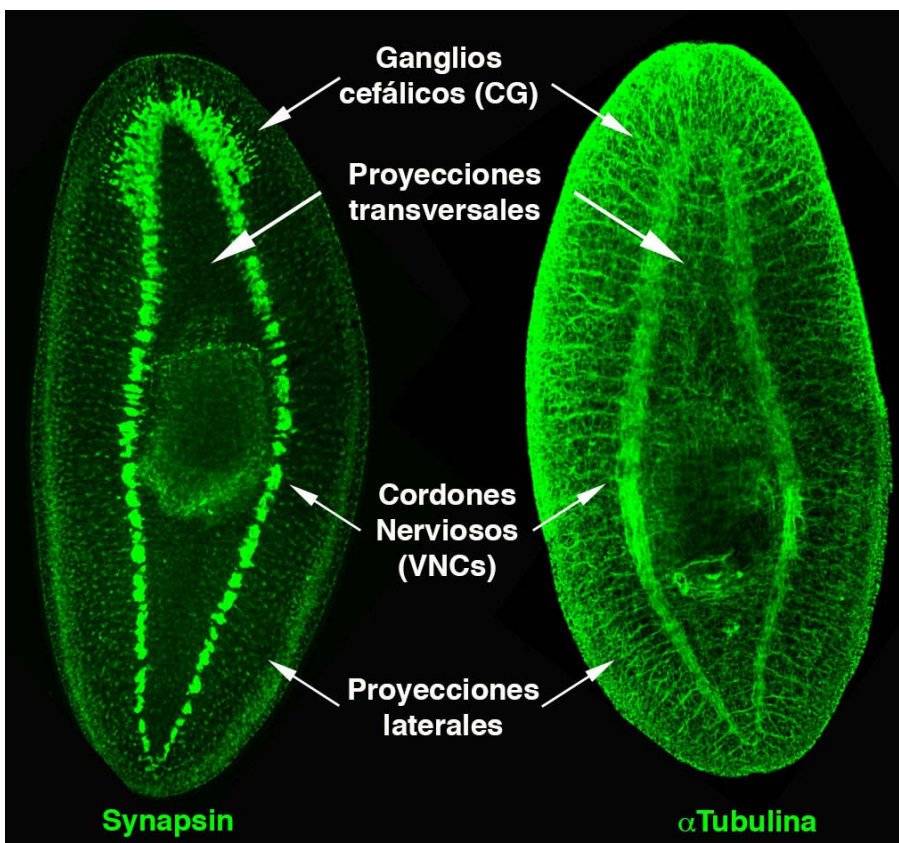
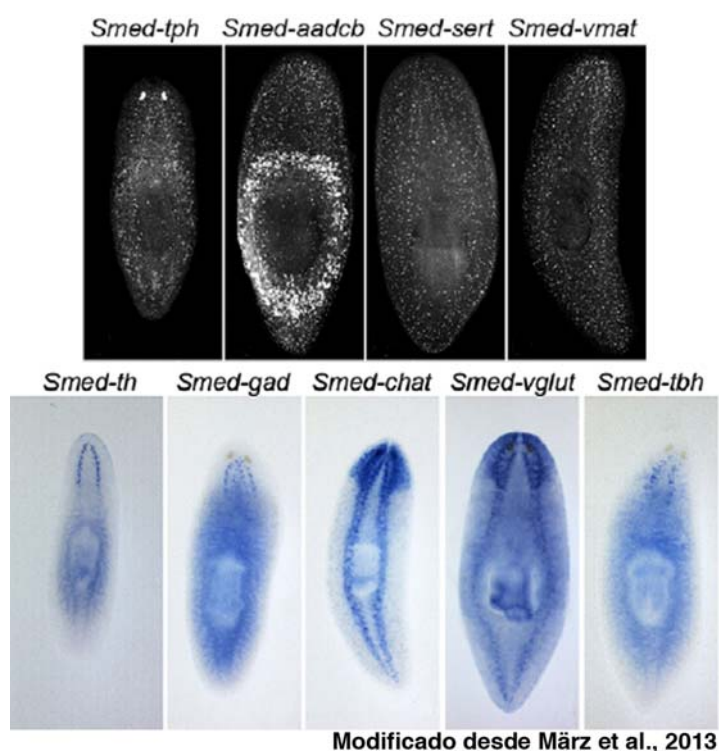


Figura 31: Sistema Nervioso Central en planarias. Análisis del CNS por inmunohistoquímica con anti-Synapsin que marca las sinapsis neuronales y anti- α Tubulina que marca las proyecciones axonales de todas las neuronas.

El estudio del sistema nervioso en planarias revela que a pesar de su simple ultraestructura, posee muchos grados de complejidad, no sólo a nivel morfológico, sino también a nivel celular y molecular (Cebrià, 2007). En el sistema nervioso de planarias se detectan distintas subpoblaciones neuronales distribuidas de manera diferencial a lo largo de los CG y los VNCs (Cebrià, 2008; Fraguas et al., 2012; März et al., 2013) (Figura 32). Entre ellas estarían: i) neuronas serotoninérgicas que son reconocidas por el anticuerpo 5-HT y expresan ortólogos de genes que codifican para una enzima de la síntesis de serotonina (*tph*), una proteína transportadora de serotonina (*sert*), un aminoácido descarboxilasa (*aacb*) y una proteína transportadora vesicular monoamina (*vmat*) (Cebrià, 2008; März et al., 2013; Nishimura et al., 2007b); ii) neuronas dopaminérgicas, que expresan ortólogos de genes que codifican para una enzima de la síntesis de la dopamina (*th*) y para proteínas que también están presentes en neuronas serotoninérgicas (*aacb* y *vmat*) (Fraguas et al., 2012; März et al., 2013; Nishimura et al., 2007a); iii) neuronas glutamatérgicas que expresan ortólogos de genes que codifican para receptores de glutamato y una proteína transportadora de glutamato (*vglut*) (Cebrià et al., 2002b; März et al., 2013); iv) neuronas octopaminérgicas que expresan el ortólogo del gen que codifica para una enzima de la síntesis de la octopamina (*tbh*) (Fraguas et al.,



Modificado desde März et al., 2013

Figura 32: El Sistema Nervioso de planarias consta de una gran variedad de tipos neuronales regionalizados. Expresión de los distintos tipos neuronales por FISH y WISH (März et al., 2013).

2012; Nishimura et al., 2008a); v) neuronas gabaérgicas, que expresan el ortólogo del gen que codifica para una enzima de la síntesis de GABA (*gad*) (März et al., 2013; Nishimura et al., 2008b) y vi) neuronas colinérgicas, que expresan el ortólogo del gen que codifica para una enzima de la síntesis de la acetilcolina (*chat*) (März et al., 2013) (Figura 32). Además también existe una gran variedad de poblaciones neuronales en las que se detectan de manera diferencial distintos neuropéptidos como la allostatin, una FMRFamida y un neuropeptide F (NPF), entre otros (Cebrià, 2008; Collins et al., 2010).

El cerebro de planarias presenta también un alto grado de compartimentalización molecular, no sólo en relación a las distintas poblaciones neuronales, sino también en relación a los distintos dominios de expresión de genes que se encargan en otras especies de especificar distintas regiones cerebrales. Ortólogos de genes de la familia *otx* se expresan de manera diferencial a lo largo del eje ML del cerebro: *otp* se expresa en las ramas laterales del cerebro, mientras que *otxB* lo hace en la región central y *otxA* en la región más medial y en los ojos (Iglesias et al., 2011; Umesono et al., 1999) (Figura 33). El ortólogo de Six, *six-3*, se expresa también en las ramas laterales y el de *pax6*, en la zona central del cerebro (Pineda et al., 2000; Pineda et al., 2002). Así mismo, uno de los parálogos de *wnt11*, *wnt11.6*, (previamente conocido como *wnt-A*) y un receptor Frizzled (*fz-A*) se expresan en el dominio posterior y en el dominio anterior del cerebro respectivamente (Iglesias et al., 2011; Kobayashi et al., 2007) (Figura 33).

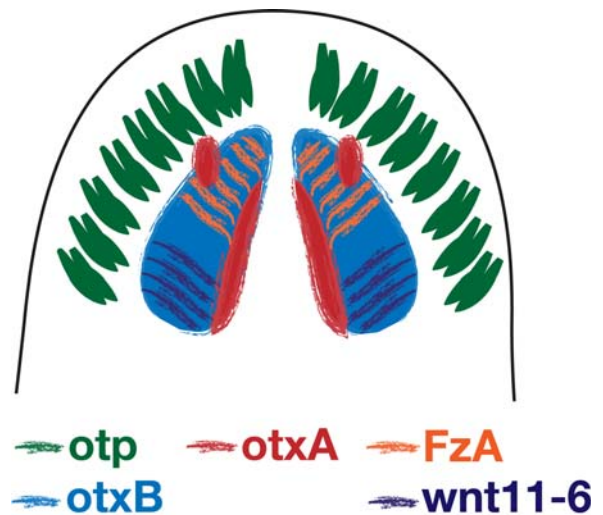


Figura 33: Esquema de algunos de los dominios de expresión génica en el cerebro de planaria.

El sistema visual de la planaria consiste en dos órganos fotorreceptores, los ojos, cuyas neuronas proyectan axones ipsilateralmente para contactar con la región más medial del cerebro y contralateralmente para conectar los dos ojos entre sí y formar el quiasma óptico. Todo el entramado neuronal del sistema visual expresa arrestina (VC1), una proteína involucrada en la transmisión de estímulos nerviosos generados por hormonas o neurotransmisores (Sakai et al., 2000).

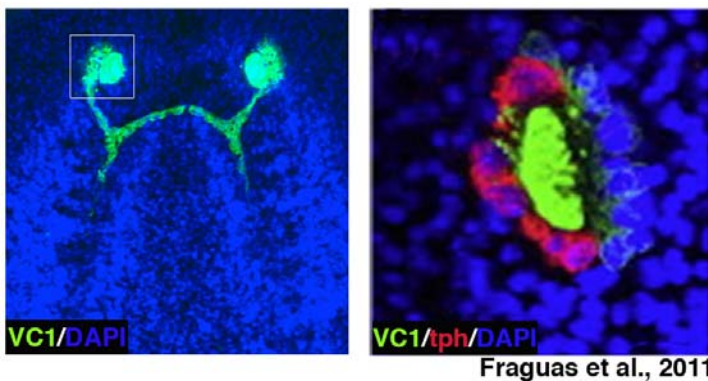


Figura 34: Sistema visual de la planaria. Inmunohistoquímica con anti-arrestina (VC1) que reconoce las células fotorreceptoras y FISH de *tph* que se expresa en las células pigmentarias (Fraguas et al., 2011).

Los ojos de la planaria incluyen células pigmentarias a parte de neuronas fotorreceptoras rhabdoméricas (Lapan y Reddien, 2011; Okamoto et al., 2005) (Figura 34). Dentro de las poblaciones celulares que forman estas dos estructuras, pigmentaria y fotorreceptora, existe una gran

heterogeneidad basada en la expresión diferencial de genes, entre ellos pro-hormonas y *smad6/7-2*, en distintas subpoblaciones celulares (Collins et al., 2010; González-Sastre et al., 2012; Lapan y Reddien, 2012).

3.1.1. Regeneración del sistema nervioso

La singularidad de la planaria es que a pesar de la relativa complejidad de su CNS, es capaz de regenerarlo *de novo*, estructural y funcionalmente, a partir de cualquier fragmento y en sólo unos días (Figura 35).

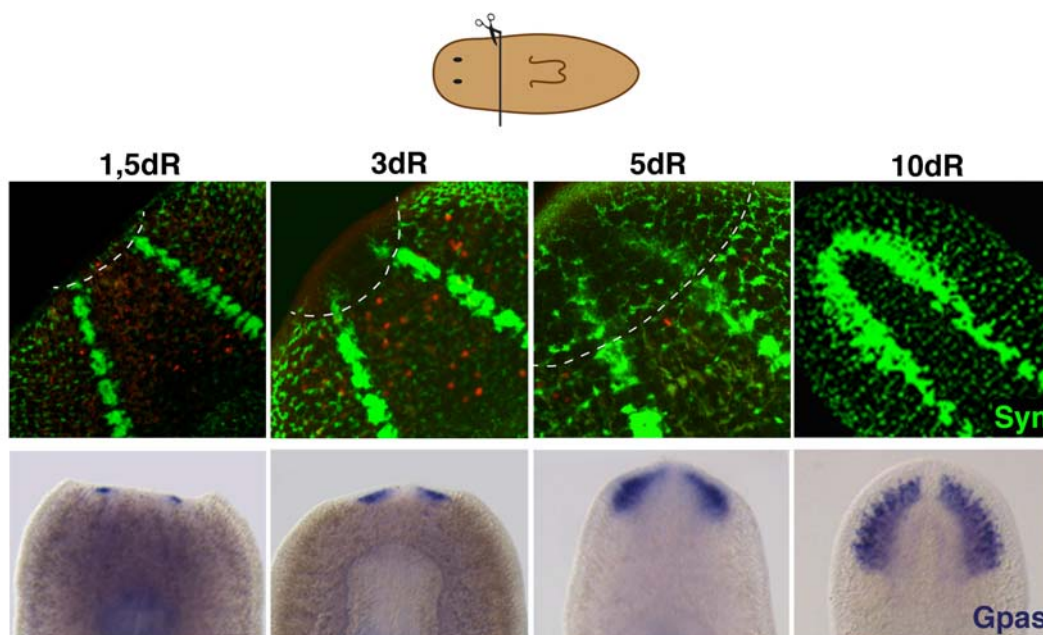


Figura 35: Secuencia temporal de la regeneración del cerebro en planarias. Inmunohistoquímica con anti-Synapsin que marca todos los tejidos nerviosos y WISH de *Gpas*, que se expresa en las ramas cefálicas.

Dos modelos se han propuesto para la regeneración del cerebro tras una amputación de la región anterior. El primero, propuesto por Reuter y colaboradores, basándose en el análisis de la regeneración de neuronas serotoninérgicas (positivas para 5-HT), sugiere que hay dos fases principales; en la primera (1-2 días de regeneración, dR), en la que las proyecciones de los VNCs preexistentes crecen contralateralmente cruzando la línea media y formando lo que será la comisura que une los dos CG. Esta comisura servirá de soporte para la diferenciación de neuronas de los CG durante la segunda fase, que establecerán conexiones con los VNCs preexistentes para permitir el crecimiento del cerebro (3-5 dR) (Reuter et al., 1995). El segundo, propuesto más tarde por Cebrià y colaboradores a partir del análisis de la regeneración de las sinapsis neuronales (positivas para Synapsin) y la expresión de marcadores de los primordios cerebrales, consta de tres

fases; en la primera, los primordios del cerebro se formarán dentro del blastema regenerante, aislados e independientemente de los VNCs preexistentes (1-2 dR). Durante la segunda fase estos VNCs proyectarán hacia los primordios cerebrales para integrarlos. En esta fase también se producirá el restablecimiento de las conexiones nerviosas (2-3 dR). La recuperación funcional del cerebro según este modelo tendrá lugar más tarde durante la tercera fase (4-5 dR) (Cebrià et al., 2002c). Básicamente, la diferencia entre los dos modelos es si son las proyecciones de los VNCs las que determinan la posición de los primordios cerebrales o si son estos los que aparecen en una posición paralela a los VNCs debido a que el blastema posee una identidad ML intrínseca. La falta de marcadores específicos para las proyecciones de los VNCs y para progenitores de los primordios cerebrales hace imposible declinarse por un modelo u otro. Recientemente, Fraguas y colaboradores, basándose en el análisis de la regeneración de varias poblaciones neuronales, proponen, a mi entender, un modelo intermedio; los primordios cerebrales se formarían durante la primera fase, antes de que los VNCs preexistentes proyecten para formar la comisura (1 dR). Mas tarde se formaría la comisura, aparentemente, a partir de proyecciones de los primordios y no de los VNCs (2-3 dR) (Fraguas et al., 2012). En este nuevo trabajo se puede observar que aunque la regeneración de los primordios cerebrales antecede a la formación de la comisura, éstos siempre regeneran en contacto con los VNCs preexistentes, y no de manera aislada en el blastema, lo que sugiere que son las proyecciones de estos las que determinarán la posición ML de los futuros CG.

Varios genes necesarios para la correcta regeneración del CNS se han descrito en planarias:

- Algunos de ellos se encuadran dentro del grupo conocido como “axon guidance cues” (señalización del guiaje de axones), entre los que se encuentran Netrins, Slit, Wnts, Semaphorins y Ephrins, entre otros. Estas moléculas secretables se encargan de guiar (atraer o repeler) la migración neuronal y el crecimiento de los axones durante el desarrollo de muchos organismos y por lo tanto, de diseñar el ensamblado del circuito nervioso. En planarias se han encontrado ortólogos de Netrins, receptores de Netrins, Slit, su putativo receptor Robo y Wnt5 (Adell et al., 2009; Cebrià y Newmark, 2005; Cebrià y Newmark, 2007; Cebrià et al., 2007; Marsal et al., 2003). Las Netrins y sus receptores se expresan a lo largo de los VNCs y en la región más medial de los CG. Su inhibición genera la pérdida de la conformación de los VNCs, en los que los cuerpos

neuronales y sus proyecciones se disponen aberrantemente. La función conservada de Netrins es la de actuar como señales atrayentes necesarias para que las proyecciones nerviosas crucen la línea media. El patrón de expresión de *netrins* no está relacionado con la línea media en planarias, pero sí que parece conservar su función de ordenar el entramado nervioso (Cebrià y Newmark, 2005). *wnt5* está expresado desde el dominio más lateral del CNS hasta los bordes laterales de la planaria y su RNAi genera la expansión lateral del CNS regenerante (Adell et al., 2009; Gurley et al., 2010; Marsal et al., 2003). La función de Slit ya la he introducido en el apartado de establecimiento del eje ML, y aunque no parece que este Robo sea el verdadero receptor de Slit, Slit y Wnt5 parecen estar actuando como señales repulsivas que impiden la regeneración del sistema nervioso hacia los dominios donde son secretados.

- La función de elementos pertenecientes a una familia de moléculas de adhesión de células nerviosas (CAM y DSCAM) (Fusaoka et al., 2006), así como la de los involucrados en la “clathrin-mediated” endocitosis (Inoue et al., 2007) son también esenciales para la correcta regeneración del CNS.
- Más recientemente se han identificado genes necesarios para la especificación de los neoblastos hacia células nerviosas, como *runt-1* (Wenemoser et al., 2012) y *follistatin* (Roberts-Galbraith y Newmark, 2013). Así mismo, *pitx* actúa como un “selector gene” para la especificación de neuronas serotoninérgicas (Currie y Pearson, 2013; März et al., 2013).
- La diferenciación del cerebro debe de estar restringida a regiones con identidad anterior. El mecanismo por el que se garantiza esta restricción es *nou darake*, un “FGF receptor-like” expresado en el CNS. Al inhibirlo, la diferenciación de tejidos cerebrales se expande más allá de la región de la cabeza (Cebrià et al., 2002a). *Wnt11-6*, por su parte, está limitando el crecimiento de la región posterior del cerebro (Adell et al., 2009; Kobayashi et al., 2007).
- Debido a que la regeneración del cerebro y la de regiones anteriores está íntimamente relacionada, todos los genes responsables de la formación del polo anterior descritos previamente, afectarán, en consecuencia, a la regeneración del cerebro.

Es muy interesante que hasta ahora no se hayan identificado mecanismos implicados en la diferenciación inicial de los primordios cerebrales (Cebrià, 2007). Así mismo, Iglesias y colaboradores observan que estos primordios se diferenciarán aunque la identidad del blastema sea posterior en un animal *APC* o *axins(RNAi)*. Estos primordios se diferencian

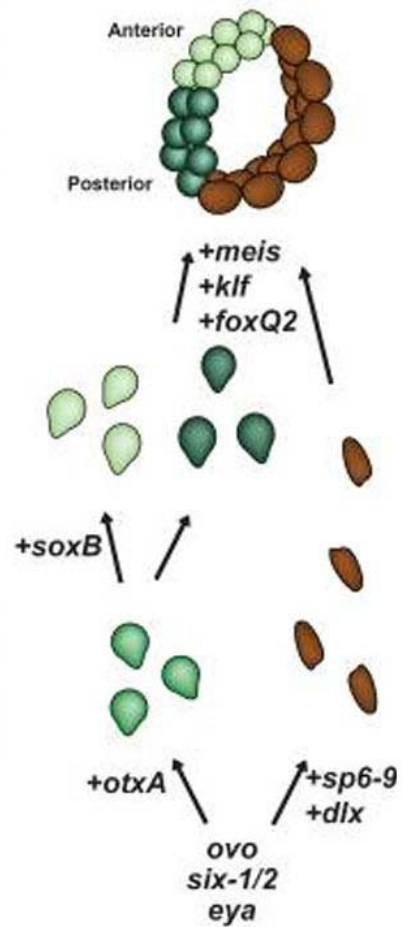
en el tejido preexistente en contacto con el blastema, pero nunca crecen dentro de él, ya que la identidad del blastema es posterior y no anterior. Esta observación lleva a sugerir que algunos neoblastos pueden estar determinados por defecto a diferenciarse inicialmente en primordios cerebrales, independientemente de la identidad del blastema. El contexto anterior, sin embargo, sí que será necesario para que la diferenciación y crecimiento del cerebro se complete (Iglesias et al., 2011).

3.1.2. Regeneración del sistema visual

A partir de un análisis transcriptómico específico de los ojos, Lapan y Reddien han completado lo que se sabía sobre la red genética encargada de la regeneración de los ojos. Los progenitores del ojo aparecerán en el blastema anterior 2 días tras la amputación y su especificación depende de la coexpresión de *six-1/2*, *eya* y *ovo*. La inhibición de cualquiera de estos tres genes impide la regeneración del ojo (Lapan y Reddien, 2012; Mannini et al., 2004; Pineda et al., 2000).

Estos progenitores estarían también presentes en una zona cercana al ojo en animales intactos para asegurar el reemplazamiento celular durante la homeóstasis (Lapan y Reddien, 2012). La expresión adicional de *otxA* restringirá el destino de estos progenitores hacia neuronas fotorreceptoras y la coexpresión de *sp6-9* y *dlx*, hacia células pigmentarias (Lapan y Reddien, 2011; Lapan y Reddien, 2012). Así mismo, ortólogos de *soxB*, *meis*, *klf* y *foxQ2* son necesarios para la diferenciación terminal de las células fotorreceptoras (Lapan y Reddien, 2012) (Figura 36). *pbx*, un gen necesario para al regeneración de los polos, tiene a su vez una función independiente de esta última en la regeneración de los ojos (Chen et al., 2013).

Aunque la red génica encargada de la regeneración de los ojos en planaria está muy conservada, otros componentes elementales para la diferenciación del ojo en otras especies como Pax6, Dachhund y Six3, no lo son en planaria (Martín-Durán y Romero, 2011; Martín-Durán et al., 2012; Saló et al., 2002). Esto parece apoyar la idea de



Lapan y Reddien. 2012

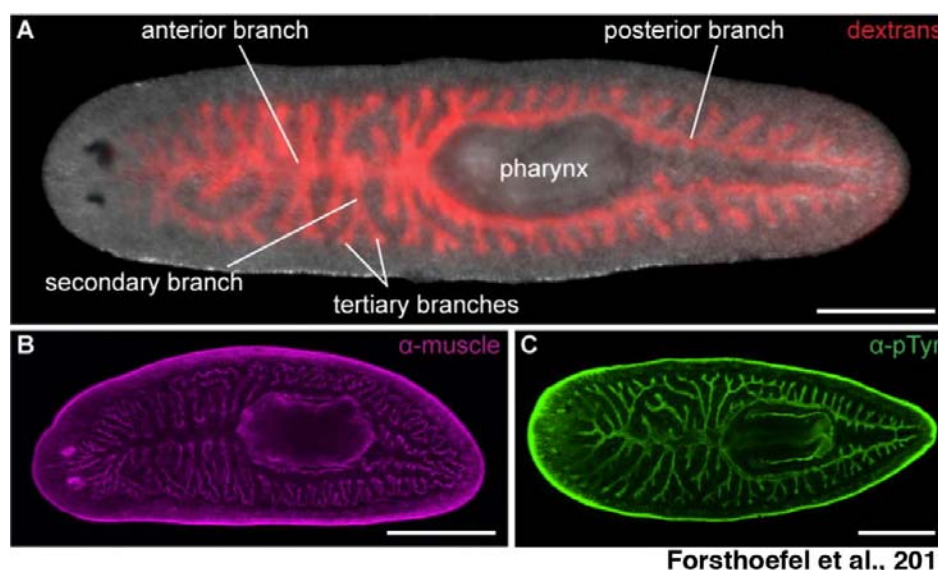
Figura 36: Esquema de la red genética encargada de la diferenciación de los ojos. (Lapan y Reddien, 2012).

que no existen genes ancestrales para la diferenciación de los ojos, aunque no se pueden descartar pérdidas secundarias específicas.

Los axones visuales también necesitan moléculas que les guíen el camino de diferenciación y proyección. De hecho, todos los sistemas descritos anteriormente como esenciales para generar el circuito nervioso del cerebro, también estarán encargados de generar el circuito visual (Cebrià y Newmark, 2005; Cebrià et al., 2007).

3.2. Sistema Digestivo

Las planarias poseen un sistema digestivo ciego compuesto por tres ramas principales, una anterior y dos posteriores que conectan con la faringe y que a su vez se ramifican en ramas secundarias, terciarias y cuaternarias (Forsthoefel et al., 2011) (Figura 37). El intestino es el responsable de la ingesta y digestión de alimentos, así como de la amplia distribución de los metabolitos adquiridos, funcionando en parte como sistema vascular (Brösnted, 1969; Forsthoefel et al., 2011). El epitelio del intestino o gastrodermis consiste en una monocapa de células epiteliales rodeadas por lámina basal y musculatura (Bueno et al., 1997; Garcia-Corrales y Gamo, 1988). Existen dos tipos de células intestinales, los fagocitos absorbentes que digieren los nutrientes y las células calciformes (“globet cells”) secretoras de enzimas digestivas.



Forsthoefel et al., 2011

Figura 37: Sistema digestivo de planarias. (A) Imagen que muestra el interior de las distintas ramas del digestivo marcado con dextrans. (B y C) Inmunohistoquímica con un anticuerpo que reconoce la musculatura de alrededor del digestivo y anti-pTyr que marca el interior del digestivo. (Forsthoefel et al., 2011)

3.2.1. Regeneración del sistema digestivo

La regeneración y “remodeling” del digestivo han recibido poca atención en planarias. Sin embargo, Forsthoefel y colaboradores han sabido destacar la importancia de su estudio para analizar los mecanismos celulares que coordinan la respuesta de las células madre y la organogénesis. Gracias a la capacidad que tienen los fagocitos de retener moléculas marcadas y al análisis de pulso-caza con análogos de DNA (BrdU), han descrito detalladamente el crecimiento y la regeneración del sistema digestivo *in vivo*. Durante el crecimiento debido a la ingesta de alimento, las células intestinales se diferencian uniformemente para formar nuevas ramas. La regeneración tras la amputación comprenderá la masiva diferenciación *de novo* de nuevas células intestinales en el blastema, así como el “remodeling” de las ramas preexistentes para integrar los tejidos regenerantes y regenerar un órgano proporcionado y simétrico (Forsthoefel et al., 2011). Los neoblastos localizados alrededor de las ramas del digestivo son la única fuente de diferenciación de las células intestinales. La eliminación de los neoblastos tras la irradiación no sólo bloquea la regeneración del digestivo, sino también el “remodeling” del tejido preexistente. Esta observación confirma que la diferenciación de nuevas células a partir de los neoblastos y el recambio celular necesitan estar coordinados para que se produzca el “remodeling” (Forsthoefel et al., 2011). No sólo no se produce el recambio celular por parte de nuevas células, sino que tampoco se observa que haya muerte celular en el intestino, aún cuando se ha descrito que la apoptosis tiene lugar cuando los neoblastos han sido eliminados (Pellettieri et al., 2009). Aunque a falta de un estudio exhaustivo del papel de la apoptosis durante el recambio tisular del intestino, esto podría estar sugiriendo que la falta de nuevas células para reemplazar las eliminadas, inhibiría también que estas células fueran destinadas a morir por apoptosis.

Forsthoefel y colaboradores, a partir de un análisis transcriptómico de fagocitos aislados, han identificado los primeros genes responsables específicamente de la regeneración del sistema digestivo: i) Un ortólogo de *cerS1*, una ceramida sintetasa, que se expresa específicamente en las ramas intestinales y es necesaria para la diferenciación de los fagocitos; ii) algunos reguladores del citoesqueleto (Actin, Myosin, Tropomyosin, Cofilin, Arp2/3, Rho-GTPasas, EVL y F-actin) que parecen estar implicados exclusivamente en mantener la integridad del intestino. Entre ellos, *tropomyosin-1* y *RhoA* son necesarios para la ramificación del intestino respectivamente durante el “remodeling” o la regeneración, y por último, iii) un ortólogo del factor de transcripción “homeodomain”,

nkx-2.2, expresado específicamente en células postmitóticas de las ramas del digestivo, que también es necesario para su diferenciación. Lo más interesante, es que inhibir *nkx-2.2* también tiene un efecto general en la atenuación de la proliferación de los neoblastos. Este gen no es necesario para mantener la viabilidad o migración de los neoblastos, ni para la captación y almacenamiento de alimento por parte de los fagocitos, por lo que la reducción de la proliferación no es una consecuencia del papel de *Nkx-2.2* en ninguno de los procesos descritos anteriormente. *nkx-2.2*, por lo tanto, es el primer factor de transcripción descrito que está expresado exclusivamente en el digestivo y es necesario para señalar la proliferación de los neoblastos. A su vez, sugiere que los fagocitos juegan un papel importante en la regulación del “stem cell-niche” de los neoblastos situados alrededor del digestivo (Forsthoefel et al., 2012).

Así mismo, la inhibición de elementos de la vía Wnt (*β-catenin*, *APC* y *wnt11-2*), de *slit* y de algunas *inexins* afectan también a la polaridad, morfogénesis y/o ramificación del intestino. Sin embargo, debido a la función más generalizada de estos elementos en el control de la polaridad, es difícil discernir si realmente tienen una función directa en la diferenciación y ramificación del digestivo (Forsthoefel et al., 2011).

3.3. Sistema Excretor

El sistema excretor de planarias consiste en un conjunto de protonefridios distribuidos ampliamente a lo largo de todo el animal. Esta red de protonefridios está situada bajo la capa muscular que envuelve el parénquima y es reconocida por el anticuerpo anti- α Tubulina (Rink et al., 2011). Se han descrito tres tipos celulares diferentes, tanto a nivel ultra-estructural como molecular: las células más distales serían las tubulares no-ciliadas, seguidas por las tubulares ciliadas y por las más proximales, las células flamígeras o “flame cells”, unas células cilíndricas también ciliadas situadas en el extremo de los túbulos (McKanna, 1968; Rink et al., 2011). La complejidad morfológica de los protonefridios se ve apoyada por la diversidad de genes que expresan los distintos tipos celulares (Rink et al., 2011; Scimone et al., 2011) (Figura 38). Aunque la descripción celular difiere un poco en las dos publicaciones, a mi entender, las denominadas “tubule-

associated cells” corresponderían con las células distales tubulares no-ciliadas ya que comparten la expresión de la enzima anhidrasa carbónica CAVII-1(Figura 38).

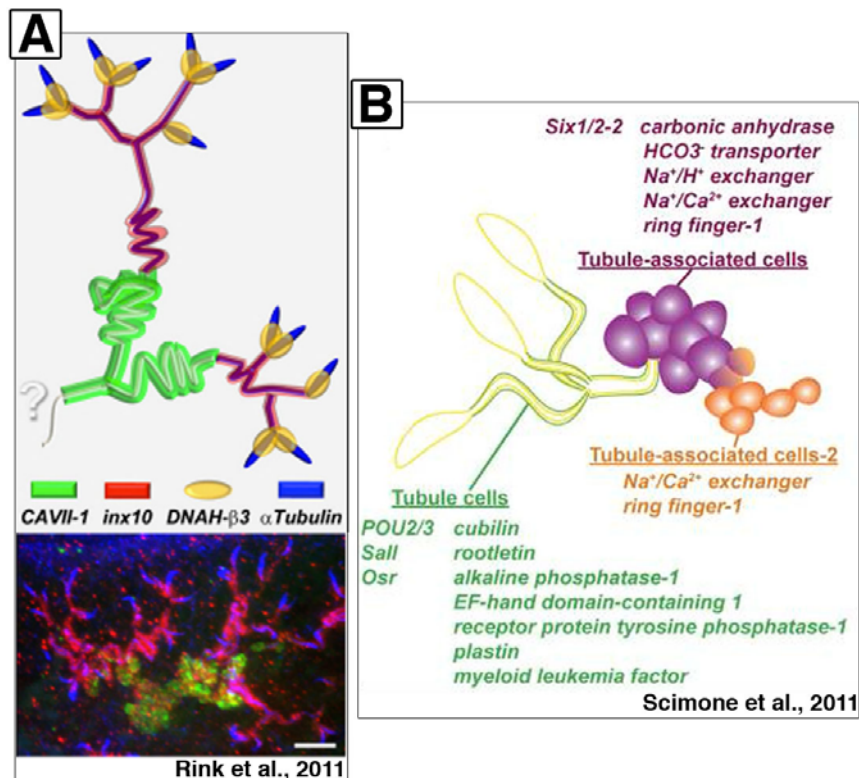


Figura 38: Esquemas de la expresión génica de los distintos tipos de células excretoras. (A) Se representan las células distales tubulares no-ciliadas (verde), las tubulares ciliadas (rojo) y las flamíferas (amarillo). (Rink et al., 2011; Scimone et al., 2011).

3.3.1. Regeneración del sistema excretor

Rink y colaboradores describen la secuencia temporal de la regeneración de los protonefridios a partir de una estructura que se forma durante el primer día de regeneración (“Day 1”) y que denominan proto-túbulo (expresa los marcadores más proximales, *DNAH-β3* e *inx10*). A los 3dR (“Day 3”) comienzan a formarse las células más distales, las tubulares no-ciliadas (expresan *CAVII-1*), a la vez que la ramificación del proto-túbulo empieza a ser visible. Más tarde, las ramas comienzan a alargarse hacia el blastema y a los 6dR (“Day 6”), el órgano excretor ya está completamente regenerado (Figura 39). Este modelo sugiere que la regeneración de los protonefridios ocurre a partir de la formación *de novo* del proto-túbulo y no por crecimiento y elongación de los túbulos preexistentes (Rink et al., 2011).

El receptor de un epidermal growth factor, EGFR-5, es esencial para la ramificación y extensión de las ramas durante la regeneración y crecimiento del sistema excretor de

planarias. Así mismo, es requerido para la diferenciación de las células flamígeras y para la filtración de los fluidos, ya que inhibir *egfr-5* genera edemas en el organismo RNAi (Rink et al., 2011).

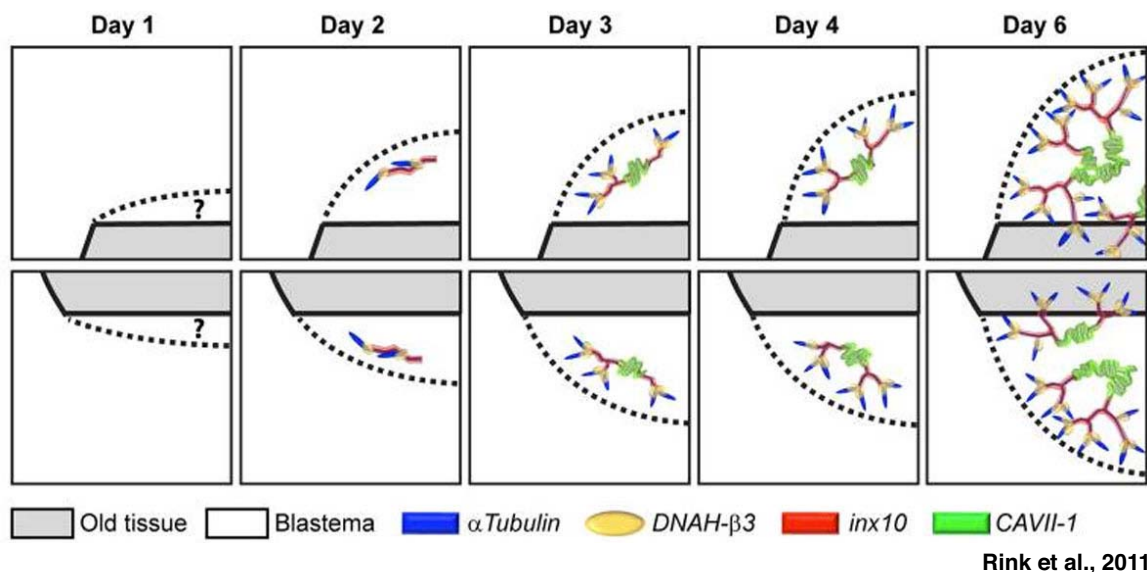


Figura 39: Esquema de la secuencia de regeneración del sistema excretor. (Rink et al., 2011).

Scimone y colaboradores describen un programa transcripcional para la diferenciación del sistema excretor (Figura 40). En su modelo, los neoblastos comienzan a especificarse hacia precursores de los protonefridios al expresar *Six1/2-2*, *POU2/3*, *Sall*, *Eya* y *Osr*. Al mantener la expresión de *POU2/3*, *Sall* y *Osr*, se diferenciarán hacia células tubulares ciliadas y expresarán marcadores típicos de ese tipo celular como *cubilin* y *rootletin*. Las células tubulares no-ciliadas se diferenciarán al mantener la expresión de *Six1/2-2* y empezar a expresar *CAVII-1*. *Six1/2-2*, *POU2/3*, *Eya* y otro gen que no se expresa en los protonefridios, *Hunchbak*, son necesarios para la diferenciación de los protonefridios pero no del resto de estructuras ciliadas de la planaria. *Sall* se requiere para generar el balance

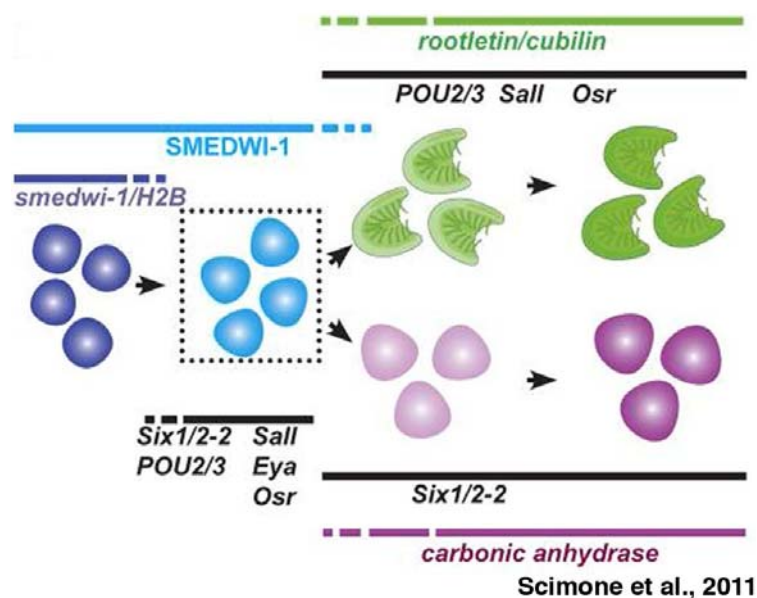


Figura 40: Esquema de la red génica encargada de la diferenciación de los protonefridios. (Scimone et al., 2011).

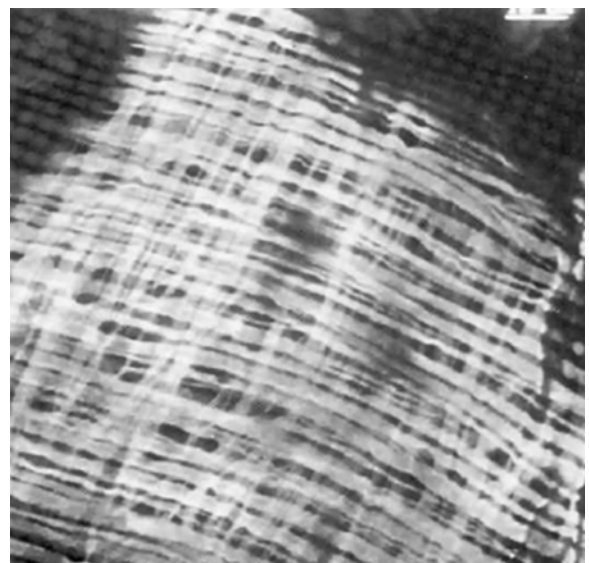
de diferenciación entre los dos tipos celulares del túbulo.

Por último, el factor transcripcional efector de la vía Hippo, Yorkie, también es necesario para la ramificación de los túbulos y la diferenciación de las células flamígeras, aunque no para la especificación de los progenitores de los protonefridios. La inhibición de *yorkie*, genera, entre otras cosas, la aparición de edemas (de Souza et al., resultados no publicados; Lin y Pearson, 2014).

En definitiva, el estudio de la regeneración y el “remodeling” de órganos alternativos como el digestivo o el excretor es muy informativo, no sólo en el contexto de la regeneración del órgano en particular, sino también porque representan nuevos escenarios en los que estudiar *in vivo* la interacción de procesos como el ensamblaje, la ramificación y la morfogénesis durante la regeneración de órganos epiteliales.

3.4. Sistema Muscular

La red muscular de la planaria está organizada en capas subepidermales de fibras musculares: la más externa situada justo debajo de la lámina basal está formada por fibras circulares, la intermedia por fibras diagonales y la más interna por fibras longitudinales (Figura 41). Estas dos capas musculares, dorsal y ventral, están conectadas por otras fibras orientadas dorso-ventralmente condensadas en los bordes anterior, posterior y laterales de la planaria. La naturaleza del músculo, estriado o liso parece no estar clara, y se propone que es una mezcla de miocitos indiferenciados con propiedades de los dos tipos musculares (Cebrià et al., 1996).



Cebrià et al., 1996

Figura 41: Red muscular de la planaria. Imagen de inmunohistoquímica con TMUS-13 que reconoce una MHC. (Cebrià et al., 1996).

3.4.1. Regeneración del sistema muscular

Las células musculares son las primeras en responder a la herida, ya que su contracción permite que la herida se cierre inmediatamente. Después, la red de fibras musculares comenzará a regenerar y organizarse dentro del blastema. Cebrià y colaboradores analizan este proceso a través de la observación de la actina F marcada con faloidina y de una myosin (myosin II heavy chain, MHC) marcada por un anticuerpo diseñado específicamente en planarias, el TMUS-13. A los 3 días de regeneración, una red desorganizada de fibras se hace visible en el blastema, que más tarde comienza a restablecer el patrón de las distintas capas musculares a la vez que se ve aumentada la densidad de las fibras.

El reemplazo de las células musculares de la faringe también ha sido objeto de estudio ya que no hay neoblastos proliferando dentro del órgano, sino en la base de éste. El análisis de una MHC que parece expresarse en miocitos en sus primeros estadios de diferenciación, revela que estos se encuentran ya dentro del órgano. Por lo tanto, los neoblastos han debido intercalarse en la capa muscular subepitelial de la faringe mientras están diferenciándose a miocitos para reemplazar las células musculares (Cebrià et al., 1999; Kobayashi et al., 1999). Este modelo de regeneración intercalar de la musculatura de la faringe coincide con el modelo propuesto recientemente para el intercambio de las células del tracto intestinal.

La composición y regeneración de la red muscular de la planaria ha captado poca atención durante los últimos años, a pesar de la clara relevancia de ésta como sustento y protección de todo el resto de tipos celulares, no sólo en el organismo adulto, sino también durante la formación del blastema (Cebrià et al., 1996). El descubrimiento realizado por Witchley y colaboradores de que el sistema muscular de la planaria sirve también como un eje de coordenadas de información posicional (Witchley et al., 2013) guarda una curiosa relación con este concepto de la musculatura como sustento .

4. “Remodeling”: recambio celular, crecimiento y decrecimiento

Tras la amputación, no sólo se produce la respuesta regenerativa para reemplazar las estructuras que faltan, sino que también los tejidos preexistentes deben remodelar paralelamente para integrar estas nuevas estructuras y generar un organismo proporcionado (Figura 42). La eliminación de células es clave para esta respuesta remodeladora e inhibir la inducción de la apoptosis en estos tejidos preexistentes impide que se produzcan los cambios necesarios para recuperar la proporcionalidad del organismo tras la amputación (Beane et al., 2013; Pellettieri et al., 2009).

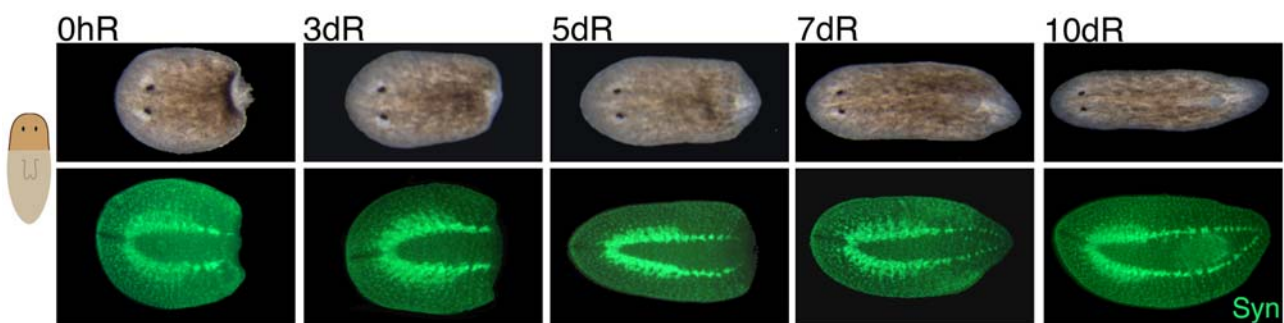


Figura 42: Secuencia temporal de la regeneración y “remodeling” de un fragmento cabeza. La formación del blastema viene acompañada por la reducción de la proporción del cerebro y el alargamiento del fragmento para integrar las nuevas estructuras regenerativas, como la faringe y la región posterior, y así generar un organismo proporcionado. Se muestran imágenes de animales *in vivo* y de inmunohistoquímica con el marcador pan-neural anti-Synapsin. hR, horas de regeneración; dR, días de regeneración Syn, synapsin.

Las planarias también son capaces de crecer y decrecer dependiendo de la cantidad de nutrientes disponibles, y lo hacen manteniendo la funcionalidad, propiedades fisiológicas y proporcionalidad del organismo (Baguña et al., 1990). Se ha descrito que durante el decrecimiento, las planarias mantienen la subpoblación de neoblastos y su tasa de proliferación constantes, mientras que la apoptosis y la muerte celular por autofagia aumentan (Baguña, 1976; Baguña y Romero, 1981; González-Estévez et al., 2012a) (Pellettieri et al., 2009). González-Estévez y colaboradores realizan un estudio detallado de la dinámica temporal de estos cambios durante el proceso de decrecimiento. En este

estudio muestran que la proporción de neoblastos permanece constante durante 60 días de ayuno pero presenta un incremento a los 90 días de ayuno, mientras que la tasa proliferativa de estos neoblastos permanece constante. Así mismo, describen que la proporción de la progenie postmitótica de los neoblastos disminuye considerablemente durante los primeros 40 días de ayuno para permanecer constante y aumentar ligeramente a los 90 días de ayuno. Sin embargo, la proporción de tejidos diferenciados (nervioso y muscular) no varía considerablemente hasta los 90 días de ayuno, cuando específicamente la proporción de tejidos nerviosos aumenta. Por último, la muerte celular aumenta durante los primeros 20 días de ayuno, para volver a niveles basales entre 40-60 días y aumentar ligeramente otra vez a los 90 días de ayuno (Figura 43). La disminución de la proporción de la progenie postmitótica de los neoblastos sugiere que los niveles de diferenciación disminuyen, aunque no se ve reflejado en una disminución de la proporción de tejidos diferenciados. Así mismo, el hecho de que la muerte celular disminuya entre 40-60 días de ayuno, sugiere que el recambio celular también disminuye y que el organismo puede estar entrando en un estado latente para sobrevivir a largos periodos de ayuno. A su vez, a los 90 días de ayuno, cuando la planaria ya está cerca de alcanzar un tamaño crítico para su supervivencia, se producen cambios bruscos en la dinámica de todos los procesos descritos, a la vez que su capacidad de crecer ante el suplemento de alimento disminuye (González-Estévez et al., 2012a).

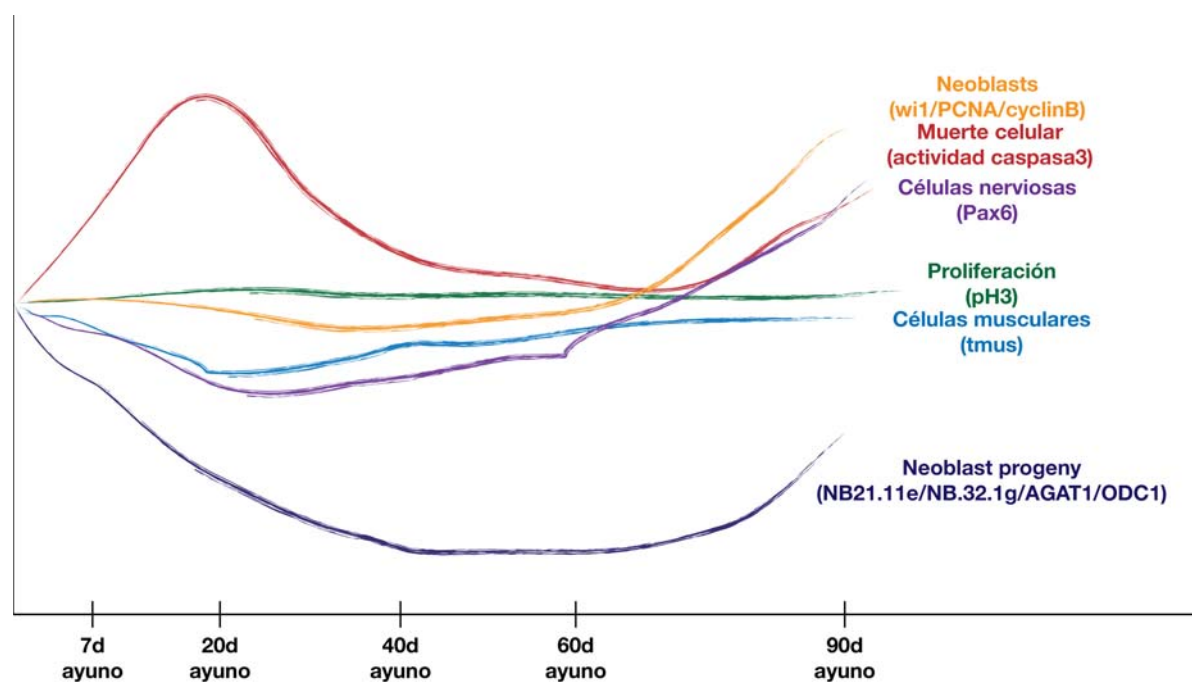


Figura 43: Dinámica temporal de los eventos moleculares durante el decrecimiento. Los valores del eje de coordenadas Y no son comparables para todos los procesos. Esta gráfica no representa valores numéricos, sólo las tendencias de los cambios a lo largo del ayuno mostradas en González-Estévez et al., 2012a.

El trabajo de Miller y colaboradores difiere significativamente con los trabajos descritos anteriormente, ya que sugiere que la tasa proliferativa de los neoblastos disminuye un 30% tras largos periodos de ayuno. Esta inconsistencia se explica por que en su análisis no compraran la tasa mitótica de un grupo de planarias a tiempo 0 y tras 4 semanas de ayuno, sino que su comparativa es entre dos grupos de planarias que han ayunado o han sido alimentadas durante 4 semanas. Por lo tanto, esta comparación no refleja diferencias de la tasa mitótica con respecto al ayuno, sino entre el ayuno y la alimentación.

Lo que es interesante de este trabajo es que demuestran que la señalización a través de insulina es necesaria para que la planaria crezca de tamaño tras ser alimentada. Previamente, se ha descrito que se produce un pico proliferativo 1 día tras la ingesta de alimento para después volver a una tasa basal proliferativa (Baguñà, 1976; González-Estévez et al., 2012a). La inhibición de un neuropéptido de cierta homología con la insulina (*insulin-like factor* o *ilf*) y de un homólogo de un receptor de insulina (*insulin/IGF receptor tyrosine kinase* o *inr-1*) impide que las planarias aumenten de tamaño tras la ingesta continuada de alimento y parece atenuar la tasa proliferativa de los neoblastos hasta en un 50%. Además, la señalización de insulina es necesaria para el crecimiento de los órganos sexuales en la cepa sexuada de *S. mediterranea*, por lo que también actuaría como factor de crecimiento de la línea germinal (Miller y Newmark, 2012).

Junto con la vía de señalización de la insulina, la vía TOR juega un papel altamente conservado en la regulación del crecimiento (Oldham y Hafen, 2003). En planarias, la vía TOR es necesaria para la activación de la proliferación (González-Estévez et al., 2012b; Peiris et al., 2012). Su regulación negativa por parte de SMG-1, un homólogo de una PIKK (phosphoinositide 3-kinase-related kinase) controla y restringe la amplitud de esta activación para evitar que se formen sobre-crecimientos (González-Estévez et al., 2012b). Así mismo, otros genes supresores de tumores relacionados con la vía TOR, como *p53* y *PTEN*, y Yorkie, el efector de la vía Hippo, también limitan y regulan esta respuesta proliferativa en planarias (Lin et al., 2014; Oviedo et al., 2008; Pearson y Alvarado, 2010).

La alta plasticidad homeostática de la planaria requiere que todos los mecanismos moleculares encargados de la biología de los neoblastos, el control de la muerte celular y el establecimiento de la polaridad estén activos de manera constitutiva. Por lo tanto, no es sorprendente que las vías encargadas de regular estos procesos durante la regeneración, lo sean también durante el recambio tisular. Por otro lado, también se han descrito varios

elementos necesarios exclusivamente durante la regeneración y no durante el recambio tisular. Dentro de este grupo estarían obviamente todos los genes expresados exclusivamente en las heridas. Entre ellos, Runt-1 demuestra tener un papel en la especificación de tejidos nerviosos exclusivamente durante la regeneración (Wenemoser et al., 2012). De manera similar, aunque su implicación durante el decrecimiento no se ha descrito, Follistatin es necesario para regular la respuesta proliferativa de los neoblastos exclusivamente tras la amputación de tejido que debe ser regenerado y no simplemente cuando se ha de reparar una herida en la que no ha habido pérdida de tejido (Gaviño et al., 2013).

En definitiva, aunque la mayoría de mecanismos moleculares están activos de manera constitutiva en la planaria, la naturaleza de la respuesta regenerativa hace que requiera de mecanismos adicionales; mientras que los cambios durante la homeostasis son graduales, la región de la herida debe responder dramáticamente incrementando la proliferación y muerte celular a la vez que las células cambian su identidad.

5. La vía Wnt: Dishevelled como núcleo organizador

Los Wnts comprenden una gran familia altamente conservada de glicoproteínas secretables cruciales para el desarrollo embrionario y la homeóstasis de todos los Metazoa (Komiya y Habas, 2008). Los miembros de esta familia Wnt comparten una secuencia de aminoácidos rica en cisteínas pero no propiedades funcionales específicas, por lo que distintos Wnts están asociados a una gran cantidad de procesos diferentes basados en la comunicación célula-célula. Dentro de estos procesos se encuentran la adquisición de la identidad celular, el control de la proliferación, polaridad, migración, adhesión y muerte celular, que gobiernan la morfogénesis del organismo (Mikels y Nusse, 2006). Estos ligandos se han clasificado en dos grandes grupos dependiendo de si su unión al receptor conlleva la activación de la β -catenin o no: canónicos/ β -catenin dependientes y no canónicos/ β -catenin independientes (Figura 44).

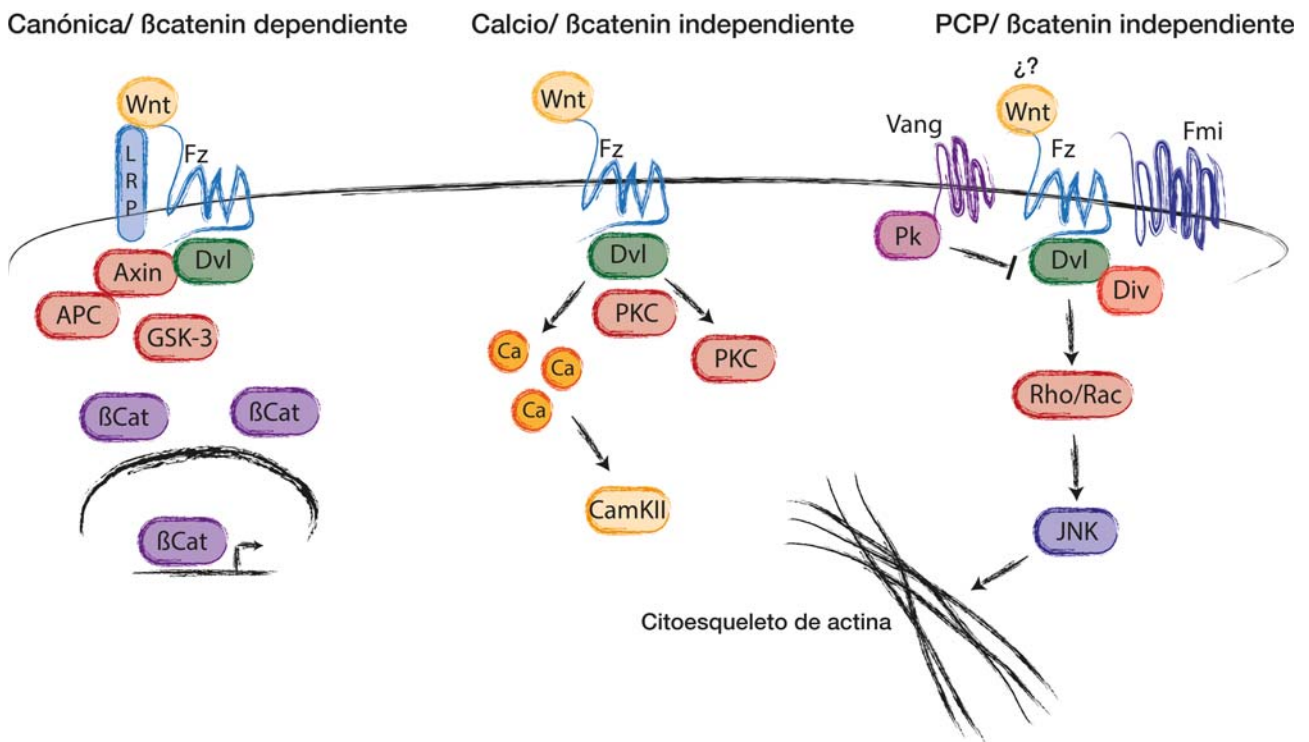


Figura 44: Dishevelled es el elemento común a todas las ramas de señalización de la vía Wnt. Esquema de los componentes principales de la vía canónica o β -catenin dependiente y las vías de Calcio y PCP o β -catenin independientes.

El elemento común de todas estas cascadas de señalización es la proteína intracelular Dishevelled (Dvl). Tras la unión del ligando Wnt al complejo receptor, la señal es transducida al citoplasma a través de la interacción del receptor Frizzled (Fz) con Dvl y es en este punto cuando se bifurca en las distintas ramas de la vía. Aunque se desconoce cómo, Dvl es el responsable de interpretar los distintos estímulos generados y de decidir a cuál de los distintos efectores transmitirlos, para desencadenar un proceso en particular (Wallingford, 2005; Wharton, 2003).

La función de Dishevelled es la de servir como andamiaje para otras proteínas, ya que parece que por sí misma carece de actividad catalítica (Wu et al., 2008). Dishevelled posee tres dominios y dos regiones conservadas, todos involucrados en interacciones proteína-proteína; los dominios DIX (Dishevelled, Axin), PDZ (Postsynaptic density 95, Disc large, Zonula occludens-1) y DEP (Dvl, Egl.10, Pleckstrin), así como una región rica en residuos básicos y otra rica en prolinas (Gao y Chen, 2010) (Figura 45). Mientras que el dominio PDZ es necesario para el desencadenamiento de todas las ramas de la vía, el dominio DIX es exclusivo de la rama β -catenin dependiente y el DEP es necesario y suficiente para la PCP (Wallingford, 2005).

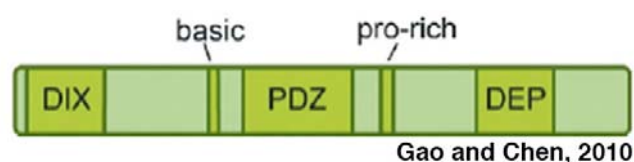


Figura 45: Estructura de Dishevelled. (Gao y Chen, 2010).

5.1. Dishevelled en la vía Wnt canónica/ β -catenin dependiente

La unión de Wnt a su receptor Frizzled promueve la interacción entre este y el correceptor LRP6, a la vez que promueve el reclutamiento de Dvl por Fz a través del dominio PDZ. Entonces se produce la polimerización de Dvl, que a su vez es necesaria para la polimerización del complejo receptor y además servirá de plataforma para que la Axin y GSK3 se reposicionen. Esto conlleva el desacople del complejo de destrucción de la β -catenin, quedando esta libre para translocarse al núcleo (Gao y Chen, 2010; van Amerongen y Nusse, 2009). Aún no está claro si Dvl se une directamente a Axin a través del dominio DIX que ambas proteínas poseen, o si por el contrario, Fz recluta a Dvl y LRP6 recluta a Axin, siendo la unión entre Dvl y Axin indirecta (Schwarz-Romond et al., 2007) (Figura 46).

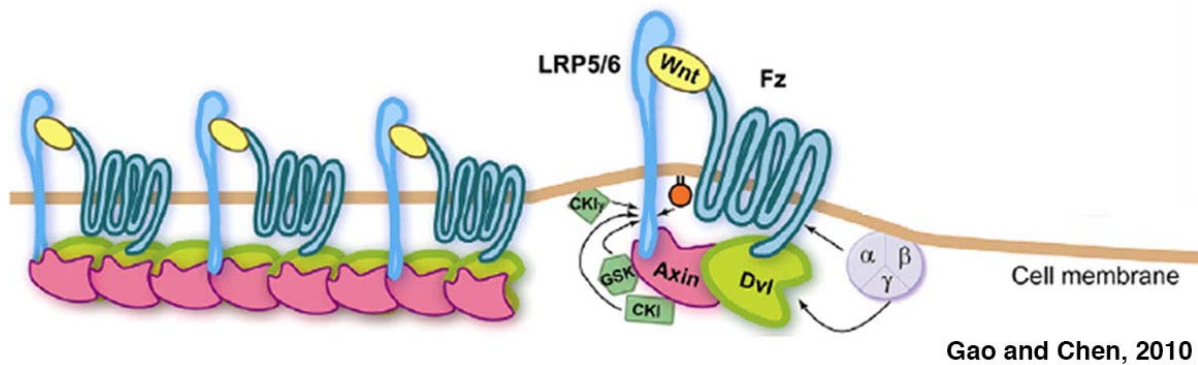


Figura 46: Dishevelled en la vía Wnt canónica. La polimerización de Dishevelled provoca la formación del clúster formado por Wnt, LRP6/5 y Fz. (Gao y Chen, 2010).

La acumulación de la β -catenin en un polo del embrión indica el lugar de gastrulación que especificará el mesoendodermo y establecerá la polaridad axial. Más tarde, la β -catenin controlará la adquisición de la identidad posterior y el “patterning” del embrión a lo largo de su eje AP. Esta función de la β -catenin en el establecimiento del eje AP o “primary body axis” está conservada en todos los animales, incluso en los pre-bilateria como los cnidarios (Petersen y Reddien, 2009). En el cnidario *Nematostella vectensis*, por ejemplo, la acumulación de la proteína Dvl de origen materno exclusivamente en el polo animal estabiliza allí a la β -catenin, generando la primera asimetría del embrión que será necesaria tanto para la especificación del endodermo como para la adquisición de la polaridad del embrión (Lee et al., 2007). La asimetría en la actividad de la β -catenin en regiones posteriores también controla eventos de división celular asimétrica, migración celular, crecimiento posterior y polarización de distintas estructuras como el neuroectodermo (Cayuso y Martí, 2005). También será necesaria para el mantenimiento y regeneración del eje AP, no sólo en planarias, como ya he introducido anteriormente, sino también durante la regeneración del cnidario Hydra (Guder et al., 2006; Lee et al., 2006).

5.2. Dishevelled en la vía Wnt no canónica/ β -catenin independiente

Al menos dos cascadas de señalización independientes de la β -catenin son activadas a través de Dvl; la vía Wnt-Calcio y la vía Wnt-Planar Cell Polarity (PCP), de las cuales, esta última es la más estudiada (Figura 47).

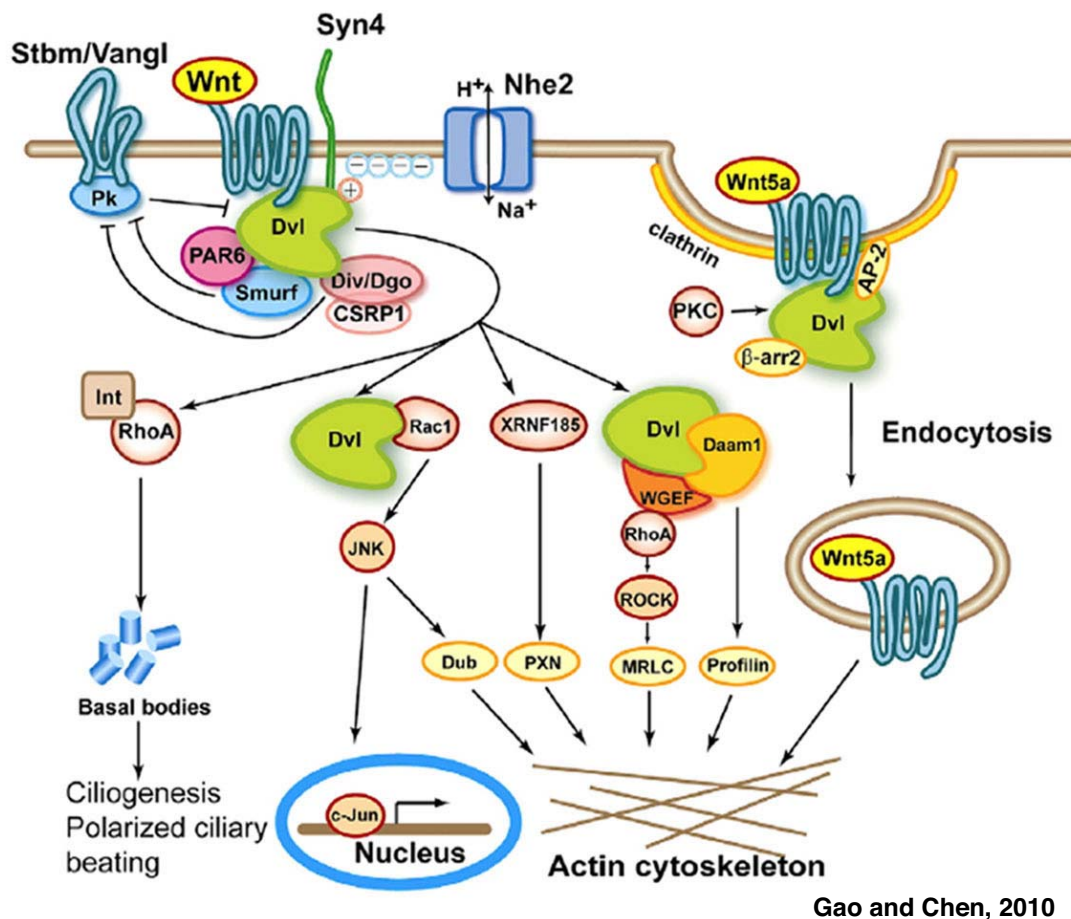


Figura 47: Dishevelled en la vía Wnt/PCP. Multitud de componentes “downstream” de Dvl regulan la transcripción génica, la ciliogénesis y el citoesqueleto de actina. (Gao y Chen, 2010).

La vía PCP ha sido descrita por primera vez en *Drosophila* en el contexto de la polarización de un epitelio (Veeman et al., 2003). Sin embargo, hoy en día, las funciones descritas tanto en invertebrados como en vertebrados de lo que se conoce como la vía de la PCP, son más diversas y van desde el ensamblaje y “patterning” del circuito nervioso, hasta los movimientos celulares de Convergent-Extension (CE) durante la gastrulación, la orientación de las divisiones celulares o la polarización de células, estructuras o tejidos a lo largo de un plano (Goodrich y Strutt, 2011). Aunque todos estos procesos ocurren en distintos contextos biológicos, la base reguladora es la misma: comunicación a nivel local entre células que reorganizan el citoesqueleto y generan asimetrías intracelulares capaces de moldear la arquitectura celular y tisular.

Mutaciones de los genes de la PCP durante el desarrollo de las alas de *Drosophila* producen la desorientación de los pelos, ya que pierden su posición distal y aparecen en posiciones aleatorias de la célula. De hecho, el nombre de Dishevelled (despeinado) se basa en la descripción del fenotipo generado tras su mutación en *Drosophila* en el que los

pelos del cuerpo y alas estaban desorientados (Fahmy y Fahmy, 1959). A parte de Dvl, se han identificado otros genes implicados en mantener la orientación próximo-distal entre las células del epitelio. Estos genes, conocidos como “PCP core genes” son, Frizzled, Flamingo/Celsr (Fmi), Van Gogh/Strabismus (Vang), Prickle (Pk) y Diego/Diversin (Div) (Axelrod, 2009; Mcneill, 2010). En *Drosophila*, el hecho de que estas proteínas adopten una distribución polarizada dentro de la célula es lo que dirigirá la polarización próximo-distal de las células. Mientras que Fmi se localiza en ambos lados, próximo y distal, Pk y Vang lo harán en el lado proximal y Fz, Dvl, y Div en el lado distal (Vladar et al., 2009). Aunque se desconoce cual es el mecanismo que dirige esta polarización, se ha propuesto que puede ser inhibición mutua entre los dos complejos y una interacción asimétrica de Fmi entre Fz y Vang en los distintos lados de la célula (Klein y Mlodzik, 2005). En el ala, esta distribución asimétrica de los “PCP core genes” genera una polaridad próximo-distal que termina condensando la actina en el lado distal, donde se formará el pelo (Figura 48).

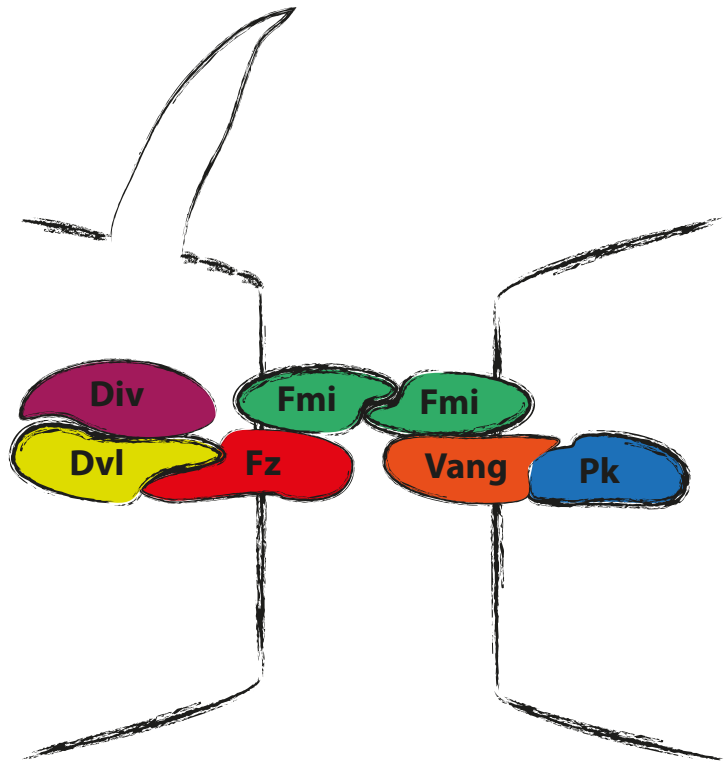


Figura 48: Distribución asimétrica en la célula de los genes de la “PCP core network”.

El papel de la vía PCP en la polarización de los epitelios también se ha descrito durante el desarrollo del ojo de *Drosophila*, así como del oído interno y la piel de ratón (Kelly y Chen, 2007; Vladar et al., 2009). Aunque muchos de los componentes de la PCP presentan funciones redundantes en vertebrados, existen algunas diferencias; por ejemplo, aunque el requerimiento de Wg en *Drosophila* está aún bajo debate (Lawrence y Casal, 2013; Wu et al., 2013), en vertebrados está claro que los ligandos Wnt no canónicos, Wnt5 y Wnt7, participan en el proceso (Gao, 2012).

A parte de la polarización de epitelios, Dishevelled, como componente de la PCP, está implicado en una gran variedad de procesos responsables de la morfogénesis de vertebrados:

5.2.1. Migración celular durante los movimientos de “Convergent-Extension” (CE)

Durante la gastrulación y la neurulación de vertebrados, las células del mesodermo o neuroectodermo, respectivamente, se estrechan para intercalarse a lo largo de su eje ML (convergencia) a la vez que se alinean y se elongan a lo largo del eje AP (extensión) (Keller et al., 2003). Estos movimientos celulares también dependen de todos los componentes del complejo de la PCP (Wallingford et al., 2002). Además, aunque no hay evidencias de que los ligandos Wnts estén aportando direccionalidad al proceso, Wnt5 y Wnt11 operan activando distintas cascadas de señalización que ambas son necesarias para asegurar los movimientos de CE. Wnt11 interacciona con Fz7 y a través de Dvl y Daam-1, activará a RhoA y Rok para formar adhesiones focales y fibras de estrés (Habas et al., 2001), mientras que la señalización de Wnt5 es mediada a través de un receptor alternativo, Ror2, que produce la acumulación asimétrica de Vang (Gao et al., 2011) y culmina con la activación de la JNK (Schambony y Wedlich, 2007). El sistema Wnt5/JNK también es necesario para coordinar la migración celular durante el crecimiento y elongación de las extremidades en el desarrollo de vertebrados (Gros et al., 2010). Estos movimientos de CE son también necesarios durante la neurulación para el cierre del tubo neural, por lo que fallos en el complejo de genes de la PCP están implicados en una gran cantidad de enfermedades relacionadas con defectos en el tubo neural (Wallingford, 2005).

5.2.2. Migración neuronal

Independientemente del papel en los movimientos de CE en el neuroectodermo, el complejo PCP también dirige específicamente la migración de algunos precursores neuronales (Figura 49). Por ejemplo, independientemente de la especificación de los precursores neuronales, Vang, Pk y los Wnts 5 y 11 se encargan de dirigir la migración caudal de estos precursores de neuronas branquimotoras durante el desarrollo de Zebrafish (Jesen et al., 2002; Montcouquiol et al., 2006). Así mismo, la migración de los precursores neuronales de la cresta neural está regulada por Dvl y wnt11 tanto en Zebrafish como en *Xenopus* (De Calisto et al., 2005; Jesen et al., 2002).

Otro aspecto importante para la correcta migración de las neuronas es el establecimiento de su polaridad; las neuronas forman un único axón en un lado de la célula y una o muchas dendritas en el lado opuesto (Goodrich, 2008; Montcouquiol et al., 2006). Los ligandos Wnts no canónicos, en particular Wnt5, funcionan como una señal repulsiva al guiaje y crecimiento de los axones, no sólo en vertebrados, sino también en *Drosophila* (Ciani y Salinas, 2005; Fradkin et al., 2004; Goodrich, 2008) (Figura 49). Así mismo, también son necesarios para la formación y crecimiento de las dendritas y sinapsis neuronales (Ciani y Salinas, 2005) (Figura 49).

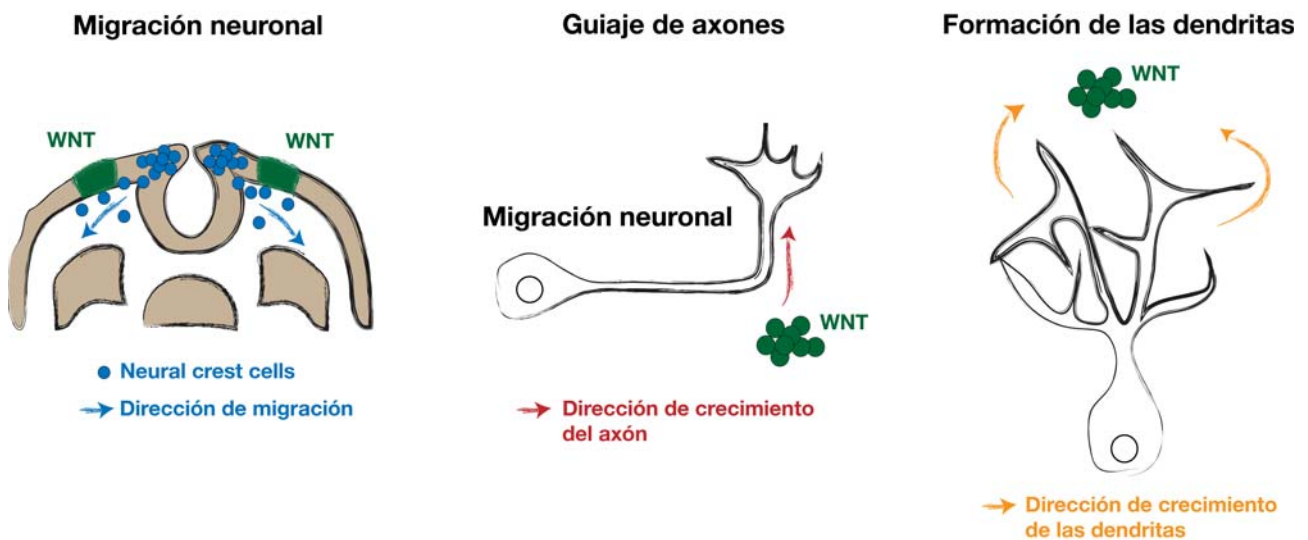


Figura 49: El papel de los Wnts no canónicos durante la neurogénesis. Los ligandos Wnts dirigen la migración de las células de la cresta neural, la dirección de crecimiento de los axones y de la formación de las dendritas.

5.2.3. Ciliogénesis y posicionamiento de los MTOC

Los cilios tienen un papel crucial en la recepción de señales extracelulares. Están compuestos por un conjunto de microtúbulos envueltos por una membrana extracelular, conocido como axonema, que se extiende a partir de un cuerpo basal posicionado en la región más apical de la membrana. La síntesis proteica no tiene lugar en el cilio sino que depende del tráfico proteico mediado a través de vesículas, llevado a cabo por las proteínas IFT (Intraflagellar transport) y BBS (Bardet-Biedl syndrome) (Gray et al., 2011). Aunque el link entre la PCP y la ciliogénesis no está claro, se ha descrito que Dvl, Vang y Div se localizan asimétricamente en el cuerpo basal de los cilios (Park et al., 2008) y que

Dvl y otros efectores de la PCP, como Fuzzy e Inturned, son necesarios para el tráfico mediado por vesículas de ciertas proteínas al cuerpo basal de los cilios (Kim et al., 2010; Park et al., 2008; Wallingford y Mitchell, 2011) (Figura 50).

La vía PCP también está implicada en el posicionamiento de los MTOC (Microtubule organizing center) (Gray et al., 2011). Existen dos tipos de MTOC, los centrosomas, esenciales para establecer el eje de división celular y los cuerpos basales, asociados con los cilios y flagelos.

Algunas de las proteínas del complejo

de la PCP establecerán el posicionamiento de los centrosomas, esenciales para orientar las divisiones celulares (Quesada-Hernández et al., 2010) y orquestar los movimientos celulares durante la CE (Sepich et al., 2011). Así mismo, se encargan de posicionar el cuerpo basal del cilio y en consecuencia, de determinar la dirección de batido de este, tanto en células uniciliadas (Borovina et al., 2010; Mitchell et al., 2009) como en epitelios multiciliados (Park et al., 2008).

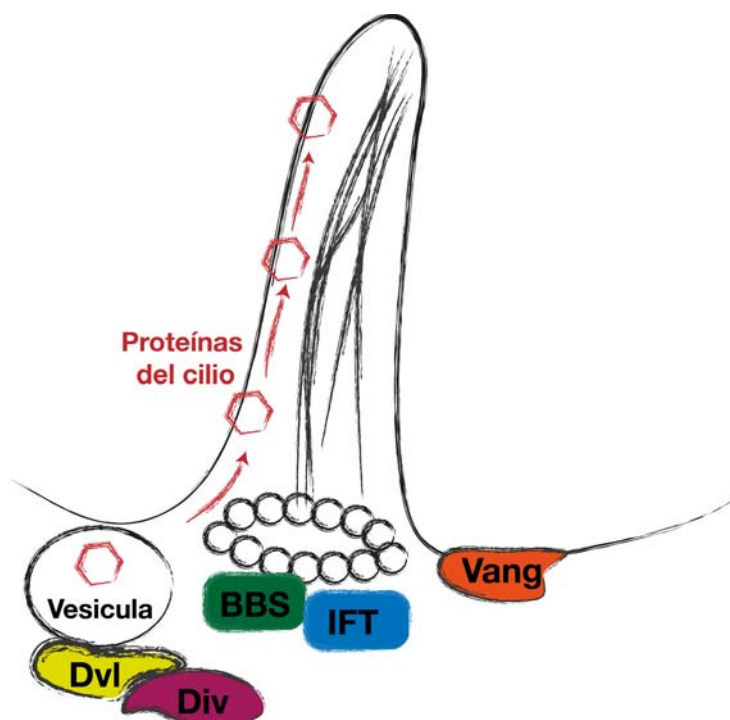


Figura 50: La vía PCP durante la ciliogénesis.

En resumen, la polaridad a lo largo de un plano es una propiedad fundamental de todas las células y tejidos, y se requiere para coordinar la morfogénesis tanto de estructuras determinadas como del embrión (Goodrich y Strutt, 2011). Aunque el funcionamiento y los elementos implicados varían, el complejo de la PCP se encargará de garantizar esta polaridad en una gran variedad de contextos biológicos diferentes.

6. La vía JNK : mecanismo de respuesta al estrés

La Jun-N-terminal Kinase (JNK), también conocida como una “stress-activated protein kinase” (SAPK), forma parte de la superfamilia de las “mitogen-activated protein kinases” (MAPKs), proteínas que se encargan de transmitir señales intracelularmente a través de la fosforilación de proteínas. Junto al grupo de la JNK, otros dos grandes grupos conforman la superfamilia de las MAPKs, el de la “extracellular regulated kinases” (ERK) y el grupo de la p38 kinase (Davis, 2000). La activación de estas cascadas de señalización está muy conservada y se caracteriza por ocurrir en tres fases de fosforilación consecutivas (Figura 51).

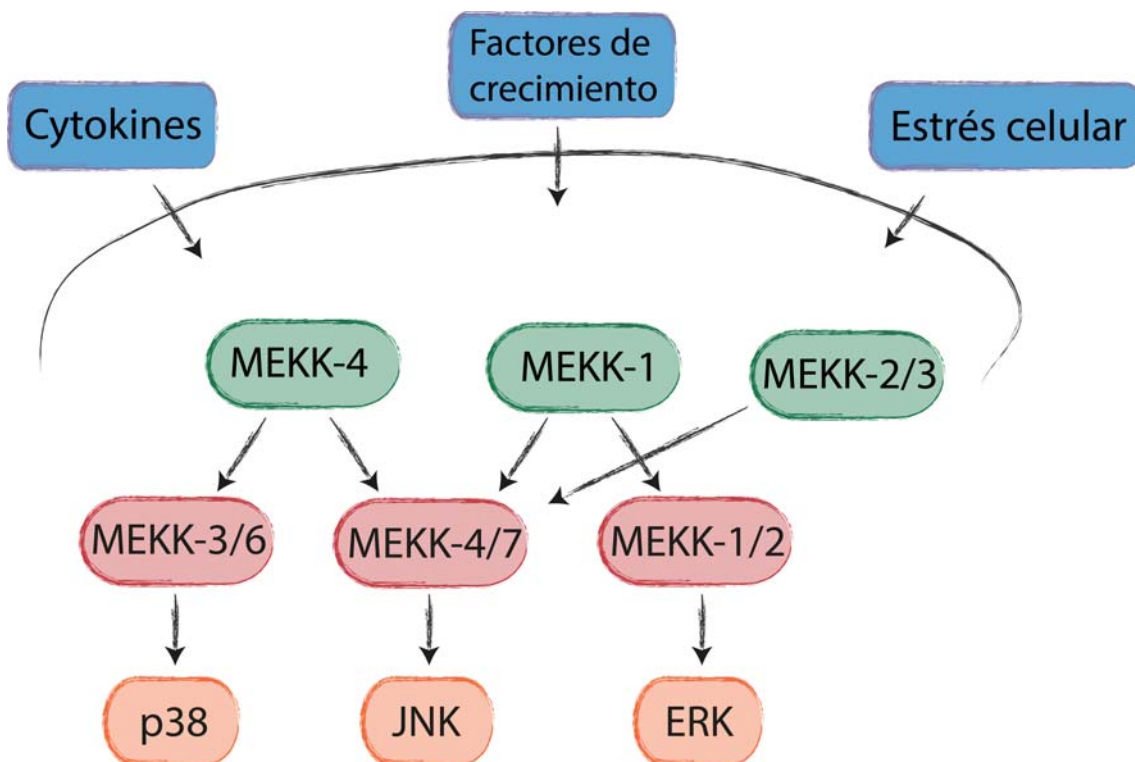


Figura 51: La vía de señalización de las MAPKs. Esquema de los componentes principales de la vía de señalización de las MAPKs. Ante distintos estímulos extracelulares, se desencadena la fosforilación y activación en cadena de las distintas quinasas.

Una vez la vía JNK se ha activado, la señal se transmitirá a la célula, que responderá con cambios en su perfil de expresión génica (Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2012). Entre los

factores de transcripción fosforilados por la JNK en el núcleo, se encuentran c-Jun, c-Fos, ATF-2, p53 y c-Myc (Figura 52). La fosforilación de c-Jun y ATF-2 mediada por JNK conlleva a su estabilización contra la degradación dependiente de ubiquitina, mientras que la de c-Myc produce un aumento de la degradación de la proteína. Algunos de estos factores de transcripción forman homo- o heterodímeros, como el complejo AP-1 (activador protein-1), que se encarga de la activación de genes clave en el control de la proliferación, diferenciación y muerte celular (Haeusgen et al., 2009). La JNK presenta numerosas proteínas “scaffold”, como las “c-Jun N-terminal kinase interacting proteins” (JIPs), la β -arrestin-2, la filamin-B y la “stress-activated protein kinase pathway-regulating phosphatase 1” (SKRP-1). Estas proteínas de “scaffold” son las responsables del transporte intracelular de la JNK y también de posibilitar la especificidad de funciones dependiendo del contexto (Sato et al., 2008).

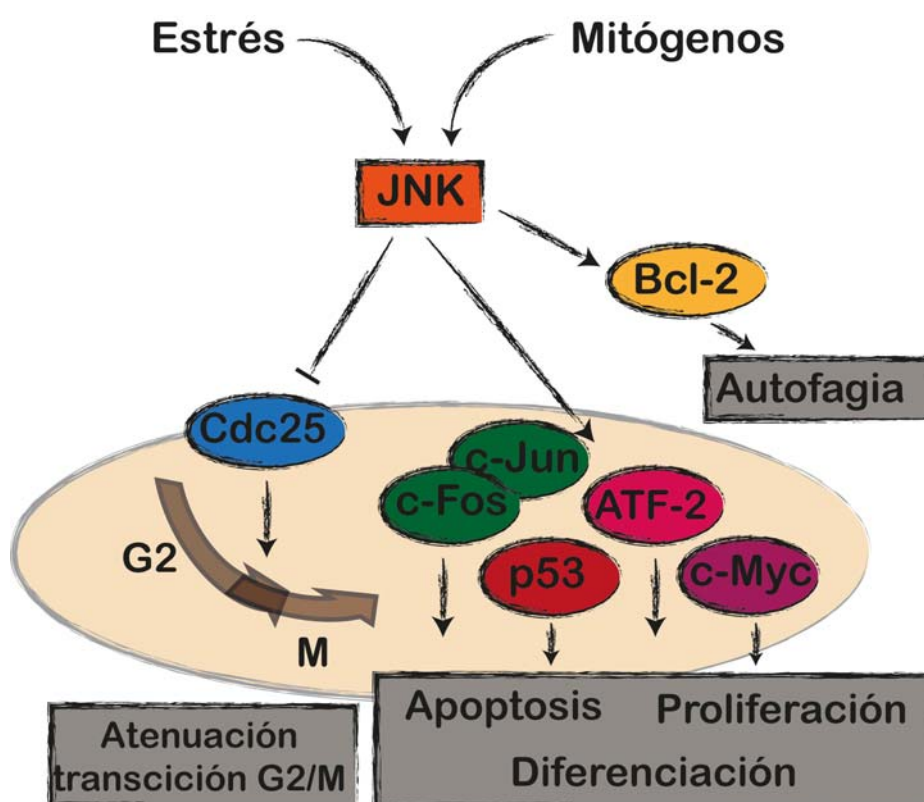


Figura 52: La vía de señalización de la JNK. Esquema simplificado de algunas de las proteínas fosforiladas por la JNK y de algunos de los procesos celulares que controlan.

Como reguladores negativos de la vía existen las “Mitogen-activated protein kinase phosphatases” (MKPs) o “Dual-specificity phosphatases” (DUSP) 1 y 10, que pueden inactivar o modular la actividad de la JNK vía defosforilación (Haeusgen et al., 2009). Así

mismo en *Drosophila* se han identificado varios reguladores negativos de la JNK que parecen ser específicas de ésta, como: Puckered (Puc) (Martín-Blanco et al., 1998), una DUSP que es un target de la vía que se activa para modular la acción de la JNK; Anterior open (Aop), un represor transcripcional de la JNK; Scarface (Scaf), una serina-proteasa secretable; Ribbon (Rib), una proteína Zn-finger con dominios de unión al ADN y Raw, que no posee dominios conocidos (Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2012).

La vía de la JNK coordina muchos procesos celulares básicos (Brown y Sacks, 2009), que paso a resumir a continuación:

6.1. Elongación celular y el cierre dorsal embrionario (embryonic dorsal closure) de *Drosophila*

El “screening” mutagénico de Nüsslein-Volhard/Wieschaus en *Drosophila* identificó un tipo de líneas embrionarias letales que presentaban agujeros en la región dorsal de sus cutículas, fenotipo que denominaron “dorsal open” (Anderson y Nüsslein-Volhard, 1984). Más tarde se identificaron mutaciones de los genes de la vía de la JNK en estas líneas (Riesgo-Escovar et al., 1996; Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2012).

El proceso del cierre dorsal del embrión de *Drosophila* ha sido profundamente analizado y ha facilitado la identificación de muchos genes responsables de regular cambios en la morfogénesis celular durante el desarrollo embrionario. Algunos de estos cambios morfológicos, como la elongación celular, están controlados por JNK o Basket (Bsk) en *Drosophila*. El proceso del “dorsal closure” es el cierre dorsal del embrión a través del estrechamiento de las células del epitelio lateral. Antes de esto, las bandas germinales posicionan el epitelio en la región ventral y los laterales del embrión, dejando a la amnioserosa como la única cubierta ectodermal dorsal de manera transitoria. Bsk se activa en las células más dorsales del epitelio (leading edges cells, o células LE) , que van a elongarse a lo largo de su eje DV y proyectarán filopodios por toda la superficie dorsal del embrión (Goberdhan y Wilson, 1998; Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2012). Bsk coordinará ambos tejidos, amnioserosa y epitelio, básicamente a través de la secreción de Dpp en las células LE. Otras proteínas como las Integrins, Profilin, Puc y otros muchos genes diana de Bsk participan igualmente en el proceso.

6.2. Muerte celular programada: inducción de la apoptosis

La muerte celular programada permite eliminar células para moldear los órganos durante el desarrollo y la homeostasis del organismo, así como eliminar células enfermas o malignas en el organismo adulto. Las características de una célula que va a ser eliminada son la activación de las caspasas, la fragmentación del ADN o la sobre-expresión de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Steller, 2008). La función más conservada de la JNK, desde levaduras hasta mamíferos, es la inducción de esta muerte celular programada a través de la activación de caspasas en respuesta a estímulos externos de estrés (Bergmann y Steller, 2010).

Debido a su actividad proapoptótica, la JNK también funciona como un gen supresor de tumores. El “compensatory growth” o crecimiento compensatorio es necesario para reponer las células del tejido que han muerto y un control muy exhaustivo entre inducción de muerte celular y la generación de nuevas células es necesario para evitar la formación de sobre-crecimientos o tumores (Chen, 2012). Se ha propuesto que la JNK juega un papel crucial en esta coordinación, aunque se desconoce si la activación de la JNK induce señales de crecimiento a la vez que proapoptóticas o si son las células que mueren las que envían señales que inducen la proliferación de las células supervivientes. Este último fenómeno recientemente renombrado como “apoptosis-induced proliferation” (proliferación inducida por apoptosis) para sustituir a “compensatory proliferation” (proliferación compensatoria), proviene de estudios en *Drosophila* en los que generaban células “undead”, que son células en las que la apoptosis se ha inducido por estrés, pero se mantienen vivas ya que tienen inhibida la p35. Bajo estas circunstancias, se ha descrito que estas células “undead” inducen la proliferación de las células vecinas, probablemente a través de la secreción de Wg y Dpp (Pérez-Garijo et al., 2009; Ryoo et al., 2004). El cambio de nombre del proceso se ha propuesto ya que las células “undead” no mueren y por lo tanto, la proliferación inducida no sería compensatoria. Además, la secreción de los mitógenos por parte de estas células se produciría de manera incontrolada, ya que acaban produciéndose sobre-crecimientos (Mollereau et al., 2012). Recientemente se ha observado que las células realmente apoptóticas también secretan Wg y Dpp, pero su papel durante la proliferación mediada por apoptosis no está claro, ya que al inhibir estos dos mitógenos secretables, el fenómeno sigue teniendo lugar (Fan y Bergmann, 2008;

Peréz-Garijo et al., 2009; Smith-Bolton et al., 2009). Ryoo y colaboradores identifican que la JNK es necesaria para la secreción de Wg en las células “undead”, aunque su papel en la secreción de estos mitógenos en células realmente apoptóticas se desconoce (Ryoo et al., 2004).

La JNK también podría estar induciendo la proliferación a través de la vía de la “Janus-activated kinase” (JAK/STAT). Tras la inducción de la apoptosis, la JNK induce la rápida translocación de Yorkie (yki) al núcleo, que normalmente se encuentra inhibido en el citoplasma por Hippo(Hpo)/Wts. Una vez en el núcleo, yki restringe la activación de la apoptosis, a la vez que activa a JAK/STAT y la transcripción de la familia de citoquinas “Unpaired” (upd). La nuclearización de yorkie inducida por la JNK será necesaria para el “compensatory growth” del órgano dañado (Sun y Irvine, 2011). La secreción de las citoquinas upd inducida por JNK en el sistema digestivo de *Drosophila*, activará a su vez la vía de JAK/STAT en las células madre del intestino, aumentando su índice mitótico (Jiang et al., 2009).

6.3. Biología de las células madre

La JNK es crucial para la funcionalidad de las células madre embrionarias (“Embryonic stem cells” o ESCs). Aún así, se desconoce en cuál de los aspectos de la biología de la ESC -establecimiento, mantenimiento o diferenciación- participa. En las ESC de ratón, hay estudios que indican que la JNK es esencial para su mantenimiento y proliferación (Chen, 2012), mientras que otros demuestran que la JNK es requerida para inhibir la diferenciación de células nerviosas a partir de las ESCs, pero no para su mantenimiento (Amura et al., 2005). El papel de la JNK durante el mantenimiento de las ESCs de humano sí que está claro, aunque se desconoce si tiene un rol adicional durante el inicio de su diferenciación (Chen, 2012).

También se ha sugerido que la inducción de la proliferación de las células madre adultas por parte de la JNK promueve el desarrollo de tumores (Chen, 2012).

6.4. Neurogénesis

El desarrollo del cerebro de ratón requiere de la JNK, ya que esta es responsable de inducir la muerte de algunas neuronas de manera específica (Kuan et al., 1999) y de controlar la migración radial de las neuronas del córtex cerebral (Hirai et al., 2006). Así mismo, también es crucial durante la axonogénesis y la formación de las dendritas (Haeusgen et al., 2009).

La regeneración de las neuronas periféricas y de distintos ganglios cerebrales tras el daño también depende de la activación de la JNK, aunque aún se desconoce si la importancia de la JNK reside en su capacidad de inducir la muerte neuronal o en activar distintos procesos regenerativos. Así mismo, la JNK también se ha visto involucrada en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer o el Parkinson (Haeusgen et al., 2009).

6.5. Cicatrización o “Wound Healing”

La vía JNK en *Drosophila* se activa en la zona de la herida tras la amputación de un fragmento del disco de ala o tras la inducción de muerte celular. Su función es necesaria para la reorganización del citoesqueleto durante la cicatrización (Bergantiños et al., 2010; Bosch et al., 2005; Råmet et al., 2002; Repiso et al., 2011). La inducción de muerte celular específicamente en un compartimento del disco de ala de *Drosophila* activa la proliferación celular para recuperar las dimensiones del órgano. Esta inducción de la proliferación ocurre primero a nivel local cerca de la herida y después se extiende al compartimento donde se había inducido la muerte celular. La inducción del primer pico proliferativo en la zona de la herida depende de la activación de la JNK, pero al contrario, la segunda fase de inducción de la proliferación para compensar la pérdida de tejido en el compartimento donde se había inducido la muerte es un proceso independiente de la actividad de la JNK (Bergantiños et al., 2010).

En resumen, la JNK es una proteína que se activa en respuesta al estrés para coordinar procesos celulares básicos, como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Además se encarga de regular cambios morfogénéticos del citoesqueleto de la célula, esenciales durante el desarrollo embrionario y el cierre de una herida. La existencia de proteínas como la JNK, que integran todos estos procesos, facilita respuestas celulares inmediatas y a nivel global. El modo de activación de la JNK hace que sea capaz de generar cambios muy rápidos en la célula, no sólo a nivel morfogénético sino también en su perfil de expresión génica y por lo tanto, de regular procesos celulares de manera robusta y efectiva. Esto hace que la JNK sea una proteína con funciones muy pleiotrópicas, que deberán activarse específicamente dependiendo del contexto.

OBJETIVOS

En esta tesis hemos analizado la inducción de la respuesta regenerativa y la adquisición del diseño corporal durante la regeneración y el recambio tisular homeostático de la planaria *Schmidtea mediterranea*. Para ello nos hemos servido del análisis funcional de vías de señalización con funciones cruciales y altamente conservadas, como la vía Wnt no canónica y la vía JNK. Los objetivos principales de esta tesis han sido:

1. Análisis funcional de Dishevelled, prestando especial interés a los procesos relacionados con Dishevelled como responsable de la transducción de las vías Wnt no canónicas, como el establecimiento de las conexiones nerviosas y la polarización de los cilios dependiente de la señalización de la vía PCP.
2. Profundizar en el estudio del papel de Wnt5 en el posicionamiento del sistema nervioso, a través de la identificación de su receptor Ror y del estudio de su integración funcional y mutua regulación con Slit.
3. Análisis del papel integrador de la JNK durante la respuesta regenerativa temprana, así como de la relevancia de la muerte celular apoptótica y de la progresión controlada del ciclo celular de los neoblastos, ambos procesos controlados por la JNK.
4. Estudio del papel de la muerte celular apoptótica inducida por la JNK en la recuperación y en el mantenimiento de la proporcionalidad del organismo y de la conformación de sus órganos durante el “remodeling”.

RESULTADOS

Informe de los directores de tesis sobre la participación de la doctoranda y el índice de impacto de las publicaciones

La memoria de la tesis doctoral presentada por María Almuedo Castillo, titulada “Inducción de la regeneración y adquisición del diseño corporal en planarias: señalización de las vías JNK y Wnt no canónica”, de la que somos codirectores, incluye cinco artículos. Tres de ellos están incluidos en el apartado de resultados, de los cuales dos han sido publicados en revistas científicas internacionales y el tercero será enviado en breve tras añadir algunos experimentos y últimas reflexiones. Los otros dos artículos, uno de ellos una revisión, están incluidos en el apartado de anexos y ya han sido igualmente publicados en revistas científicas internacionales. Todas estas revistas constan en la base de datos más importante de ciencias biomédicas, el PubMed y en la “Thomson Reuters Web of Science”. Así mismo, se trata de publicaciones que han pasado el filtro de revisores anónimos designados por los editores. A continuación pasamos a detallar la participación de la doctoranda en cada publicación y también los índices de impacto y la posición en el listado ordenado de especialidades correspondientes de las distintas revistas científicas publicado en la “Thomson Reuters Web of Science”, edición 2012.

Artículo 1:

María Almuedo-Castillo, Emili Saló y Teresa Adell (2011). “Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians”. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 108: 2813-2818.

El trabajo experimental presentado en este artículo ha sido realizado íntegramente por la doctoranda María Almuedo Castillo bajo la supervisión de los Doctores Emili Saló y Teresa Adell. Así mismo, ha contribuido activamente en el diseño de los experimentos y en la discusión de los resultados. La escritura del manuscrito, producción y diseño de las imágenes ha sido realizada por la doctoranda bajo la supervisión de los Doctores Emili Saló y Teresa Adell.

Factor de impacto: 9,737

Posición en el área: 4/56 (Área de “Multidisciplinary Sciences”)

Artículo 2:

María Almuedo-Castillo, José Ignacio Rojo-Laguna, Emili Saló y Teresa Adell. “Wnt5-Ror and Slit signaling generates a mutually dependent system to establish a corridor for nervous system regeneration and maintenance in planarians”. Manuscrito en preparación.

El trabajo experimental presentado en este artículo ha sido realizado por la doctoranda María Almuedo Castillo con la ayuda del doctorando José Ignacio Rojo Laguna y bajo la supervisión de los Doctores Emili Saló y Teresa Adell. Así mismo, ha contribuido activamente en el diseño de los experimentos y en la discusión de los resultados. La escritura del manuscrito, producción y diseño de las imágenes ha sido realizada por la doctoranda bajo la supervisión de los Doctores Emili Saló y Teresa Adell.

Artículo 3:

María Almuedo-Castillo, Xenia Crespo, Florian Seebeck, Kerstin Bartscherer, Emili Saló y Teresa Adell (2014). “JNK controls the onset of mitosis in planarian stem cells and triggers apoptotic cell death required for regeneration and remodeling” **PLOS Genetics**, aceptado y en proceso de publicación.

El trabajo experimental presentado en este artículo ha sido realizado por la doctoranda María Almuedo Castillo con la ayuda de la estudiante de máster Xenia Crespo en experimentos concretos y bajo la supervisión de los Doctores Emili Saló y Teresa Adell. En colaboración con el doctorando Florian Seebeck realizaron la puesta a punto del protocolo de incorporación y detección del CldU bajo la supervisión de la Doctora Kerstin Bartscherer del “Max Planck Institute” de Münster. Así mismo, la doctoranda ha contribuido activamente en el diseño de los experimentos y en la discusión de los resultados. La escritura del manuscrito, producción y diseño de las imágenes ha sido realizada por la doctoranda bajo la supervisión de los Doctores Emili Saló y Teresa Adell.

Factor de impacto: 8,517

Posición en el área: 12/161 (Área de “Genetics and Heredity”)

Artículo 4 (Anexo 1):

Marta Iglesias, **María Almuedo-Castillo**, A. Aziz Aboobaker y Emili Saló (2011). “Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by Wnt/ β -catenin pathway” **Developmental Biology** 358: 68-78.

La doctoranda María Almuedo Castillo ha contribuido realizando algunos experimentos específicos en este trabajo. En el diseño de los experimentos, la discusión de los resultados, escritura y producción de las imágenes ha ayudado a la doctoranda Marta Iglesias bajo la supervisión del Doctor Emili Saló.

Factor de impacto: 3,868

Posición en el área: 11/41 (Área de “Developmental Biology”)

Revisión 1 (Anexo 2):

María Almuedo-Castillo, Miguel Sureda-Gómez y Teresa Adell. (2012). “Wnt signaling in planarians: new answers to old questions”. **Int J Dev Biol.** 56: 53-65.

La doctoranda María Almuedo Castillo ha contribuido en la escritura de la revisión junto con el doctorando Miguel Sureda-Gómez y la Doctora Teresa Adell. La producción y diseño de las imágenes las realizó gracias a la ayuda del Doctor José María Martín Durán y bajo la supervisión de la Doctora Teresa Adell.

Factor de impacto: 2,614

Posición en el área: 24/41 (Área de “Developmental Biology”)

Resultados

Firmado,

Los directores,

Dr. Emili Saló i Boix

Dra. Teresa Adell Creixell

Artículo 1:

“Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians”

María Almuedo-Castillo, Emili Saló y Teresa Adell

Proceedings of the National Academy of Science (PNAS), 108: 2813-2818

Índice de impacto (2012): 9,737

Resumen en castellano:

Dishevelled es esencial para la conectividad neuronal y la polaridad celular en planarias

La vía de señalización Wnt controla una gran variedad de procesos durante el desarrollo embrionario y la homeostasis. Esta vía se encuentra subdividida en distintas ramas de señalización dependiendo si activan o no a la β catenin.

La vía Wnt canónica o β catenin dependiente se encarga de establecer el eje corporal Antero-Posterior durante el desarrollo embrionario de organismos situados a lo largo de todo el árbol filogenético, así como durante la regeneración de planarias. La señalización Wnt no canónica o β catenin independiente comprende diferentes vías de las cuales la más estudiada es la vía de la “Planar Cell Polarity” (PCP), originariamente descrita en ser la responsable de la polarización de estructuras en las células epiteliales. Actualmente, las funciones de la vía PCP conocidas son mucho más diversas y van desde el diseño del circuito nervioso hasta la polarización de células, estructuras o tejidos, necesaria, por ejemplo, para la orientación de las divisiones celulares y el control de la migración celular. Dishevelled es el componente común a todas las cascadas de la vía Wnt y es el responsable de canalizar la señalización de los distintos Wnts hacia una vía u otra.

En este proyecto hemos identificado dos parálogos de Dishevelled en nuestro organismo modelo *Schmidtea mediterranea* (*Smed-dvl-1* y *Smed-dvl-2*) y analizado su función a través de su silenciamiento génico por RNAi. Hemos demostrado que la vía Wnt no canónica es esencial para al menos dos procesos durante la regeneración en planarias, y que en ambos, actúa de forma independiente de la β catenin. Primero está orquestando la conexión del sistema nervioso central durante los primeros días de regeneración a través de la señalización del ligando Wnt5, y segundo, se encarga de posicionar correctamente los cuerpos basales de los cilios en la parte más apical del epitelio mucociliado de las planarias. Este último proceso está controlado así mismo por otros dos componentes muy conservados de la vía PCP, Van-Gogh (*Smed-vang-1/2*) y Diversin (*Smed-div*), confirmando la funcionalidad de la vía PCP en planarias y por lo tanto en el clado de los lophotrocozoan.

Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians

Maria Almuedo-Castillo, Emili Saló, and Teresa Adell¹

Department of Genetics and Institute of Biomedicine, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Catalonia, Spain

Edited* by Walter J. Gehring, University of Basel, Basel, Switzerland, and approved January 4, 2011 (received for review August 16, 2010)

The **Wingless/Integrated (Wnt) signaling pathway controls multiple events during development and homeostasis. It comprises multiple branches, mainly classified according to their dependence on β -catenin activation. The Wnt/ β -catenin branch is essential for the establishment of the embryonic anteroposterior (AP) body axis throughout the phylogenetic tree. It is also required for AP axis establishment during planarian regeneration. Wnt/ β -catenin-independent signaling encompasses several different pathways, of which the most extensively studied is the planar cell polarity (PCP) pathway, which is responsible for planar polarization of cell structures within an epithelial sheet. Dishevelled (Dvl) is the hub of Wnt signaling because it regulates and channels the Wnt signal into every branch. Here, we analyze the role of *Schmidtea mediterranea* Dvl homologs (*Smed-dvl-1* and *Smed-dvl-2*) using gene silencing. We demonstrate that in addition to a role in AP axis specification, planarian Dvls are involved in at least two different β -catenin-independent processes. First, they are essential for neural connectivity through *Smed-wnt5* signaling. Second, *Smed-dvl-2*, together with the *S. mediterranea* homologs of Van-Gogh (Vang) and Diversin (Div), is required for apical positioning of the basal bodies of epithelial cells. These data represent evidence not only of the function of the PCP network in lophotrochozoans but of the involvement of the PCP core elements Vang and Div in apical positioning of the cilia.**

neural patterning | axial polarity | cilia basal body

Wingless/Integrated (Wnt) signaling controls multiple events, including cell migration, planar cell polarity (PCP), and stem cell self-renewal (1, 2). It acts through two main pathways: the canonical or β -catenin-dependent pathway and the non-canonical or β -catenin-independent pathways, which include the PCP and Wnt/calcium pathways. Dishevelled (Dvl) is common to all three pathways (3). In the β -catenin-dependent pathway, Dvl is recruited by the receptor Frizzled (Fz), promoting disassembly of the β -catenin destruction complex through the subsequent recruitment of Axin. As a consequence, β -catenin translocates to the nucleus, where it acts as a master regulator. A common role of the β -catenin/Wnt pathway is in establishing the anteroposterior (AP) axis during development (4). PCP signals are transmitted from cell to cell and are responsible for the polarization of cell structures. During PCP signaling, Dvl is also recruited by a Fz receptor and promotes the asymmetrical localization of the PCP core proteins within the cell, such that the Fz-Dvl-Diversin (Div)/Diego (Dgo) complex is oppositely localized to the Strabismus (Stbm)/Van-Gogh (Vang)-Prickle (Pk) complex. The asymmetrical subcellular localization of these elements in an epithelial sheet directs cytoskeletal reorganization that results, for instance, in a hair emerging solely from the distal edge of the cell (5–7). The same mechanism is used in mesenchymal cells to direct cell movement and migration during gastrulation (convergent and extension movements). Another context in which the PCP network has recently been implicated is in the apical docking and planar polarization of basal bodies in multiciliated epithelial cells (8). In addition, Dvl transduces different noncanonical Wnt/Fz signals, for example, to activate intracellular calcium-sensitive enzymes, such as PKC, or to mediate a wnt5-derailed/Related to tyrosine kinase (RYK)-dependent signal (1, 3).

Planarians are a classical model for regeneration studies because of their striking morphological plasticity. These platyhelminths are able to regenerate a whole organism from a piece of almost any part of their body and also to grow and degrow according to culture conditions (9). These properties rely on the neoblasts, multipotent stem cells present in adult organisms that are able to differentiate into any planarian cell type (10). The conserved role of the Wnt/ β -catenin pathway in establishing the AP axis during planarian regeneration and homeostasis has been broadly demonstrated (11–15). A role for the Wnt/ β -catenin-independent pathway in nervous system regeneration has also been reported in planarians silenced for *Smed-wnt5* and *Smed-evi/wntless* (14). Nothing is known about the role of the PCP pathway in planarians or, indeed, in any lophotrochozoans, however.

Here, we analyze the phenotype of animals silenced for the two *Schmidtea mediterranea* Dvls (*Smed-dvl-1* and *Smed-dvl-2*) (12). Our results demonstrate that in addition to their role in specifying the AP axis, *Smed-dvl-1* and *Smed-dvl-2* are involved in β -catenin-independent processes. First, they are essential for neural connectivity and mediolateral patterning of the CNS, mainly through a *Smed-wnt5*-mediated signal. Furthermore, *Smed-dvl-2* acts together with the *S. mediterranea* homologs of Vangl2 and Div/Dgo (*Smed-vang-1*, *Smed-vang-2*, and *Smed-div*) to regulate apical positioning of the cilia basal bodies of epidermal cells, demonstrating a specific function for the PCP network in planarians.

Results and Discussion

***Smed-dvl-1* and *Smed-dvl-2* Are Essential for AP Patterning and Brain Morphogenesis.** Two *S. mediterranea* Dvl paralogs have been identified: *Smed-dvl-1* and *Smed-dvl-2* (12) (Fig. S1A, phylogenetic analysis and mRNA expression pattern). It has been reported that simultaneous silencing of *Smed-dvl-1* and *Smed-dvl-2* generates “two-headed” planarians that resemble *Smed- β -catenin1* RNAi animals (12). Because Dvl is a shared signal transducer of the three branches of the Wnt pathway, however, we expected that β -catenin-independent defects would be also observed after silencing *Smed-dvl-1/2*. Silencing of *Smed-dvl-1/2* generates planarians with a radial morphology similar to that observed in *Smed- β -catenin1* RNAi planarians ($n = 164$ of 166) (11). Although the animals do not differentiate ectopic eyes around the periphery, expression analysis of markers like *Smed-Gpas*, which labels the cephalic brain branches and the pharynx, *Smed-Cintillo*, which labels the chemoreceptors, and *Smed-HoxD*, a marker of central-posterior identity, demonstrated that *Smed-dvl-1/2* RNAi animals had lost trunk and tail identities and were completely anteriorized (Fig. 1A). Staining with anti-*Smed- β -catenin2*, which

Author contributions: M.A.-C., E.S., and T.A. designed research; M.A.-C. and T.A. performed research; M.A.-C., E.S., and T.A. analyzed data; and M.A.-C. and T.A. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

Data deposition: The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database [accession nos. HQ141795 (*Smed-Dvl-1*), EH0141796 (*Smed-Dvl-2*), HQ141793 (*Smed-Div*), HQ141797 (*Smed-Vang-1*), and HQ141794 (*Smed-Vang-2*)].

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: tadell@ub.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1012090108/-DCSupplemental.

labels the gut epithelium (16), also showed that the gut lost its AP polarity in *Smed-dvl-1/2* RNAi planarians, resulting in a network of gut branches without a pharynx ($n = 7$ of 7) (Fig. 1A).

Immunocytochemistry with the panneural marker antisynapsin revealed that the cephalic ganglia (CG), which differentiate in the head region on the top of the ventral nerve cords (VNCs) in control animals, appeared as a set of isolated brain clusters around the entire periphery and were laterally displaced from the VNCs in *Smed-dvl-1/2* planarians ($n = 41$ of 41) (Fig. 1B). Note that the anterior transverse commissure (ATC), which connects the CG in controls (Fig. 1B), was absent and that the posterior ectopic brain was not only poorly differentiated and displaced but appeared unconnected to the original VNCs. Those displacements and disconnections of the brain are never observed after silencing *Smed- β -catenin1* (11) (Fig. 1B), demonstrating that in addition to its essential role in transducing canonical Wnt signaling, *Smed-dvl-1/2* exerts β -catenin-independent functions that are essential for proper brain morphogenesis.

Interestingly, despite the presence of brain morphology defects in *Smed-dvl-1/2* RNAi animals, differential expression of *SmedOtp* and *SmedOtxB* in the mediolateral axis of the brain (17) was observed (Fig. S2). Thus, functional domains of the brain appeared to remain conserved.

Silencing of *Smed-dvl-1/2* during homeostasis also resulted in fully anteriorized animals ($n = 31$ of 31) with ectopic discon-

nected brains ($n = 23$ of 23) (Fig. S3). The morphogenesis of the preexisting brain was unaffected, however, and ectopic eyes were present ($n = 16$ of 23). This is not surprising, because antiarrestin immunostaining also revealed the differentiation of photoreceptors after lower doses of *Smed-dvl-1/2* interference (Fig. S3).

To date, of the nine Wnts identified in *S. mediterranea*, *Smed-wnt5* is the only one that has been demonstrated to signal independent of β -catenin. It is expressed from the most external region of the CG and VNCs to the lateral ends of the planarian (14, 18, 19). Interestingly, silencing of *Smed-wnt5* also causes lateral expansion and displacement of the brain as well as the disappearance of the ATC ($n = 16$ of 18) (14, 18) (Fig. 1B). Consistent with the possibility that the displacements and disconnections observed in the brain of *Smed-dvl-1/2* RNAi animals are attributable to inhibition of signaling from *Smed-wnt5*, we found that silencing of *Smed-wnt5* together with *Smed-dvl-1/2* clearly enhanced the disconnection of the brain branches from the original VNCs observed in *Smed-dvl-1/2* RNAi planarians ($n = 9$ of 9) (Fig. 1B). Moreover, silencing of *Smed-wnt5* together with *Smed- β -catenin1* transformed the continuous brain of *Smed- β -catenin1* RNAi animals into a discontinuous and displaced brain that was strikingly similar to the one observed in *Smed-dvl-1/2* RNAi animals (Fig. 1B, higher magnification views). The ATC was present in those animals, however.

In summary, as in *Smed- β -catenin1* RNAi animals, *Smed-dvl-1/2* silencing abolishes the AP axis and leads to fully anteriorized animals. The CNS of those animals is poorly differentiated, however, and consists of a set of isolated and unconnected brain clusters from which eyes are unable to differentiate. *Smed-wnt5* appears to be responsible for most of the β -catenin-independent defects observed in the CNS of *Smed-dvl-1/2* RNAi planarians.

***Smed-dvl-1/2* Directs Neural Connectivity Through *Smed-wnt5* Signaling.** To gain further insight into the morphogenetic defects of *Smed-dvl-1/2* RNAi animals, we performed a comparative analysis of the regeneration of the CNS and visual axons of animals following *Smed- β -catenin1*, *Smed-wnt5*, and *Smed-evi* silencing, using anti-tubulin and anti-arrestin antibodies, respectively. *Smed-evi* is the planarian homolog of *evi/wls*, a transmembrane protein required for secretion of Wnt ligands, and silencing of the gene results in differentiation of a displaced CNS (14). In control animals, preexisting VNCs grow beneath the regenerating CG and completely overlap (20) (Figs. 1 and 2A and Movie S1). In contrast, in *Smed-dvl-1/2* RNAi planarians, the regenerating brain forms disconnected clusters that appear laterally displaced relative to the old VNCs ($n = 26$ of 41) (Fig. 2B and Movie S2). Likewise, in *Smed-evi* RNAi animals, the preexisting VNC failed to connect to the ectopic brain ($n = 14$ of 16) (Fig. 2C and Movie S3). The brain of *Smed-wnt5* RNAi animals showed essentially the same lateral displacement and disconnection between the old VNCs and the newly developed brain ($n = 11$ of 11). Thus, although the disaggregation of the brain is much more extreme following *Smed-dvl-1/2* silencing, it shares the main Wnt-5-dependent defects with *Smed-evi* RNAi animals (14) (Fig. 2D and Movie S4). In contrast, *Smed- β -catenin1* RNAi animals differentiate the brain just above the VNCs, as in control planarians (Fig. 2E and Movie S5).

Planarian eyes consist of two cell types: pigment cup cells and photosensitive cells. In control animals, visual axons from photosensitive cells project either ipsilaterally to the most medial domain of the brain or contralaterally to form the optic chiasm (21) (Fig. 2F). *Smed-dvl-1/2* interference leads to impaired photoreceptor regeneration in which there is no visible accumulation of photosensitive cells, and the visual axons, which appear dispersed among them, project in aberrant directions and never cross the midline ($n = 12$ of 12) (Fig. 2G). Although they are able to differentiate eyes, some of these defects are shared by *Smed-evi* ($n = 4$ of 4) and *Smed-wnt5* ($n = 8$ of 9) RNAi planarians (Fig. 2H and I). As expected, *Smed- β -catenin1* RNAi does not severely affect either eye regeneration or targeting of the visual axons ($n =$

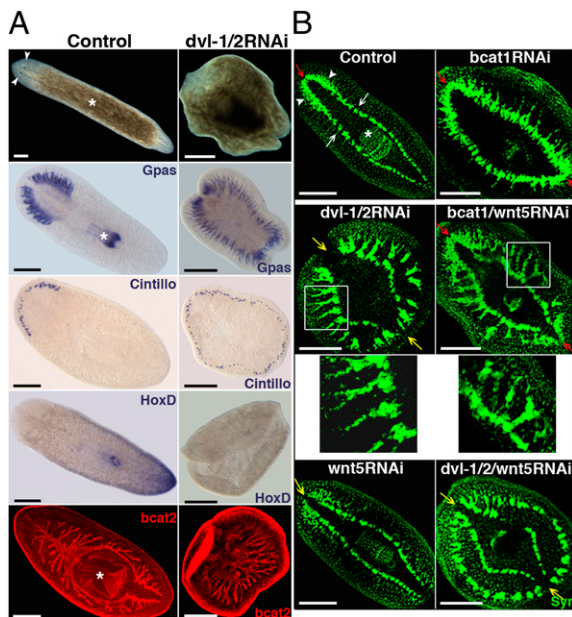


Fig. 1. Silencing of *dvl-1/2* generates “radial-like hypercephalized” animals with β -catenin-independent morphogenetic brain defects. (A) Stereomicroscopic view of live animals showing the radial shape and absence of eyes after *dvl-1/2* RNAi; the white asterisk and arrowheads indicate the pharynx and eyes, respectively. Analysis of brain branches (Gpas) and chemoreceptors (Cintillo) revealed the differentiation of ectopic anterior structures in *dvl-1/2* RNAi animals, whereas the posterior marker *HoxD* was absent. Anti-*bcat2* staining shows the lack of polarization of the gut branches after *dvl-1/2* RNAi. (B) Immunostaining with anti-Syn showing the organization of the ectopic neural structures generated by silencing *dvl-1/2*, *wnt5*, and *bcat1*, alone or in combination. In a control planarian, the CNS comprises bilobed CG (white arrowheads) connected by the ATC, which lies dorsal to the two VNCs (white arrows). Red and yellow arrows point to the position of the ATC (red when present and yellow when absent). White boxes indicate the area corresponding to the magnifications located just below. All images correspond to trunk pieces after 18–25 d of regeneration. The *bcat2* and anti-Syn images correspond to confocal z-projections. (Left) Anterior. *bcat1*, *Smed- β -catenin1*; *bcat2*, *Smed- β -catenin2*; *Cintillo*, *Smed-Cintillo*; *dvl-1/2*, *Smed-dvl-1/2*; *Gpas*, *Smed-Gpas*; *wnt5*, *Smed-wnt5*; *Syn*, synapsin. (Scale bar: 300 μ m).

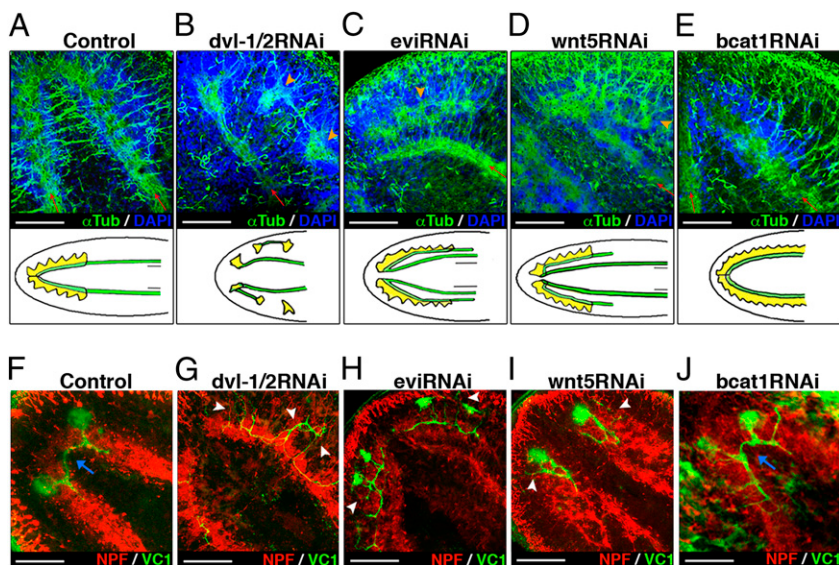


Fig. 2. *Dvl-1/2* and *wnt5* RNAi planarians share the main neural connection defects. (A–E) Anti- α Tub immunostaining reveals lateral displacement of the CNS in *dvl-1/2*, *evi*, and *wnt5* RNAi animals. Red arrows indicate the growth direction of preexisting VNCs, and orange arrowheads indicate the regenerating CNS when displaced. Schematic drawings under each image represent the different phenotypes: yellow indicates CG, and green indicates VNCs. (F–J) Double immunostaining with anti-VC1, which specifically labels the planarian visual system, and anti-NPF to visualize the CNS. White arrowheads indicate aberrant projections of visual axons, and blue arrows indicate the presence of contralateral projecting axons crossing the midline. All images correspond to trunk pieces after 18–25 d of regeneration. A, D, and F–I show anterior brain, whereas B, C, and E correspond to ectopic posterior brain. Anti- α Tub, anti-NPF, and anti-VC1 images correspond to confocal z-projections. Blue shows DAPI nuclear staining, which allows us to visualize the cell bodies of the CNS. (A, D, and F–I) Anterior (Left); (B, C, and E) anterior (Right). *dvl-1/2*, *Smed-dvl-1/2*; *evi*, *Smed-evi*; NPF, Neuropeptide F; *wnt5*, *Smed-wnt5*; α Tub, α -tubulin; VC1, arrestin. (Scale bar: 150 μ m.)

4 of 4) (Fig. 2J). These data support a β -catenin-independent role for *Smed-dvl-1/2* in eye differentiation and in visual axon targeting, probably through *Smed-wnt5* signaling.

In an attempt to understand the function of *Smed-wnt5* better, we analyzed CNS regeneration over time after silencing. As early as 3 d after amputation, the brain and the newly developed VNCs regenerate in a laterally displaced position. Moreover, some axons escape and project toward the lateral edge of the animal (Fig. 3A and Fig. S4A). Interestingly, at this time point of regeneration, *Smed-wnt5* is expressed externally to the growing VNCs (Fig. 3B), suggesting a role in preventing lateral expansion of the regenerating CNS. *Smed-wnt5* mRNA is not only expressed in the anterior blastema but is detected along the length of the VNCs up to the posterior blastema (Fig. 3C). Accordingly, in addition to the defects in the positioning of the brain, *Smed-wnt5* RNAi animals regenerated a defective tail; the two preexisting VNCs grow laterally displaced into the blastema and their axons, instead of forming two distinguishable structures, appeared to separate and project in aberrant directions (Fig. 3D, Fig. S4B, and Movies S6 and S7). Moreover, the VNCs became more tangled and displaced as regeneration proceeded, and even the lateral nerves, which project from the VNCs to the edge of the animal in control animals, appeared extremely disorganized (Fig. S4C and D). Antisynapsin immunostaining of these regenerating tails further demonstrates the lateral expansion and disorganization of the neuronal synapses (Fig. 3D).

Our results are consistent with the suggestion that *Smed-wnt5* defines the planarian mediolateral axis (18), at least with regard to the positioning of the neural structures. Although the molecular mechanisms through which *Smed-wnt5* regulates the positioning of neural structures remain to be elucidated, it is likely to act together with *slit*, because *Smed-slit* silencing leads to midline collapse of the CNS (22). One possibility is that *Smed-wnt5* controls the position of the regenerating CNS along the mediolateral axis by restricting the migration of neural precursor cells to more medial regions. Alternatively, given the evolutionarily conserved role of Wnt5 in providing repulsive guidance information to axons (23, 24), *Smed-wnt5* could restrict the direction of the axon growth and establish the position of the newly developed neural tissues.

In summary, the lateral displacement and disconnections of the CNS as well as the aberrant projections of the visual axons observed in *Smed-dvl-1/2* RNAi animals are shared with *Smed-evi* and *Smed-wnt5* RNAi animals and are not observed after *Smed- β -catenin1* interference. These results suggest that the

mediolateral neural connection defects observed in *Smed-dvl-1/2* RNAi animals could reflect the signal input of *Smed-wnt5*, which is essential for the mediolateral patterning of neural structures.

Functional Specialization of *Smed-dvl-1* and *Smed-dvl-2*: *Smed-dvl-2* Is Involved in the Stabilization of Intracellular β -Catenin.

When analyzing the function of the two *Smed-dvl* paralogs separately, *Smed-dvl-1* RNAi planarians appeared normal. Molecular markers revealed the absence of the ATC, however, along with impaired regeneration of visual axons similar to that previously described for *Smed-wnt5* RNAi planarians (Figs. 1B and 4B). In contrast, regenerating trunks of *Smed-dvl-2* RNAi animals had multiple defects. During anterior regeneration, the CG as well as the visual axons expanded posteriorly, together with the development of ectopic eyes (Fig. 4C), which were not well differentiated. The two anterior eyes

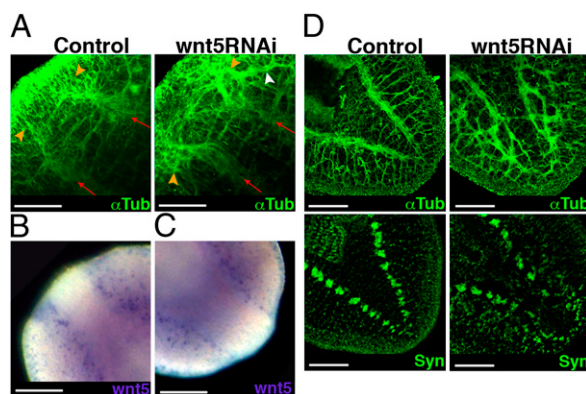


Fig. 3. *Wnt5* expression supports its role in restricting CNS positioning along the mediolateral axis. (A) Anti- α Tub staining reveals lateral displacement of the anterior CNS after 3 d of regeneration in *wnt5* RNAi animals. Red arrows indicate the growth direction of preexisting VNCs, and orange arrowheads indicate the regenerating CNS. The white arrowhead indicates lateral aberrant projection of some axons. Expression of *wnt5* at 3 d after amputation in anterior (B) and posterior (C) blastemas. (D) Anti- α Tub and anti-Syn staining shows the disorganization of the axon projections and connections in the 18-d-old regenerated tail of a *wnt5* RNAi planarian. All images correspond to regenerating trunk pieces. Anti- α Tub and anti-Syn images correspond to confocal z-projections. (Left) Anterior. *wnt5*, *Smed-wnt5*; Syn, synapsin; α Tub, α -tubulin. (Scale bar: 150 μ m.)

exhibited clear asymmetry in terms of the degree of differentiation and AP position ($n = 258$ of 272) (Fig. 4C, live animals).

Posterior regeneration was also affected in *Smed-dvl-2* RNAi animals. Antisynapsin and anti-*Smed-β-catenin2* staining revealed the development of ectopic pharynges. Although their orientation varied, it was always located posterior to the original one. To gain further insights into this phenotype, we compared planarians that had regenerated for less than 30 d with those that had regenerated for longer periods (Fig. S5A). In the first group, most ectopic pharynges were orientated in the same direction as the original one (69%) (Fig. 4C'). Longer periods of regeneration led to a significant increase in the proportion of ectopic pharynges with the opposite orientation (from 3% to 56%) (Fig. 4C''). Interestingly, the orientation of the ectopic pharynges was closely linked to the gradual anteriorization of *Smed-dvl-2* RNAi animals. Thus, when the pharynx had the same orientation as the original one, the VNCs remained unconnected to the posterior end (Fig. 4C'). When the ectopic pharynx had an opposite orientation, however, *Smed-dvl-2* RNAi planarians had either a “no-tail” phenotype with closure and thickening of the VNCs (Fig. 4C''), similar to the phenotype described after low doses of *Smed-β-catenin1* silencing (63%) (11), or the appearance of a posterior brain (37%) (Fig. 4C''').

In situ hybridization with the posterior identity marker *Smed-AbdBA* and the central marker *Smed-TCEN* revealed a significant reduction in tissue with a posterior identity after *Smed-dvl-2* knockdown (Fig. S5B). Note that, as with anterior structures, *Smed-AbdBA* expression was asymmetrical ($n = 5$ of 12). These data, together with the observation that nearly 40% ($n = 73$ of 188) of the head fragments become biheaded after *Smed-dvl-2* RNAi treatment (Fig. S5C), demonstrate that *Smed-dvl-2* transduces a β -catenin-dependent Wnt signaling.

To explain the overall phenotype of *Smed-dvl-2* RNAi animals, we hypothesized that a low-level inhibition of *Smed-β-catenin1* activity leads to displacement of anterior and central identity toward the posterior, with posterior identity considerably reduced or switched to anterior after a long period of silencing (Fig. S5D). Accordingly, very low-dose RNAi for *Smed-β-catenin1* partially reproduced the phenotype caused by *Smed-dvl-2* knockdown. In most *Smed-β-catenin1* RNAi planarians that did not regenerate an ectopic posterior head, the VNCs were disconnected posteriorly (74%, $n = 30$), and half of them developed posterior ectopic mouths accompanied by pharyngeal primordia (Fig. 4D).

Interestingly, silencing of *Smed-dvl-2* in intact animals resulted in the differentiation of ectopic brain branches toward the posterior, which were unconnected to the original brain. The pharynx

was also displaced posteriorly, and the VNCs were disconnected at the posterior end (Fig. S5E). The overall phenotype of intact planarians is consistent with the hypothesis that *Smed-dvl-2* causes a slight reduction in *Smed-β-catenin1* activity that leads to posterior displacement of more anterior identities.

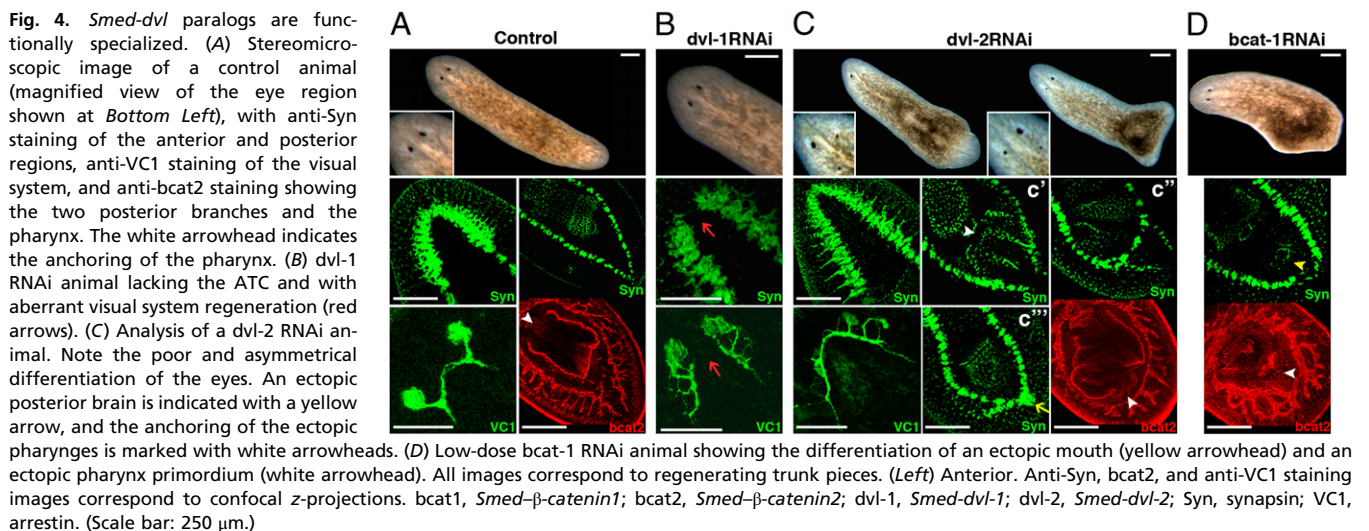
Whereas most animals develop a complete ectopic pharynx after *Smed-dvl-2* silencing, very low doses of *Smed-β-catenin1* RNAi only resulted in a complete second pharynx in 1 of 30 animals. The capacity to differentiate ectopic pharynges could thus involve a β -catenin-independent role of *Smed-dvl-2*. Conversely, *Smed-dvl-2* silencing led to eye differentiation defects different from those observed after *Smed-evi/wls* or *Smed-wnt5* silencing (14) (Fig. S6), suggesting that this *Smed-dvl-2* activity may be independent of Wnt. This would be consistent with the failure of eye differentiation observed in *Smed-dvl-1/2* RNAi but not in *Smed-evi* or *Smed-β-catenin1/wnt5* RNAi animals (Fig. S6).

Our results demonstrate a functional specialization of the *Smed-dvl* paralogs in which only *Smed-dvl-2* appears to be involved in β -catenin-dependent signal transduction. Accordingly, the phenotypes described after silencing canonical Wnts, such as *Smed-wnt11-2*, *Smed-wnt-1*, and *Smed-Wnt11-6*, are clearly reproduced after *Smed-dvl-2* silencing. Conversely, *Smed-dvl-1* seems to transduce some of the noncanonical branches in which *Smed-wnt5* is involved. Nevertheless, comparison of the strong phenotype observed after *Smed-dvl-1/2* silencing with the phenotypes after their individual silencing reveals functional redundancy, as described in vertebrates (3). Further studies will elucidate whether, in a WT situation, both paralogs are involved in signal transduction for a single Wnt ligand.

***Smed-dvl-2* Functions Alongside *Smed-vang-1/2* and *Smed-div* as a PCP Network Component and Is Crucial for the Apical Positioning of the Basal Body in Epithelial Cells.**

The epithelium of planarians is composed of mucociliary cells from which multiple motile cilia emerge (25, 26). To address whether *Smed-dvl-1/2* functions as a component of the PCP network, we analyzed the polarization of the ventral epithelium after *Smed-dvl-1/2* interference. Anti- α -tubulin staining revealed a reduction in the density of cilia and a loss of polarization after *Smed-dvl-2* (Fig. 5A) and *Smed-dvl-1/2* RNAi but never after *Smed-dvl-1* silencing.

It has long been established that planarian movement is governed by ventral motile cilia and by a muscle network (27). In *Smed-dvl-2* RNAi animals, movement appeared to be mediated by muscle contraction and the gliding movement mediated by cilia was absent (Movies S8 and S9). This “inching” behavior has also been described following silencing of *SmedIguana*, which is in-



involved in ciliogenesis (28), and silencing of the structural proteins of the cilia, *Smed-ift88* and *Smed-kif3a* (26). Thus, *Smed-dvl-2* RNAi animals show fewer, shorter, and less well-organized cilia, which are not fully functional.

It has been reported that Dvl controls the apical positioning of the basal bodies and the planar polarization of the cilia in the epithelium of *Xenopus* embryos, which is a mucous and multiciliated epithelium similar to that of planarians (8). Because the positioning of the basal bodies is governed by actin assembly, we analyzed the role of *Smed-dvl-1/2* in the assembly of the actin network and in the docking of the basal bodies in the planarian epithelium. The actin filaments are arranged as a network that defines each cell border and contains regular openings to allow mucus secretion by the rhabdomeres (25). Silencing of *Smed-dvl-2* dramatically affected the arrangement of this network, resulting in an irregular net in which the cell borders and rhabdomere openings were not visible (Fig. 5A). Furthermore, 3D reconstructions of α -tubulin and actin staining in cross-section showed that cilia emerge from the apical-most side of the cells in WT animals and that the actin filaments are also located apically on top of the nucleus (Fig. 5A). In contrast, after *Smed-dvl-2* silencing, microtubules fail to localize to the apical surface and actin filaments appear disorganized and embedded in the nuclear layer (Fig. 5A).

Next, we used electron microscopy to analyze the ultrastructure of the cilia and their docking to the epithelial cells in *Smed-dvl-2* RNAi animals. SEM revealed a decrease in ciliary density and a loss of ciliary polarization in *Smed-dvl-2* RNAi animals, exactly as seen with α -tubulin staining (Fig. 5A). Transmission electron microscopy (TEM) in control planarians demonstrated that the basal bodies of the cilia are docked at the apical side of the epithelial cells, from which the ciliary axonemes project. In contrast, *Smed-dvl-2* RNAi animals had fewer and shorter cilia and also had isolated basal bodies, with the typical 9 + 0 structure, inside the cytoplasm, a feature that we never observed in control animals. Dvl has been implicated in secretory vesicle trafficking through its association with the exocyst component Sec8 (8). Accordingly, in control animals, basal bodies are visible inside vesicles, whereas after *Smed-dvl-2* silencing, a high concentration of empty vesicles was detected in the apical cytoplasm, suggesting that the failure of the basal bodies to dock could be a consequence of defective vesicle trafficking. Taken together, these results demonstrate that *Smed-dvl-2* is essential for actin network assembly and apical positioning of the cilia. This may be mediated by an effect of Dvl on vesicle trafficking, which has been reported previously in the context of the PCP pathway (8). A mechanism directing Dvl lo-

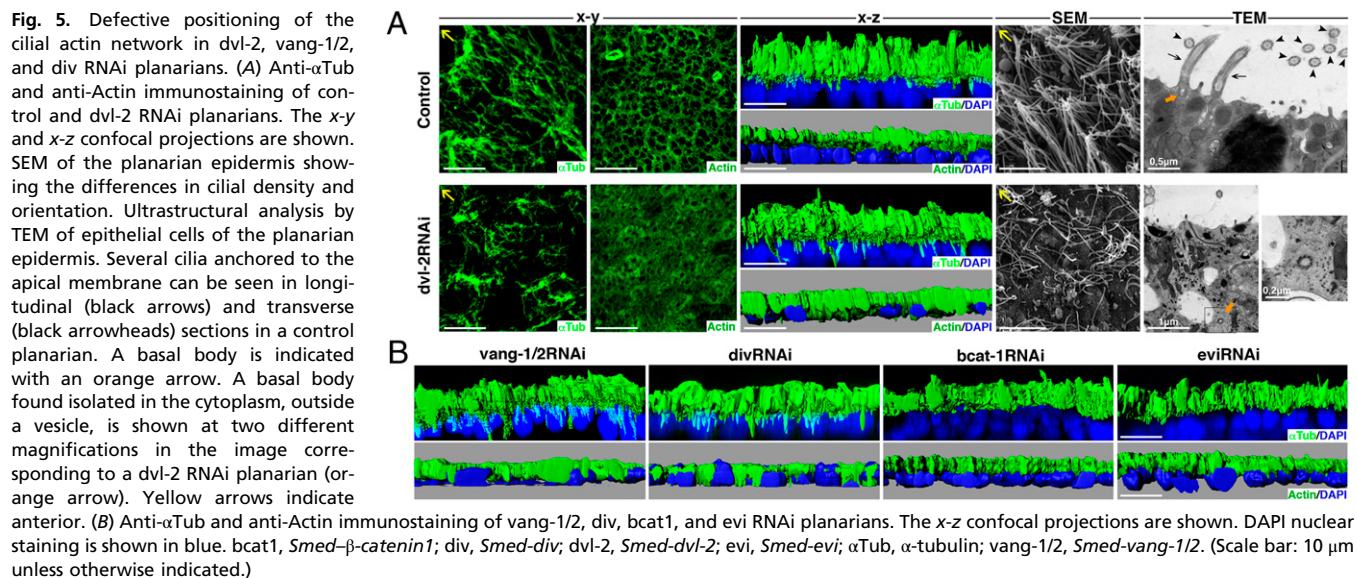
calization to the plasma membrane, such as the one exerted by Syndecan-4 during convergent and extension movements in *Xenopus* embryos (29), could be also involved.

To test whether the defects observed in the apical positioning of the cilia are governed by a PCP network in our model, we characterized *Smed-vang* and *Smed-div*, other components of the core PCP network. We have identified two homologs of Vangl2 in the genome of *S. mediterranea*, *Smed-vang-1* and *Smed-vang-2*, and one homolog of Div/Dgo, *Smed-div* (Fig. S7, sequence analysis and mRNA expression pattern). Analysis of α -tubulin and actin filaments revealed that simultaneous silencing of both *Smed-vang* paralogs (*Smed-vang-1/2*) and *Smed-div* led to disorganization of the cilia and actin network within the plane of the epithelium (Fig. S8A). Furthermore, the apical positioning of α -tubulin and the actin network was similar to that observed for *Smed-dvl-2* (Fig. 5B). As expected, treated animals also displayed the impaired movement governed by muscle instead of cilia (Movies S10 and S11). Interestingly, when the same analysis was done in *Smed- β -catenin1* and *Smed-evi* RNAi animals, the cilia and the actin network were correctly organized (Fig. S8B) and located at the apical-most part of the ventral epithelial cells (Fig. 5B).

Summarizing, the defects in actin and α -tubulin apical organization caused by silencing *Smed-dvl-2* were reproduced by silencing the two core components of the PCP network, *Smed-vang-1/2* and *Smed-div*, indicating that *Smed-dvl-2* may function as a component of the PCP network. Furthermore, the effect was independent of β -catenin signaling and Wnt ligand activation. Although a common feature of PCP core proteins is their asymmetrical localization inside the cells and their role as organizers of the actin cytoskeleton, a dependence on prior Wnt activation has only been found in vertebrates (30, 31).

Following *Smed-vang-1/2* or *Smed-div* RNAi, treated planarians had an apparently normal appearance *in vivo* and immunostaining with antisynapsin revealed no apparent defects in brain morphogenesis (Fig. S8C). Thus, the PCP core network appears not to be involved in the effects of *Smed-dvl-1/2* on brain morphogenesis.

Our data suggest that a PCP network acts in the multiciliated epithelium of planarians to control apical docking of the basal bodies and are consistent with a mechanism involving the activation of the actin regulator RhoA, as reported for the multiciliated epithelial cells of *Xenopus* embryos (8). Further analysis with markers for the ciliary rootlet or basal bodies will be necessary to confirm the involvement of the PCP network in the final polarization of the cilia in the planarian epithelium.



In conclusion, our data represent functional evidence that Dvl, as a component of a PCP network, is essential for proper positioning of the actin cytoskeleton and for the docking of basal bodies to the apical side of epithelial cells in invertebrates. Moreover, although Vangl2 and Div proteins have been shown to localize to the base of the cilia in vertebrate epithelial cells (8, 32, 33), we provide functional evidence that those core members of the PCP pathway are also required.

Conclusions

Analysis of the complex phenotype generated after silencing of *Smed-dvls* indicates their role in at least three different pathways. First, they are involved in β -catenin-dependent signaling, which has been broadly documented as functionally conserved in the establishment of the AP axis. Second, *Smed-dvls* are required for proper neural connectivity and mediolateral patterning of the planarian CNS via β -catenin-independent/Wnt-dependent signaling. Future experiments must address whether this *Smed-wnt5*-mediated role occurs through the restriction of cell migration or via the control of axon growth through the *wnt5-drl*/RYK pathway, which is already known to be involved in axon guidance. Finally, *Smed-dvl-2* and the two PCP core elements *Smed-vang-1/2* and *Smed-div* control apical positioning of the cilia basal body in a β -catenin- and Wnt-independent manner during planarian regeneration. Dvl, through its active role in actin remodeling, is required for proper vesicle trafficking of the basal bodies, and therefore for ciliogenesis and, subsequently, planar polarization of the cilia. Taking into account the fact that Vangl2 and Div are located in the base of the cilia (32, 33) and that, according to our results, they are required for basal body docking, we propose that these two PCP core elements function together with Dvl to regulate directional trafficking of the basal bodies and polarization of the cilia within the epithelial sheet.

Materials and Methods

Organisms. Planarians of the asexual strain of *S. mediterranea* were collected in Montjuich, Barcelona, Spain and were maintained as described (34).

Whole-Mount in Situ Hybridization. Gene expression analysis was carried out essentially as described (17). Details are provided in *SI Materials and Methods*.

RNAi Silencing. For regeneration experiments, animals were amputated pre- and postpharyngeally after injection of dsRNA on 3 consecutive days (one round of injection). In the case of *Smed-wnt5*, *Smed-evil/Wntless*, *Smed-vang-1/2*, and *Smed-div*, we injected a second round of dsRNA 1 wk after the first round. For low-dose RNAi experiments, we injected dsRNA just 1 d before amputation. For homeostasis experiments, we followed the same protocol of injection but without amputation. Details are provided in *SI Materials and Methods*.

Motility Analysis. Details are provided in *SI Materials and Methods*.

Immunostaining and Confocal Imaging. Immunostaining was carried out as described (22). Details are provided in *SI Materials and Methods*.

Electron Microscopy. SEM and TEM were carried out essentially as described (35). Details are provided in *SI Materials and Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank all members of the F. Cebrià and E. Saló groups, especially M. D. Molina and M. Iglesias, J. M. Martín-Durán, and A. Repiso, for discussion and suggestions; F. Cebrià for providing Cintillo and anti-Neuropeptide F; M. Iglesias for providing *Smed-Gpas* clones; H. Orri and Prof. K. Watanabe for providing antiarrestin; M. Handberg-Thorsager for providing the *SmedOtp* riboprobe; M. Bosch for helping with confocal analysis; N. Cortadellas and A. García for helping with electron microscopy; and I. Patten for advice on English style in a previous version. The monoclonal antibodies anti-SYNORF1, anti- α -tubulin and antiactin JLA20 were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by the Department of Biological Sciences, University of Iowa, Iowa City, IA. This work was supported by Grant BFU2008-01544 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (to M.A.-C.) and Grant 2009SGR1018 from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (to E.S.). M.A.-C. received a Formación de Personal Investigador fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia.

- Angers S, Moon RT (2009) Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:468–477.
- Komiya Y, Habas R (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4:68–75.
- Gao C, Chen YG (2010) Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22:717–727.
- Petersen CP, Reddien PW (2009) Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 139:1056–1068.
- Vladar EK, Antic D, Axelrod JD (2009) Planar cell polarity signaling: The developing cell's compass. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a002964.
- Montcouquiol M, Crenshaw EB, III, Kelley MW (2006) Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu Rev Neurosci* 29:363–386.
- McNeill H (2010) Planar cell polarity: Keeping hairs straight is not so simple. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a003376.
- Park TJ, Mitchell BJ, Abitua PB, Kintner C, Wallingford JB (2008) Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat Genet* 40:871–879.
- Morgan TH (1898) Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. *Arch Entw Mech Org* 7:364–397.
- Saló E (2006) The power of regeneration and the stem-cell kingdom: Freshwater planarians (Platyhelminthes). *Bioessays* 28:546–559.
- Iglesias M, Gomez-Skarmeta JL, Saló E, Adell T (2008) Silencing of *Smed-beta-catenin1* generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* 135:1215–1221.
- Gurley KA, Rink JC, Sánchez Alvarado A (2008) β -catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science* 319:323–327.
- Petersen CP, Reddien PW (2008) *Smed-beta-catenin-1* is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. *Science* 319:327–330.
- Adell T, Saló E, Boutros M, Bartscherer K (2009) *Smed-Evi/Wntless* is required for β -catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration. *Development* 136:905–910.
- De Robertis EM (2010) Wnt signaling in axial patterning and regeneration: Lessons from planaria. *Sci Signal* 3:pe21.
- Chai G, et al. (2010) Complete functional segregation of planarian beta-catenin-1 and -2 in mediating Wnt signaling and cell adhesion. *J Biol Chem* 285:24120–24130.
- Umesono Y, Watanabe K, Agata K (1999) Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes. *Dev Genes Evol* 209:31–39.
- Gurley KA, et al. (2010) Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Dev Biol* 347:24–39.
- Marsal M, Pineda D, Saló E (2003) Gtwnt-5 a member of the wnt family expressed in a subpopulation of the nervous system of the planarian *Girardia tigrina*. *Gene Expr Patterns* 3:489–495.
- Cebrià F, Newmark PA (2007) Morphogenesis defects are associated with abnormal nervous system regeneration following roboA RNAi in planarians. *Development* 134:833–837.
- Okamoto K, Takeuchi K, Agata K (2005) Neural projections in planarian brain revealed by fluorescent dye tracing. *Zool Sci* 22:535–546.
- Cebrià F, Guo T, Jopek J, Newmark PA (2007) Regeneration and maintenance of the planarian midline is regulated by a slit orthologue. *Dev Biol* 307:394–406.
- Bovolenta P, Rodriguez J, Esteve P (2006) Frizzled/Ryk mediated signalling in axon guidance. *Development* 133:4399–4408.
- Endo Y, Rubin JS (2007) Wnt signaling and neurite outgrowth: Insights and questions. *Cancer Sci* 98:1311–1317.
- Smale LR, Blankespoor HD (1978) The epidermis and sensory organs of *Dugesia tigrina* (Turbellaria: Tricladida). A scanning electron microscope study. *Cell Tissue Res* 193:35–40.
- Rompola P, Patel-King RS, King SM (2010) An outer arm Dynein conformational switch is required for metachronal synchrony of motile cilia in planaria. *Mol Biol Cell* 21:3669–3679.
- Reddien PW, Bermange AL, Murfitt KJ, Jennings JR, Sánchez Alvarado A (2005) Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Dev Cell* 8:635–649.
- Glazer AM, et al. (2010) The Zn finger protein Iguana impacts Hedgehog signaling by promoting ciliogenesis. *Dev Biol* 337:148–156.
- Muñoz R, Moreno M, Oliva C, Orbenes C, Larrain J (2006) Syndecan-4 regulates non-canonical Wnt signalling and is essential for convergent and extension movements in *Xenopus* embryos. *Nat Cell Biol* 8:492–500.
- Lawrence PA, Casal J, Struhl G (2002) Towards a model of the organisation of planar polarity and pattern in the *Drosophila* abdomen. *Development* 129:2749–2760.
- Chen WS, et al. (2008) Asymmetric homotypic interactions of the atypical cadherin flamingo mediate intercellular polarity signaling. *Cell* 133:1093–1105.
- Itoh K, Jenny A, Mlodzik M, Sokol SY (2009) Centrosomal localization of Diversin and its relevance to Wnt signaling. *J Cell Sci* 122:3791–3798.
- Ross AJ, et al. (2005) Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37:1135–1140.
- Molina MD, Saló E, Cebrià F (2007) The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians. *Dev Biol* 311:79–94.
- Martin-Durán JM, Amaya E, Romero R (2010) Germ layer specification and axial patterning in the embryonic development of the freshwater planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev Biol* 340:145–158.

Supporting Information

Almuedo-Castillo et al. 10.1073/pnas.1012090108

SI Materials and Methods

Isolation, Cloning, and Sequencing of *S. mediterranea* Genes. Planarian homologs of the Wnt pathway were identified from the *S. mediterranea* genomic database (Washington University, St. Louis, MO) through a BLAST search. The corresponding full-length transcripts were amplified by rapid amplification of cDNA ends using a GeneRacer Kit (Invitrogen).

Whole-Mount in Situ Hybridization. Gene expression analysis was carried out using an Intavis InsituPro hybridization robot. Digoxigenin-labeled riboprobes for *Smed-dvl-1*, *Smed-dvl-2*, *Smed-vang-1*, *Smed-vang-2*, *Smed-div*, *SmedOtxB*, *SmedOtp* (kindly provided by Mette Handberg-Thorsager, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany), *Smed-Gpas*, *Smed-TCEN49* (1), *Smed-HoxD* (1), *Smed-AbdBA* (1), and *Smed-Cintillo* (2) were synthesized using an RNA in vitro transcription kit (Roche). Primer details are available on request. Images were captured with a Leica DFC300FX camera.

RNAi Silencing. dsRNA was synthesized by in vitro transcription (Roche) and injected into planarians as described previously (3). Primer details are available on request. All the dsRNAs were injected at the same concentration (450–500 ng/μL) except for *Smed-vang-1/2* and *Smed-div* dsRNAs, which were injected at a concentration of 800 ng/μL for the *Smed-dvl-1/2* dose-dependent experiment, and *Smed-β-catenin1* (*bcat1*) dsRNA, which was injected at a concentration of 300 ng/μL in the low-dose RNAi experiment. For regeneration experiments, animals were amputated pre- and postpharyngeally after 3 consecutive days of injections (one round of injection). In the case of *Smed-wnt5*, *Smed-evi/Wntless*, *Smed-vang-1/2*, and *Smed-div*, we injected a second round of dsRNA 1 wk after the first round. For low-dose RNAi experiments, we injected dsRNA just 1 d before amputation. For homeostasis experiments, we followed the same protocol of injection but without amputation. All specimens were analyzed between 3 and 6 wk after amputation. Control animals were injected with water or GFP (in the case of combinatorial experiments).

Motility Analysis. Live animals were placed in Petri dishes and left until control planarians adapted to the surface and began to display normal motility. Animals were placed in the center of the dish with a Pasteur pipette, and a light stimulus was then introduced. Movement away from the light was recorded with a Zeiss Stemi SV6 stereomicroscope.

Immunostaining and Confocal Imaging. Immunostaining was carried out as described elsewhere (4). The following primary antibodies were used: antiarrestin (1:15,000; kindly provided by Hidefumi Orii, Himeji Institute of Technology, Hyogo, Japan), anti-synapsin (anti-SYNORF1, 1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank), anti-α-tubulin (1:20; Developmental Studies Hybridoma Bank), antiactin JLA20 (undiluted; Developmental Studies Hybridoma Bank), anti-*Smed-β-catenin2* (1:2,000) (5) and anti-Neuropeptide F (NPF; 1:1,000) (6). Note that differences in the expression pattern of NPF compared with previous reports (7) are explained by the fixation protocol used. When analyzing cilia, we used cavity slides to avoid squashing the cilia. Confocal laser scanning microscopy was performed with a Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik) adapted for an inverted microscope (DMIRB; Leitz). A region located ~1 mm from the anterior end of the planarian was chosen for imaging ventral cilia and the actin network. To build 3D reconstructions, confocal sections were deconvolved using Huygens Deconvolution Software (Scientific Volume Imaging) and processed using Imaris Software (Bitplane).

Electron Microscopy. For SEM, animals were encapsulated to avoid manipulation problems and pretreated carefully with 2% L-cysteine, pH 7.2, to clear the mucus present on the surface. Animals were fixed in phosphate-buffered 2.5% (vol/vol) glutaraldehyde. For TEM, animals were fixed in phosphate-buffered 2.5% (vol/vol) glutaraldehyde and 4% (weight/vol) paraformaldehyde.

- Iglesias M, Gomez-Skarmeta JL, Saló E, Adell T (2008) Silencing of *Smed-beta-catenin1* generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* 135:1215–1221.
- Oviedo NJ, Newmark PA, Sánchez Alvarado A (2003) Allometric scaling and proportion regulation in the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev Dyn* 226:326–333.
- Sánchez Alvarado A, Newmark PA (1999) Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5049–5054.
- Cebrià F, Guo T, Jopek J, Newmark PA (2007) Regeneration and maintenance of the planarian midline is regulated by a slit orthologue. *Dev Biol* 307:394–406.
- Chai G, et al. (2010) Complete functional segregation of planarian beta-catenin-1 and -2 in mediating Wnt signaling and cell adhesion. *J Biol Chem* 285:24120–24130.
- Maule AG, et al. (1992) Neuropeptide F (*Moniezia expansa*): Localization and characterization using specific antisera. *Parasitology* 105:505–512.
- Cebrià F (2008) Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: An immunocytochemical study. *Neurosci Res* 61:375–384.

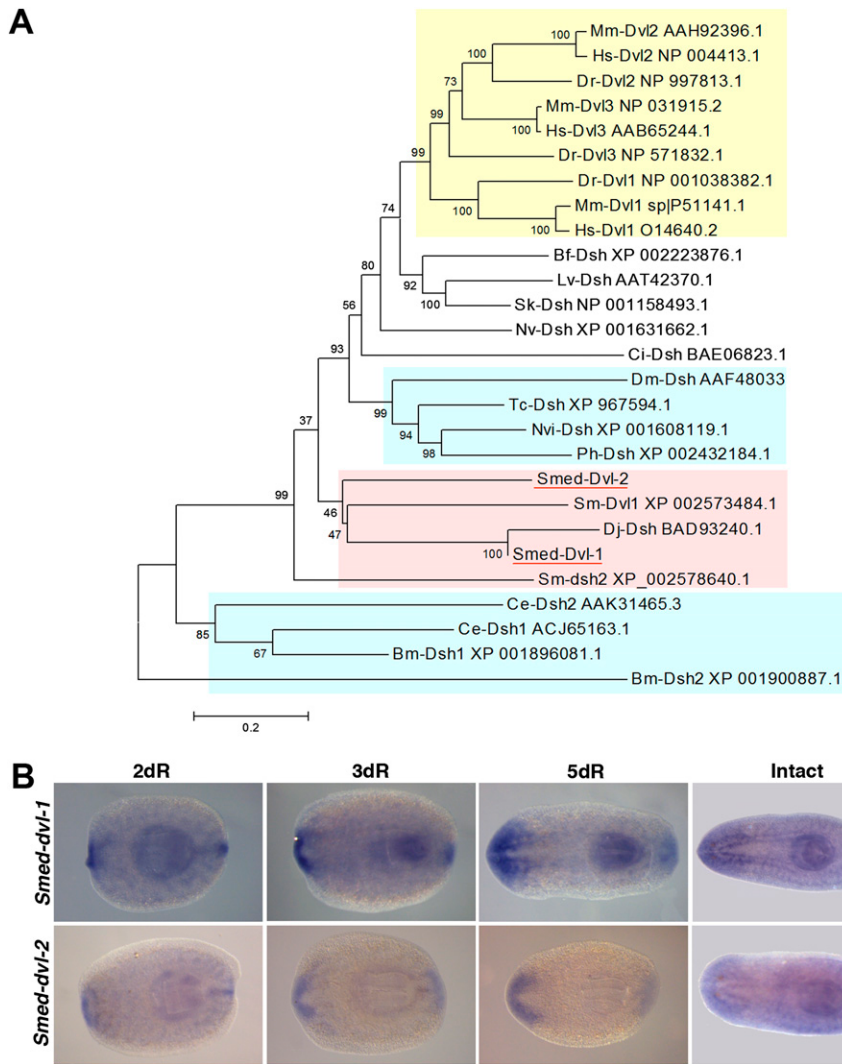


Fig. S1. Phylogenetic analysis and mRNA expression pattern of *Smed-dvl* paralogs. (A) Phylogenetic tree of Dvl proteins inferred from the accurate multiple amino acid sequence of Dvl proteins obtained using MAFFT, version 6. The phylogenetic tree was prepared using MEGA, version 3.1. Vertebrates are labeled in yellow, ecdysozoans in blue, and lophotrochozoans in pink. Accession numbers of each protein sequence are indicated in the tree. Accession numbers of *Smed-Dvl-1* and *Smed-Dvl-2* corresponding to the complete mRNA coding sequence are EU130787.1 and EU130788.1, respectively. Bf, *Branchiostoma floridae*; Bm, *Brugia malayi*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Ci, *Ciona intestinalis*; Dj, *Dugesia japonica*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Dr, *Danio rerio*; Hs, *Homo sapiens*; Lv, *Lytechinus variegatus*; Mm, *Mus musculus*; Nv, *Nematostella vectensis*; Nvi, *Nasonia vitripennis*; Ph, *Pediculus humanus corporis*; Sk, *Saccoglossus kowalevskii*; Sm, *Schistosoma mansoni*; Smed, *Schmidtea mediterranea*; Tc, *Tribolium castaneum*. (B) In intact animals, *Smed-dvl-1* and *Smed-dvl-2* are expressed in the CG, VNCs, pharynx, and parenchyma. During regeneration, expression of both genes is detected from 2dR; they are expressed in the anterior and posterior blastemas and in the regenerating CNS. It is important to note that *Smed-dvl-1* is expressed at much higher levels, particularly in the anterior region of the animal and in the pharynx. (Left) Anterior. dR, days after cutting. (Scale bar: 400 μm.)

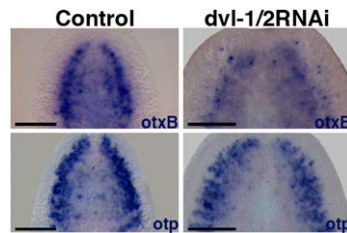


Fig. S2. Conservation of different functional domains in the brain of *dvl-1/2* RNAi animals. The expression pattern of the homeobox genes *otp* and *otxB* reveals the conservation of different functional domains despite the abnormalities in brain morphogenesis after silencing of *Smed-dvl-1/2*. (Upper) Anterior. *dvl-1/2*, *Smed-dvl-1/2*; *otp*, *Smed-Otp*; *otxB*, *Smed-OtXB*. (Scale bar: 200 μm.)

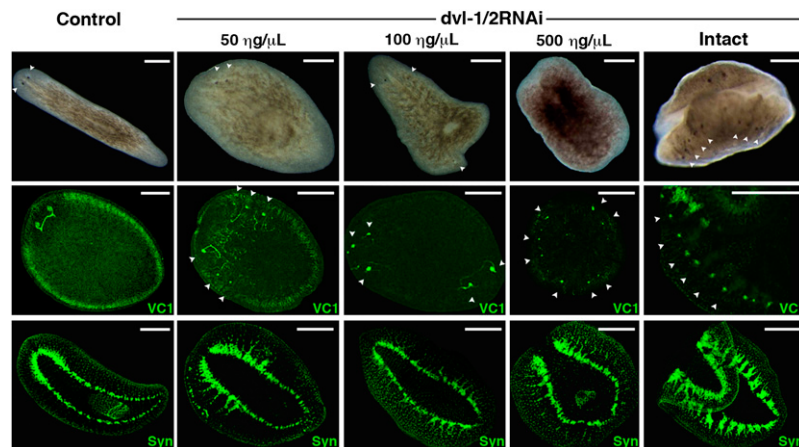


Fig. S3. Eye differentiation is not completely abolished during homeostasis or in regenerating animals after low doses of *dvl-1/2* RNAi. Stereomicroscopic views of live regenerating and intact animals and of anti-VC1 immunostaining show the development of aberrant ectopic eyes (white arrowheads). In regenerating animals, the eyes are asymmetrically distributed and visual axons are absent or abnormally oriented. Eye and visual axon differentiation is affected in a dose-dependent manner. Anti-Syn staining reveals that during regeneration, the progression of the anteriorization event also occurs in a dose-dependent manner. Anti-Syn and anti-VC1 images correspond to confocal z-projections. (Left) Anterior. *dvl-1/2*, *Smed-dvl-1/2*; Syn, synapsin; VC1, arrestin. (Scale bar: 400 μ m.)

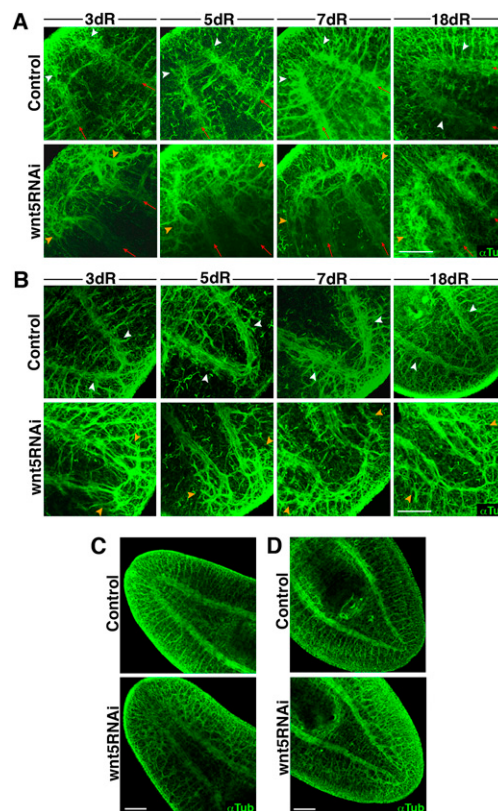


Fig. S4. Time course of CNS regeneration after *wnt5* silencing. Anterior regeneration (A) and posterior regeneration (B). Anti- α Tub staining reveals that silencing of *wnt5* leads to lateral displacement of the anterior CNS already after 3dR. As regeneration proceeds, lateral expansion and disaggregation of the CNS become much more apparent. Red arrows indicate the growth direction of preexisting VNCs, white arrowheads indicate regenerating CNS in a control situation, and orange arrowheads indicate aberrant displacements of the regenerating CNS in the case of *wnt5* RNAi planarians. Anterior (C) and posterior (D) regions of a 20-d-old regenerated trunk. Anti- α Tub staining allows us to visualize the lateral nerves, which project from the VNCs toward the edge of control animals. In contrast, after silencing *wnt5*, these lateral nerves fail to branch properly toward the edge of the animal and appear disorganized. All images correspond to regenerating trunk pieces. Anti- α Tub images correspond to confocal z-projections. (Left) Anterior. dR, days after cutting; α Tub, α -tubulin; *wnt5*, *Smed-wnt5*. (Scale bar: 150 μ m.)

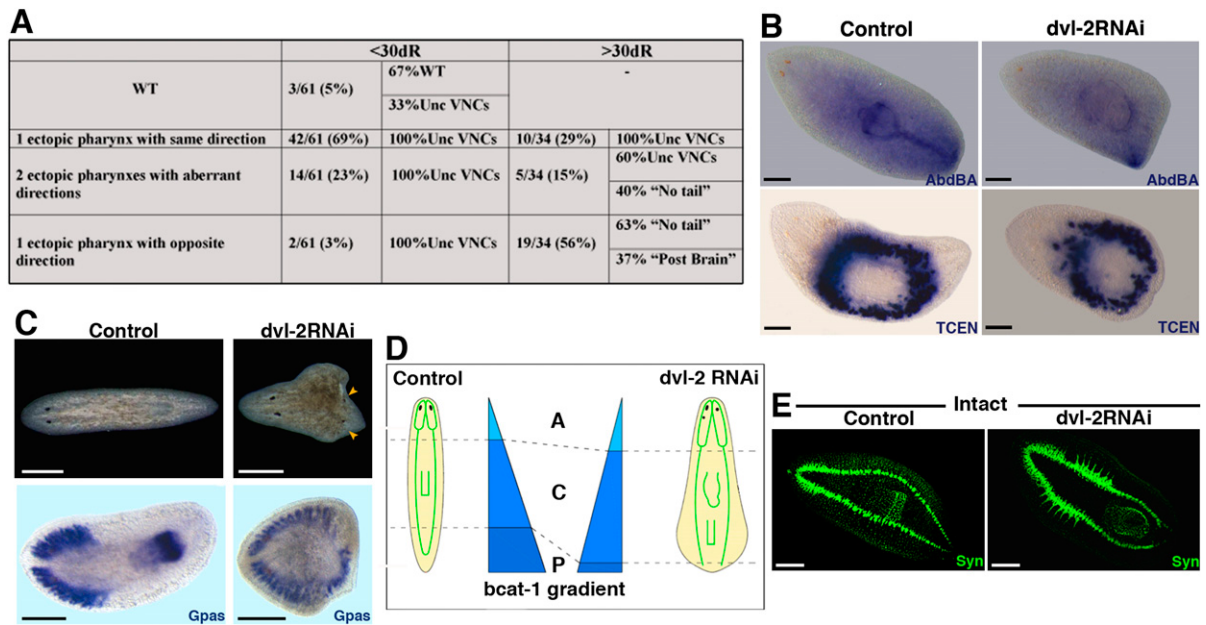


Fig. S5. Dvl-2 paralog is required for the stabilization of intracellular β -catenin. (A) Summary of the phenotypes generated after *dvl-2* silencing. (B) Expression analysis of the posterior marker *AbdBA* and the central identity marker *TCEN* revealed a reduction of posterior identity in *dvl-2* RNAi animals. Note the asymmetrical position of the *AbdBA* signal. Images correspond to 30-d-old regenerated trunk fragments. (C) Stereomicroscopic view of small live head fragments showing the appearance of ectopic posterior eyes (yellow arrowheads). Expression of *Gpas*, which specifically labels the cephalic branches and the pharynx, confirms the differentiation of a posterior ectopic brain. Images correspond to 18-d-old regenerated head fragments. (D) Very slight reduction of *bcat-1* activity could largely explain the overall phenotype observed after *dvl-2* silencing. (E) Immunostaining with anti-Syn in control and *dvl-2* intact animals. The anti-Syn staining images correspond to confocal z-projections. (Left) Anterior. *bcat-1*, *Smed- β -catenin1*; *dvl2*, *Smed-dvl-2*; *Gpas*, *Smed-Gpas*; *Syn*, synapsin. (Scale bar: A, B, D, and E, 250 μ m; C, 500 μ m.)

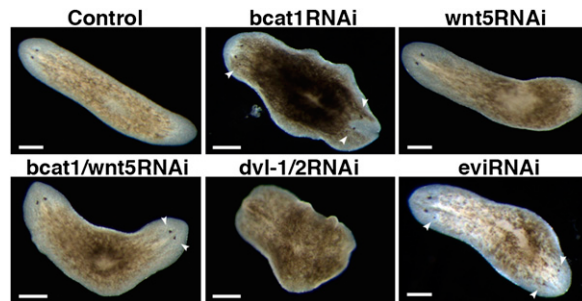


Fig. S6. Eye differentiation is abolished only after *dvl-1/2* silencing. Stereomicroscopic view of live animals after RNAi for *bcat1*, *wnt5* (alone or in combination), and *evi* reveals the differentiation of normal and ectopic eyes (white arrowheads). In contrast, *dvl-1/2* RNAi animals do not have eyes. (Left) Anterior. *bcat1*, *Smed- β -catenin1*; *dvl-1/2*, *Smed-dvl-1/2*; *evi*, *Smed-evi*; *wnt5*, *Smed-wnt5*. (Scale bar: 400 μ m.)

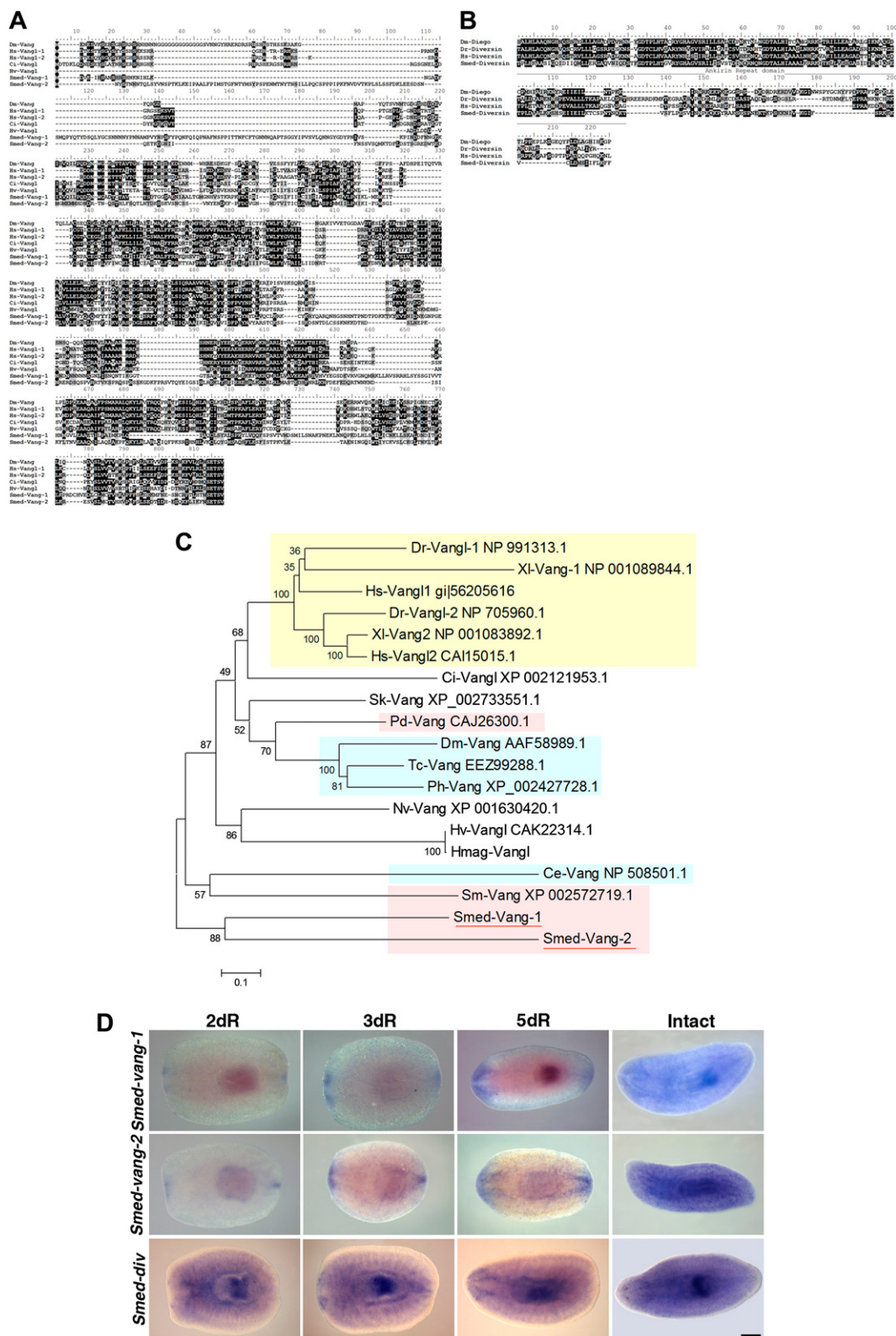


Fig. S7. Sequence analysis and mRNA expression pattern of *Smed-vang* paralogs and *Smed-div*. (A) Alignment of *Smed-Vang-1* and *Smed-Vang-2* with Vang homologs from phylogenetically distant animals showing protein sequence conservation. (B) Alignment of the ankyrin-repeat domain of *Smed-Div* with *Dgo/Div/ARD6* (ankyrin-repeat domain-containing protein) homologs from phylogenetically distant animals. Accession numbers of Div homologs are as follows: Dm-Dgo NP_724973.1, Dr-Div AAL39075, and Hs-Div BAA76801.2. (C) Phylogenetic tree of Vang proteins inferred from the accurate multiple amino acid sequence of Vang proteins obtained using MAFFT, version 6. The phylogenetic tree was prepared using MEGA version 3.1. Vertebrates are labeled in yellow, ecdysozoans in blue, and lophotrochozoans in pink. Accession numbers of Vang proteins are indicated in the tree. Ce, *Caenorhabditis elegans*; Ci, *Ciona intestinalis*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Dr, *Danio rerio*; Hmag, *Hydra magnipapillata*; Hs, *Homo sapiens*; Hv, *Hydra vulgaris*; Nv, *Nematostella vectensis*; Lv, *Leishmania*

Legend continued on following page

Lytechinus variegatus; Mm, *Mus musculus*; Nv, *Nematostella vectensis*; Pd, *Platynereis dumerilii*; Ph, *Pediculus humanus corporis*; Sk, *Saccoglossus kowalevskii*; Sm, *Schistosoma mansoni*; Smed, *Schmidtea mediterranea*; Tc, *Tribolium castaneum*; Xl, *Xenopus laevis*. (D) In intact animals, *Smed-vang-1*, *Smed-vang-2*, and *Smed-div* are expressed in the CG, VNCs, pharynx, and parenchyma. During regeneration, expression of the three genes is detected from 2dR: *Smed-vang-1* and *Smed-vang-2* are expressed within the anterior and posterior blastemas and in the regenerating CNS. *Smed-div* is expressed in the regenerating brain and in the pharynx and parenchyma. (Left) Anterior. dR, days after cutting. (Scale bar: 400 μ m.)

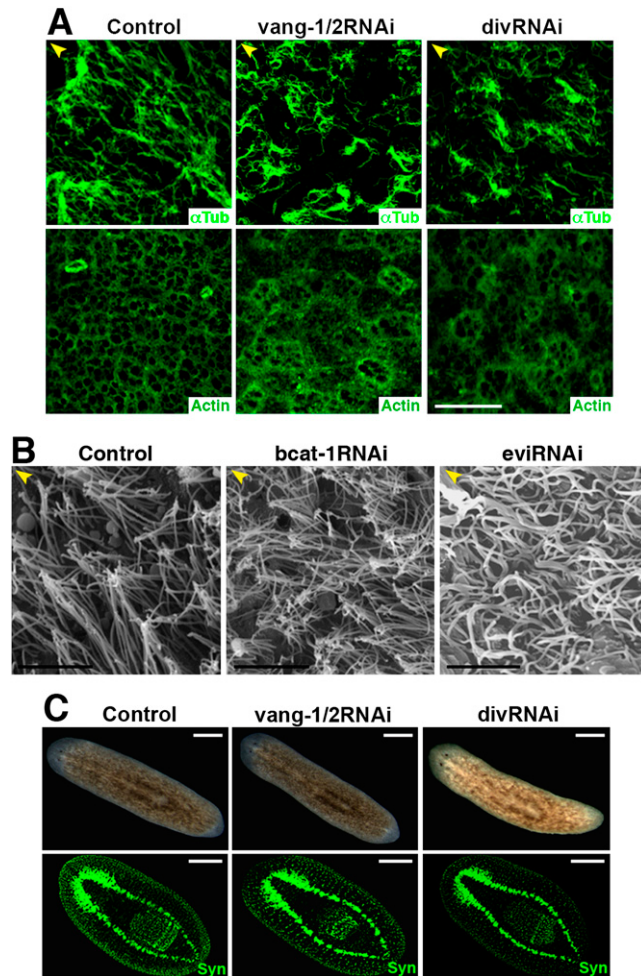
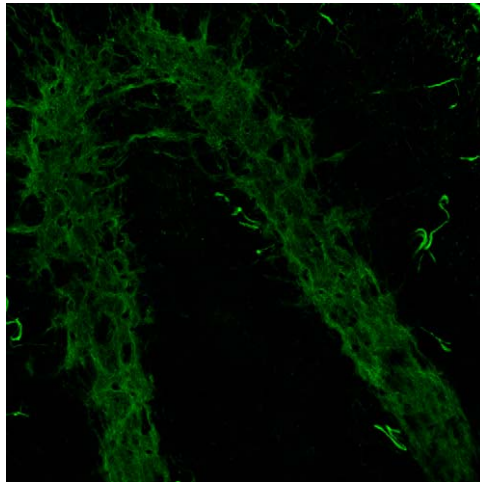
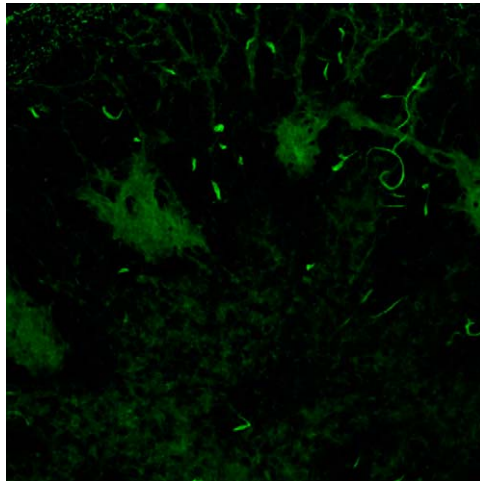


Fig. S8. (A) *Vang-1/2* and *div* RNAi animals exhibit disorganization of structures within the epithelial sheet. Anti- α Tub immunostaining reveals a reduction in the density of cilia, which also appear incorrectly orientated. Anti-Actin immunostaining reveals abnormal establishment of the actin network. The *x-y* confocal projections are shown. Yellow arrowheads indicate anterior. (Scale bar: 10 μ m.) (B) *Bcat1* and *evi* RNAi do not lead to abnormal organization of the cilia within the epithelial sheet. SEM shows the multiciliated epithelium. As in controls, a dense and well-orientated conglomerate of cilia is apparent in *bcat* and *evi* RNAi animals. Yellow arrowheads indicate anterior. (Scale bar: 10 μ m.) (C) *Vang-1/2* and *div* RNAi animals do not show any defects in brain morphogenesis or axis establishment. Stereomicroscopic view of live animals and anti-Syn shows apparently normal regeneration of *vang-1/2* and *div* RNAi animals. Anti-Syn images correspond to confocal *z*-projections. (Left) Anterior. (Scale bar: 400 μ m.) *bcat1*, *Smed- β -catenin1*; *div*, *Smed-div*; *evi*, *Smed-evi*; α Tub, α -tubulin; Syn, synapsin; *vang-1/2*, *Smed-vang-1/2*.



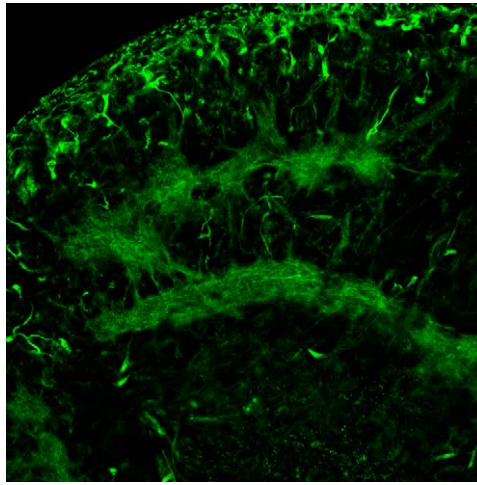
Movie S1. Ventral-to-dorsal views of planarians stained with anti- α -tubulin antibody: head of a control animal. Note that CG structures appear dorsal to VNCs.

[Movie S1](#)



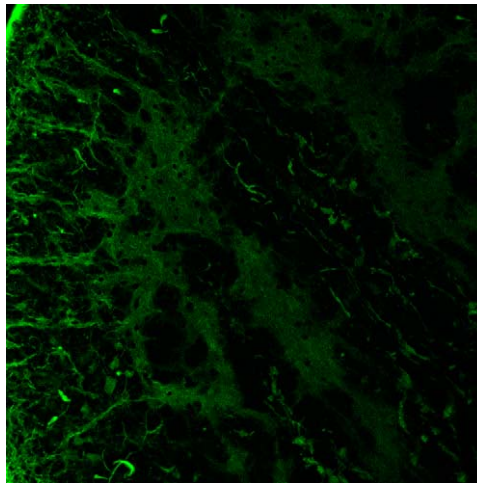
Movie S2. Ventral-to-dorsal views of planarians stained with anti- α -tubulin antibody: posterior ectopic head of a *Smed-dv1/2* RNAi animal. Note that CG structures appear dorsal to VNCs.

[Movie S2](#)



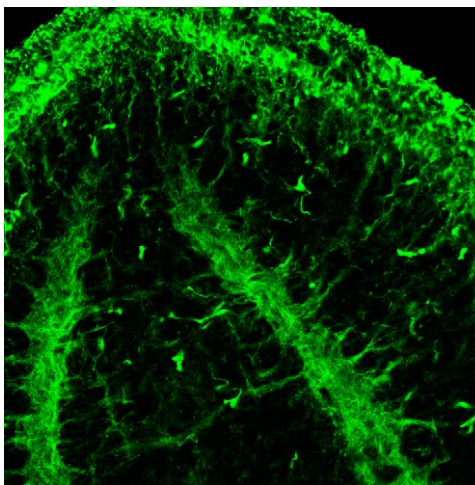
Movie S3. Ventral-to-dorsal views of planarians stained with anti- α -tubulin antibody: posterior ectopic head of a *Smed-evi* RNAi animal. Note that CG structures appear dorsal to VNCs.

[Movie S3](#)



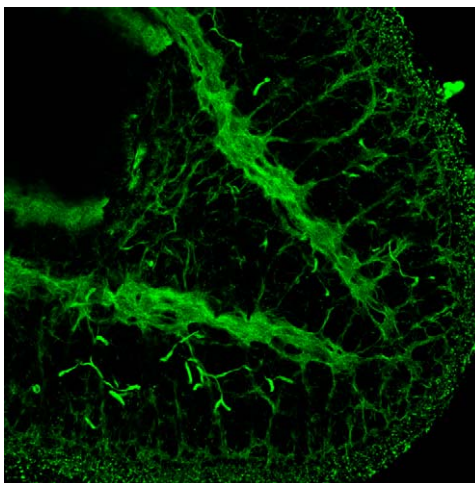
Movie S4. Ventral-to-dorsal views of planarians stained with anti- α -tubulin antibody: head of a *Smed-wnt5* RNAi animal. Note that CG structures appear dorsal to VNCs.

[Movie S4](#)



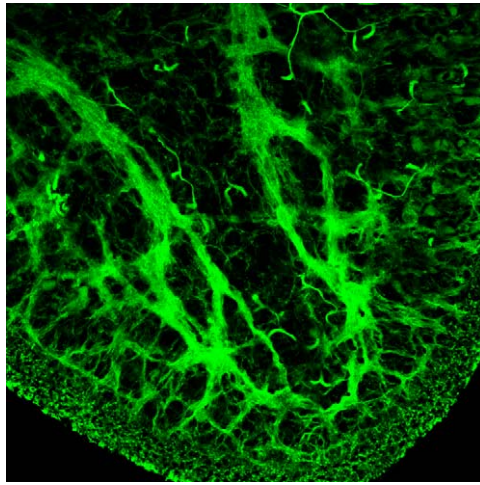
Movie S5. Ventral-to-dorsal views of planarians stained with anti- α -tubulin antibody: posterior ectopic head of a *Smed- β -catenin1* RNAi animal. Note that CG structures appear dorsal to VNCs.

[Movie S5](#)



Movie S6. Ventral-to-dorsal views of planarians stained with anti- α -tubulin antibody: tail of a control animal.

[Movie S6](#)



Movie S7. Ventral-to-dorsal views of planarians stained with anti- α -tubulin antibody: tail of a *Smed-wnt5* RNAi animal.

[Movie S7](#)



Movie S8. Motility analysis: control animal. Planarian movement is governed by ventral motile cilia and by a muscle network.

[Movie S8](#)



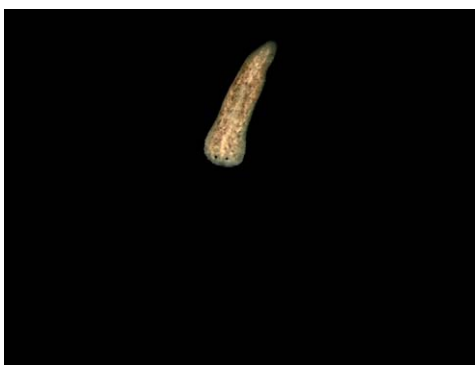
Movie S9. Motility analysis: *Smed-dvl-2* RNAi planarian. After silencing *Smed-dvl-2*, the movement of planarians is governed by muscular contractions instead of ventral motile cilia.

[Movie S9](#)



Movie S10. Motility analysis: *Smed-vang-1/2* planarian. After silencing *Smed-vang-1* and *Smed-vang-2*, the movement of planarians is governed by muscular contractions instead of ventral motile cilia.

[Movie S10](#)



Movie S11. Motility analysis: *Smed-div* RNAi animal. After silencing *Smed-div*, the movement of planarians is governed by muscular contractions instead of ventral motile cilia.

[Movie S11](#)

Artículo 2:

“Wnt5-Ror and Slit signaling generates a mutually dependent system to establish a corridor for nervous system regeneration and maintenance in planarians”

María Almuedo-Castillo, José Ignacio Rojo-Laguna, Emili Saló y Teresa Adell

Manuscrito en preparación

Resumen en castellano:

La señalización de Wnt5/Ror y Slit genera un sistema mutuamente dependiente para establecer un corredor para la regeneración y el mantenimiento del sistema nervioso

La regeneración de tejidos nerviosos adultos tras el daño o la amputación requiere la repolarización de las neuronas y la reconstrucción del circuito nervioso, que dependerá de la integración del control de la migración neuronal con el crecimiento de los axones. La naturaleza de los mecanismos moleculares responsables de esta integración durante la regeneración es ampliamente desconocida, lo que hace a la planaria un modelo perfecto para responder estas preguntas, ya que es capaz de regenerar un sistema nervioso completo y funcional en unos días tras su amputación. Esta increíble plasticidad se debe a la presencia de células madre adultas pluripotentes y a la habilidad de mantener activas de forma constitutiva todas las vías de señalización involucradas en proveer identidad posicional.

El desarrollo del sistema nervioso depende de la coordinación de la señalización de un conjunto de moléculas secretables, como Netrins, Slits y Wnts, con papeles muy conservados en definir el camino de la migración neuronal y de la proyección axonal.

En planarias, Wnt5 y Slit están involucrados en posicionar el sistema nervioso regenerante a lo largo del eje Medio-Lateral de la planaria.

En este trabajo, a partir de la generación de fuentes ectópicas de Wnt5, aportamos evidencias de que Wnt5 en planarias está realmente restringiendo el camino de la regeneración del sistema nervioso. Además, identificamos que el receptor Ror está mediando la señalización de Wnt5. Finalmente, mostramos que *slit* y *Ror* se coexpresan en las mismas células y que Wnt5 y Slit limitan mutuamente sus dominios de expresión. Estas observaciones sugieren que Wnt5 y Slit definen un corredor para la regeneración del sistema nervioso a partir del establecimiento de sus límites de expresión.

Wnt5-Ror and Slit signaling generates a mutually dependent system to establish a corridor for nervous system regeneration and maintenance in planarian

María Almuedo-Castillo, Jose I. Rojo-Laguna, Emili Saló and Teresa Adell

Department of Genetics and Institute of Biomedicine, University of Barcelona, 08028, Barcelona, Spain.

Regeneration of adult neural tissues after damage or amputation requires neuronal repolarization and rewiring of the neural circuitry. How directed neuronal migration and targeted axon growth are controlled to integrate new and preexisting tissues and to rebuild the neural circuitry remains largely unknown. Planarian flatworms stand out as a model to approach these questions, since they can regenerate a complete and functional nervous system a few days after amputation. Such amazing plasticity is due to the presence of an adult pluripotent stem cell population and the ability to maintain the signaling pathways involved in positional identity active. During nervous system development, the integration of the information of a conserved set of diffusible molecules, such as Netrins, Slits and Wnts, define neuronal migration and axonal paths. In planarian, Slit and Wnt5 have been shown to be involved in positioning the regenerating nervous system along the Medio-Lateral (ML) axis of the planarian. By generation of ectopic sources of active human/mouse Wnt5a, we provide conclusive evidences that Wnt5 is restricting the path of nervous system regeneration. We also show that Ror receptor is mediating this Wnt5-dependent process and that it is co-expressed with *slit* in the same cells. Additionally, we show that Wnt5 and Slit exhibit mutual and probably opposite transcriptional regulation. These findings suggest that Wnt5 and Slit act together to establish their expression boundaries and thus to generate a corridor for CNS regeneration and maintenance.

INTRODUCTION

The generation of proper connections is essential for correct functionality of the nervous system (Dudanova and Klein, 2013; Evsyukova et al., 2013; Kalil et al., 2011). The integration of multiple mechanisms enables neurons and their axons to sense guidance cues and translate them into directed migration or axonal guidance and branching. There is a high conservation of the molecules that guide invertebrate and vertebrate nervous system development, such as Netrins, Ephrins, Semaphorins, Slits and Wnts (Evans and Bashaw, 2010; Killeen and Sybingco, 2008; Sanes and Zipursky, 2010). These guidance cues must repel or attract neurons or growth cones, and specific receptors will transduce their signaling in a way that together they will define the neuronal or axonal path.

As during pattern formation, the correct functioning of these molecules must rely on their own expression and secretion in specific domains as well as on their fixed diffusion rates (Muller et al., 2013; Müller and Schier, 2011). Therefore, molecular mechanisms similar to the ones involved in pattern formation (Meinhardt, 2008; Meinhardt, 2012; Muller et al., 2012; Shaya and Sprinzak, 2011) must be operating to robustly generate gene expression boundaries.

During the regeneration of the nervous system all these connections have to be rebuilt to recover functional properties. The planarian *Schmideta mediterranea* represents an ideal model to *in vivo* study the roles and interactions of these guidance mechanisms during the *de novo* regeneration of the brain and neural tissues. The constitutive expression of positional control genes (Almuedo-Castillo et al., 2012; Reddien, 2011; Witchley et al., 2013) and the presence of an adult pluripotent stem cell population (Aboobaker, 2011; Rink, 2012; Tanaka and Reddien, 2011) allow planarian to regenerate and maintain their complex and molecularly conserved nervous system (Cebrià, 2008; Fraguas et al., 2012; März et al., 2013).

Netrins and Semaphorins have been proposed to act as attractive cues for visual axon targeting during planarian regeneration (Cebrià and Newmark, 2005; Cebrià and Newmark, 2007). Moreover, Slit has been shown to restrict neural tissue regeneration in the midline while Wnt5 restricts it in lateral regions (Adell et al., 2009; Almuedo-Castillo et al., 2011; Cebrià et al., 2007; Gurley et al., 2010). The receptors that transduce signaling, the molecular mechanisms and the coordination of these systems, however, remain largely unknown. Here we show that among its multiple receptors (Angers and Moon, 2009; Niehrs, 2012), Wnt5 will transduce through the receptor Ror tyrosine kinase to restrict nervous system regeneration. Moreover, generation of a local ectopic source of active human/mouse Wnt5a repels the formation of neural tissues, which verifies the conservation, repulsive cue function and local activity of Wnt5 in planarians. Finally, we show that cells co-express *slit* and the Wnt5 receptor *Ror*. This observation, paired with evidence about their mutual transcriptional regulation, led us to suggest a system in which Wnt5 and Slit act together to establish their expression boundaries and consequently to guide a CNS regeneration and maintenance path.

RESULTS

Ror is the receptor of Wnt5 in planarians

Wnt5 is required to guide nervous tissue regeneration along the ML axis of the planarian and to allow proper integration between the old and new structures. After an anterior amputation, *wnt5(RNAi)* planarians show a laterally displaced brain that is not connected through the anterior commissure. In addition, their visual systems regenerate also aberrantly, since the visual axons project laterally instead of contralaterally in order to form the optic quiasm (Adell et al., 2009; Almuedo-Castillo et al., 2011; Gurley et al., 2010) (Figure 1). Similarly, the VNCs of *wnt5(RNAi)* planarians regenerate laterally displaced and disconnected from the preexisting ones after a posterior amputation (Adell et al., 2009; Almuedo-Castillo et al., 2011; Gurley et al., 2010) (Figura 1). Wnt5 has been shown to signal via a variety of receptors, such as the Ror tyrosine kinase, the Ryk/Derailed tyrosine kinase and the Frizzled. We have identified a single ortholog of Ror in the genome of *Schmidtea mediterranea*. RNAi of *Ror*, as well as the double RNAi with *wnt5*, leads to defects that mirror the phenotype observed after *wnt5* RNAi: lateral displacement of the neural tissues, which are disconnected in the midline (Figure 1). Therefore, Wnt5 in planarians acts through the tyrosine kinase receptor Ror to position the nervous system along the ML axis.

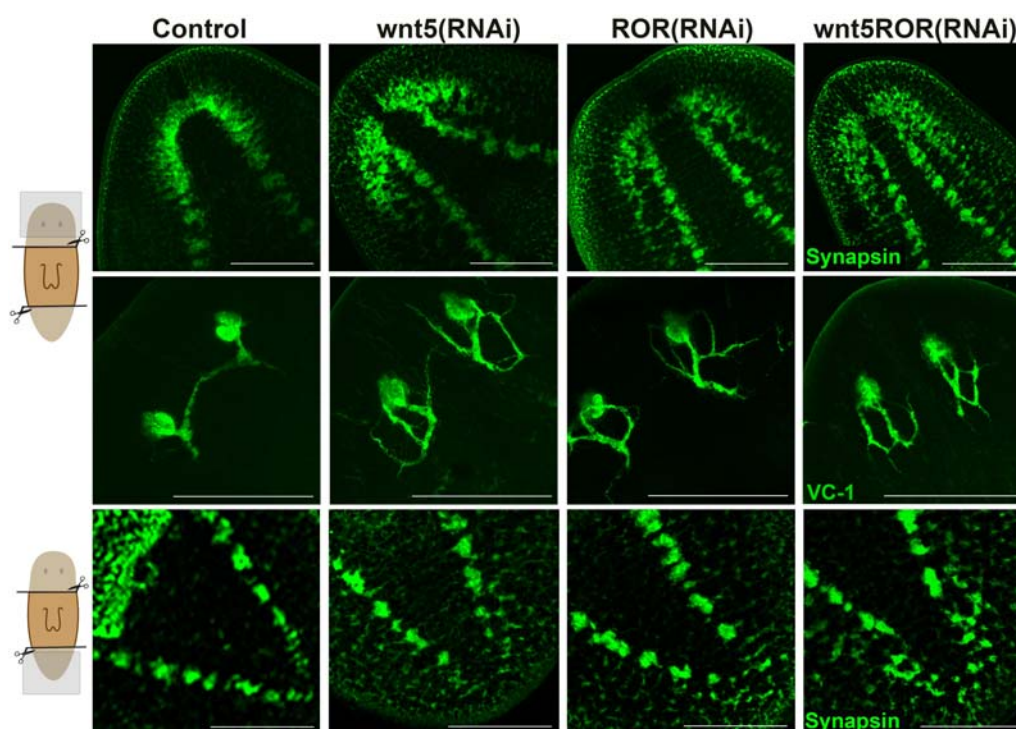


Figure 1: Ror is the functional receptor of Wnt5 in planarians. Immunostaining with anti-synapsin (Synapsin) and anti-VC1(VC-1), which allow the visualization of the central nervous and visual systems, respectively, in regenerating trunk fragments 14 days after bipolar amputation. (Top left, anterior). All the images correspond to confocal z-projections. Scale bars: 200 μ m.

An ectopic source of *wnt5* repels nervous tissues regeneration

wnt5 is highly expressed from the most external part of the CNS towards the laterals. According to the phenotype produced after its silencing, it has been proposed that Wnt5

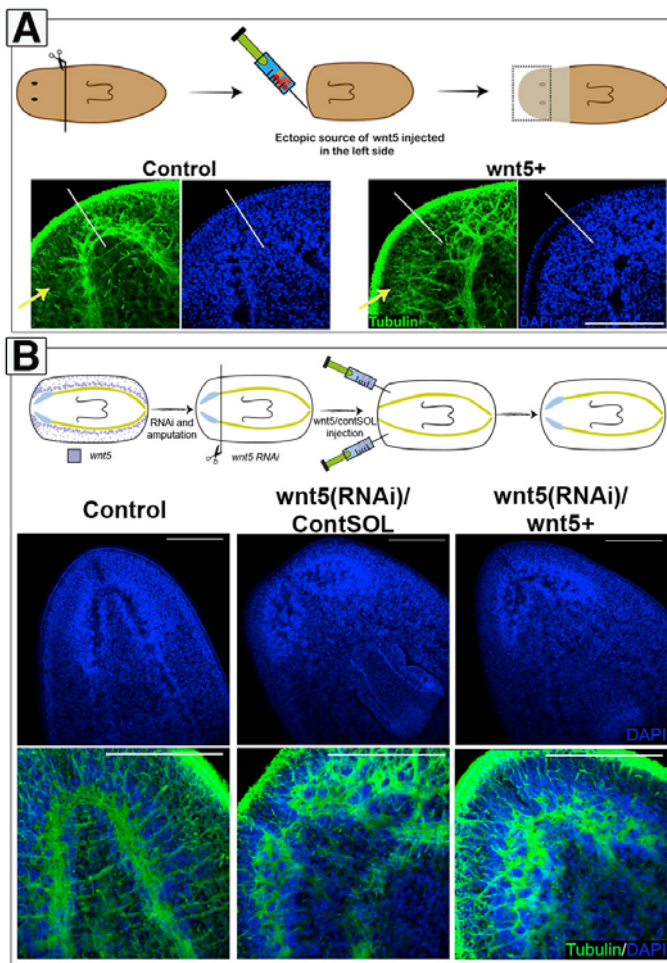


Figure 2: The generation of an ectopic Wnt5 source repels nervous system growth.

Immunostaining with anti- α Tubulin (Tubulin) and staining with DAPI, which allow the visualization of the central nervous system in trunk fragments 5 days after anterior amputation in (A) and 12 days after anterior amputation in (B). (Top left, anterior). Control animals are injected with the same solution in which Wnt-5a is dissolved. The drawings show the experimental designs; white lines indicate the ML middle of the animal; yellow arrows point to the site of Wnt5 incorporation. All the images correspond to confocal z-projections. ContSol, solution injected in control animals. Scale bars: 200 μ m.

Wnt5 and Slit restrict the position of the CNS

Slit has been shown to restrict central positioning of the regenerating Central Nervous system (CNS) (Cebrià et al., 2007). While RNAi of *wnt5* leads to CNS lateral displacement and disconnection in the midline, RNAi of *slit* leads to the collapse of the CNS in the midline (Adell et al., 2009; Almuedo-Castillo et al., 2011; Cebrià et al., 2007; Gurley et al., 2010). The expression patterns of *wnt5* and *slit* in ventral regions and the phenotypes obtained after RNAi perfectly fit with a function of these molecules in repelling neural tissue growth. While *slit* is expressed from the most internal part of the CNS towards the midline, *wnt5* is highly expressed from the most external part of the CNS towards the lateral edges (Adell et al., 2009; Almuedo-Castillo et al., 2011; Cebrià et al., 2007; Gurley et al., 2010) (Figure 3). Moreover, we have also observed scattered cells expressing *wnt5*

will restrict the lateral regeneration of neural tissues (Adell et al., 2009; Almuedo-Castillo et al., 2011; Gurley et al., 2010). Over-expression experiments based on transgenesis have still not been developed in planarians. As an alternative and since planarian Wnt5 shows high conservation, we generated an ectopic source of the human/mouse *wnt5* ligand specifically at one side of the blastema. This ectopic Wnt5 source repels nervous tissues regeneration and consequently, the brain grows displaced running away from the source (Figure 2A and S1). In order to check the specificity of this active human/mouse Wnt5 ligand, we carried out a rescue experiment. After RNAi of *wnt5*, we injected the Wnt5 protein in both sides of the blastema, where *wnt5* is expressed. The generation of these lateral sources of active Wnt5 in a *wnt5(RNAi)* animal partially rescues the midline disconnection and lateral displacement of the brain observed in *wnt5(RNAi)* animals (Figure 2B). These results indicate that the function of Wnt5 is to repel the growth of the neural tissues to ensure the position and integration of the newly formed tissues.

in more central regions within the brain and in the posterior midline (Figure 4). Apart from these few centrally located *wnt5*-expressing cells, *wnt5* and *slit* exhibit complementary domains, not only in ventral regions, but also in dorsal regions; *slit* is expressed in the dorsal midline, while *wnt5* is expressed in the DV boundary (Figure 3).

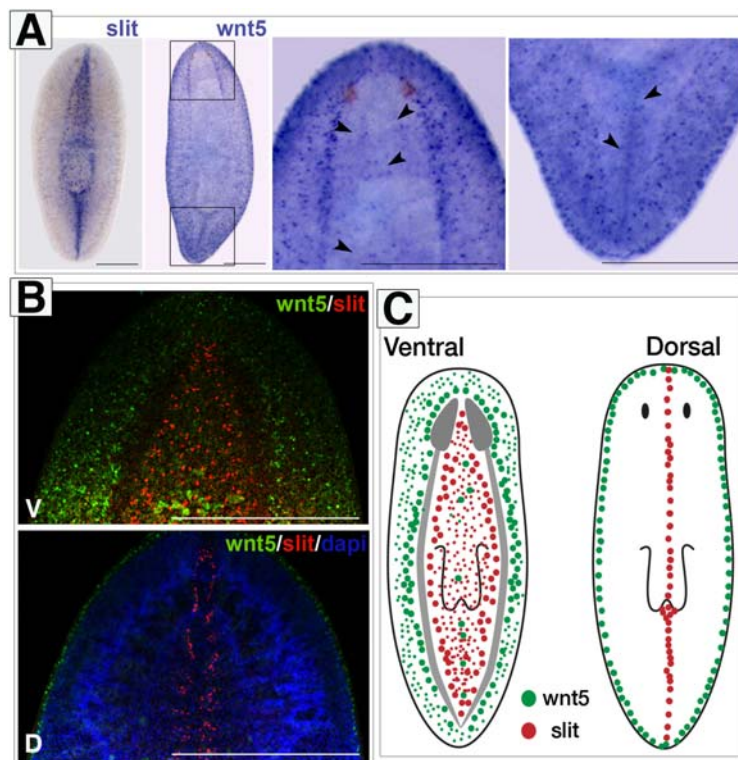


Figure 3: *wnt5* and *slit* expression domains.

(A) Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) analysis of *slit* and *wnt5* show their complementary expression patterns. To note, some *wnt5*-expressing cells are located in central regions within the *slit* expression domain. The right images are magnifications of the regions indicated by black boxes in the previous image. (B) Double fluorescent whole-mount *in situ* hybridization (FISH) of *slit* and *wnt5* confirms their complementary expression not only in the ventral side but also in dorsal. (C) Schematic drawing showing *slit* and *wnt5* expression domains in the planaria. (Top, anterior). Black arrowheads in (A) point to the *wnt5*-expressing cells located in central regions. FISH images correspond to confocal z-projections. V, ventral; D, dorsal. Scale bars: 300 μ m.

Double RNAi of *wnt5* and *slit* results in the combination of both defects: lateral displacement and midline collapse of the CNS and visual axons (Figure 4). Double RNAi of *Ror* and *slit* leads to similar results (Figure S2). These results suggest that these two molecules are both restricting neural tissues regeneration and that their function does not exclusively rely on the regulation of the other.

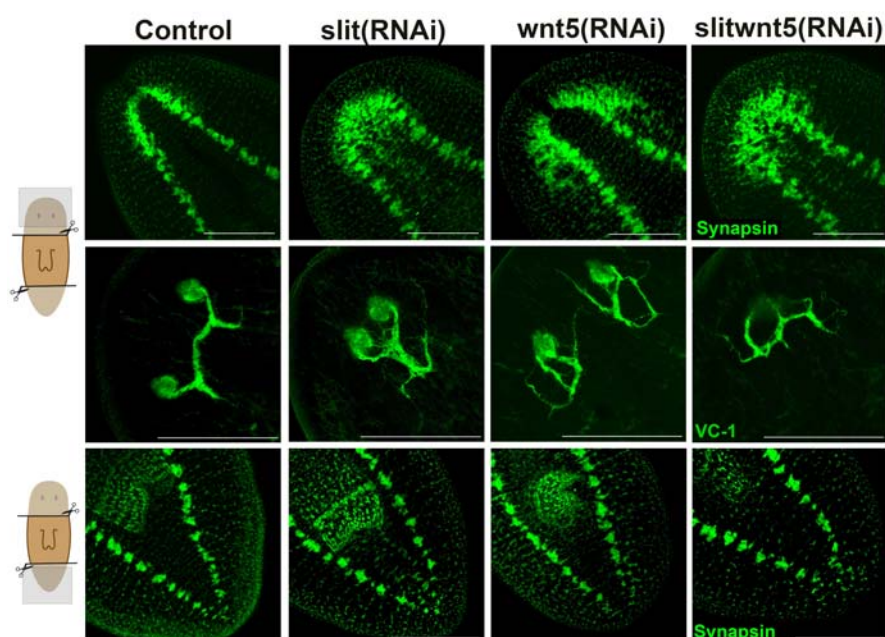


Figure 4: Wnt5 and Slit control the position of the CNS independently. Immunostainings with anti-synapsin (Synapsin) and anti-VC1 (VC-1), which allow the visualization of the central nervous and visual systems, respectively, in regenerating trunk fragments 14 days after bipolar amputation. (Top left, anterior). All images correspond to confocal z-projections. Scale bars: 200 μ m.

WNT5/ROR restricts ML position during neural tissue turnover

Planarians are able to grow and shrink depending on nutrient intake, always maintaining their functionality and proportions. These homeostatic changes require an exhaustive control between cell death and cell replacement in order to maintain proportioned organs. *wnt5* and *Ror(RNAi)* animals show ectopic lateral differentiation of neural tissues during homeostatic turnover (Figure 5). Slit has been shown to restrict central positioning of the CNS also during homeostasis (Cebrià et al., 2007) (Figure 5). This ectopic formation of neural tissues is also observed in the visual system; ectopic photosensitive cells and visual axons differentiate and project centrally displaced in *slit(RNAi)* animals or laterally displaced in *wnt5* and *Ror(RNAi)* animals (Figure 5).

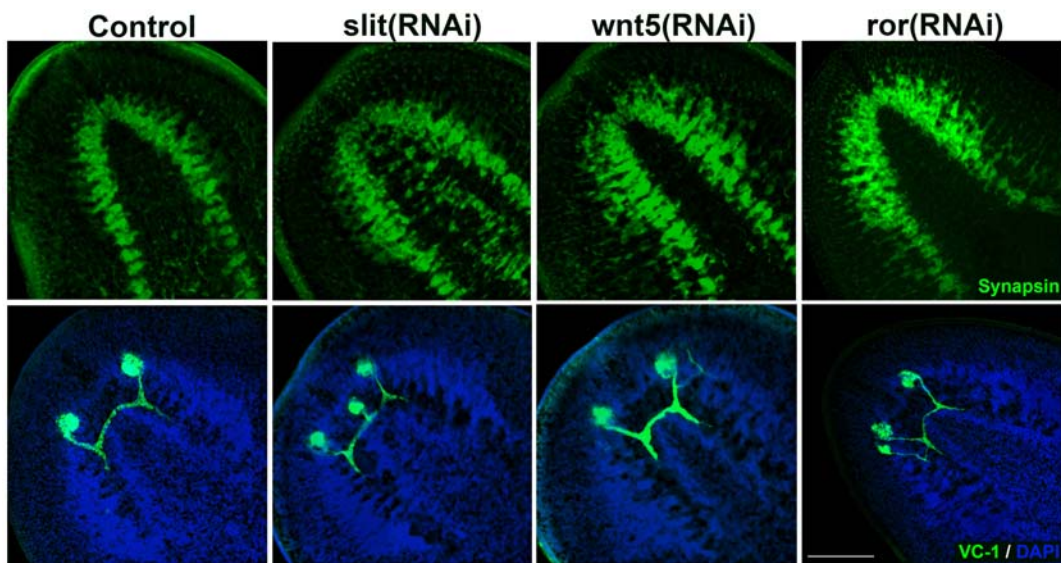


Figure 5: Wnt5 and Slit also direct neuronal cell replacement during homeostatic tissue turnover.

Immunostainings with anti-synapsin (Synapsin) and anti-VC1(VC-1) combined with DAPI staining, which allow the visualization of the central nervous and visual systems, respectively, in non-amputated animals 26 days after last RNAi injection. (Top left, anterior). All images correspond to confocal z-projections. Scale bars: 150 μ m.

It's important to note that the CNS of RNAi animals remains at its original position although ectopic neural tissues appear, probably due to the lack of time for the disappearance of the CNS by cell turnover.

It has been described that there are progenitor eye cells in the proximity of the eyes that migrate to enable eye cell replacement. These eye progenitor cells appear in the anterior blastema 2 days after amputation and their specification relies on the co-expression of *six-1/2*, *eya* and *ovo* (Lapan and Reddien, 2012). *wnt5*, *Ror* and *slit(RNAi)* non amputated animals showed that in the same way as their ectopic eyes and brain structures, these eye progenitor cells were aberrantly located (Figure S3). Moreover, during regeneration, these progenitor cells exhibited defective directed migration, since they were laterally displaced in anterior blastemas of *wnt5* and *Ror(RNAi)* planarians while they collapsed in the middle in *slit(RNAi)* animals (Figure S3).

Altogether, these results suggest a role of Wnt5 and Slit in directing neural tissue turnover probably by restricting the migration of neural precursors.

The *wnt5* receptor *Ror* is coexpressed with *slit*

Ror is expressed in the brain and VNCs as well as around the pharynx, mouth opening and posterior midline (Figure 6). Since *Ror* is a receptor, we should expect it to act in the same cells in which is expressed. Thus, *Ror* expression in the most external part of the CNS fits with its function as a Wnt5 receptor. However, *Ror* is also expressed in few cells in the region between the brain and in the cells of the posterior midline, which also co-express *slit* (Figure 6). This unexpected co-expression of *Ror*, the Wnt5 receptor, and *slit*, points to a mutual regulation between these two systems.

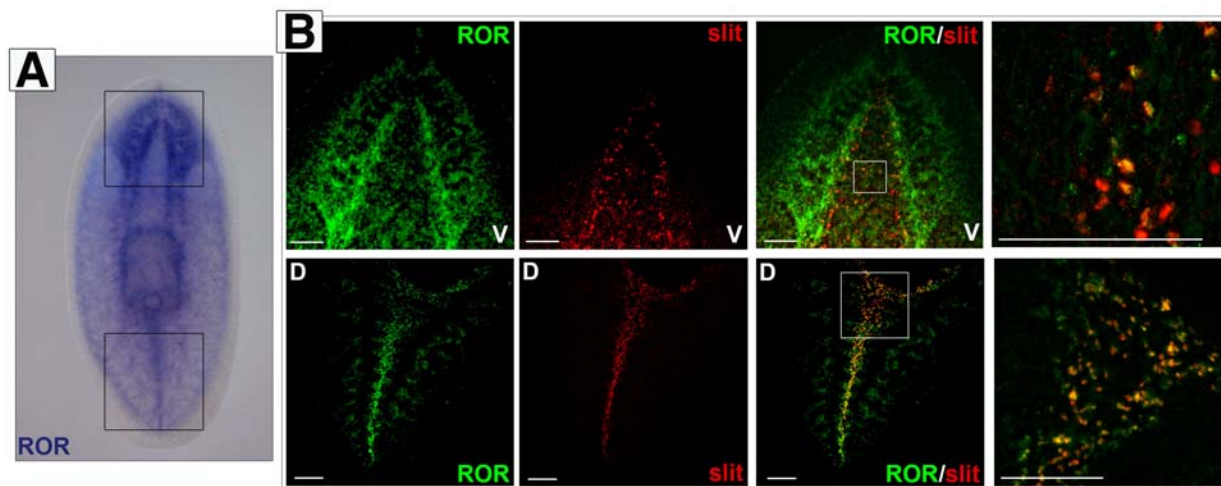


Figure 6: *Ror* and *slit* are co-expressed in a subset of cells.

(A) Expression of *Ror* by WISH. Black boxes indicate the corresponding regions of the images shown in (B). (B) Double FISH of *Ror* and *slit* showing their co-expression in ventral central regions and dorsal midline. The most right images are magnifications of the regions indicated by white boxes in the previous images. (Top, anterior). FISH images correspond to confocal z-projections. V, ventral; D, dorsal. Scale bars: 100 μ m.

Wnt5 and Slit are mutually required to generate their expression boundaries

Analysis of *slit* and *wnt5* expression in *wnt5* and *slit* RNAi backgrounds, respectively, showed that *slit*-expressing cells spread outside its boundary in *wnt5*(RNAi) regenerating animals and that *wnt5* expression faded in *slit*(RNAi) animals, in which less *wnt5*-expressing cells were as well aberrantly located in central regions (Figure S4). These results suggest a mutual transcriptional regulation in which Wnt5 restricts the positioning of *slit*-expressing cells and Slit could be activating *wnt5* expression as well as simultaneously restricting the positioning of these *wnt5*-expressing cells. In order to discriminate if the changes in expression were just a consequence of the defects in positioning the CNS in both *wnt5* and *slit*(RNAi) regenerating animals, we have analyzed gene expression in RNAi animals without amputation. Similar disruption of *slit* and *wnt5* expression domains were observed in non amputated *wnt5* and *slit*(RNAi) animals (Figure 7A), which maintain CNS at the same position than before RNAi treatment although new neural tissues appear ectopically located (Figure 5). To further confirm the Wnt5-mediated restriction of *slit* expression, we have analyzed *slit* expression after generation of an ectopic source of active Wnt5 at one side of the blastema. The expression domain of *slit* forms laterally displaced, avoiding the Wnt5 source (Figure 7B). Finally, we have also analyzed the establishment of *slit* and *wnt5* expression domains during lateral regeneration in *wnt5* and

slit(RNAi) animals respectively. After lateral amputation, animals will have to re-establish *wnt5* and *slit* expression boundaries. Similar to what happen after anterior amputation, *wnt5(RNAi)* animals failed to restrict *slit* expression boundaries and *slit*-expressing cells appeared in the lateral margin of the animal (Figure 7C). As well, *slit(RNAi)* animals showed less and improperly located *wnt5*-expressing cells. The defective re-establishment of expression boundaries is accompanied by the aberrant lateral regeneration of neural structures in both *wnt5* and *slit(RNAi)* animals (Figure S5).

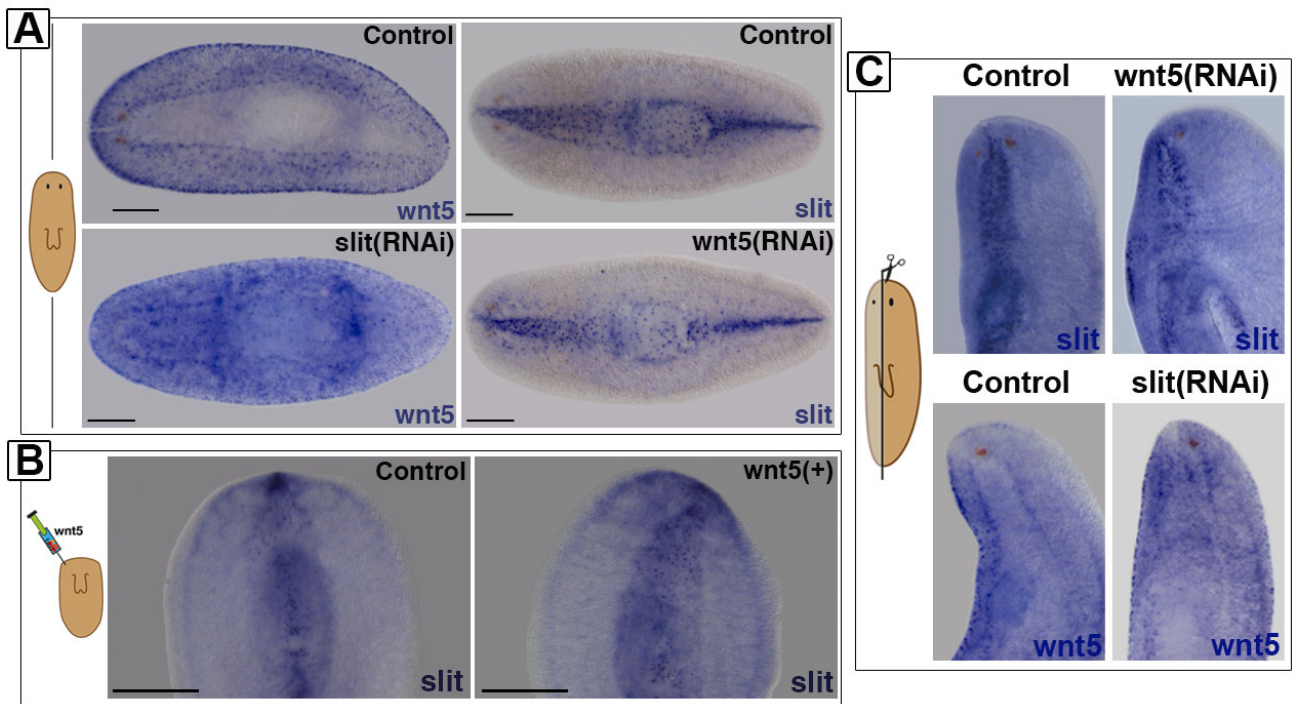


Figure 7: Wnt5 and Slit are mutually regulated.

(A) WISH analysis of *wnt5* and *slit* expression in non-amputated *slit* and *wnt5(RNAi)* animals, respectively. (Left, anterior). (B) WISH analysis showing that *slit* expression domain deflects avoiding the ectopic Wnt5 source generated in the ventral/left side of the blastema. (Top, anterior). (C) WISH analysis of *wnt5* and *slit* expression 8 days after a lateral amputation in *slit* and *wnt5(RNAi)* animals, respectively. (Top, anterior). Scale bars: 300 μm (A), 200 μm (B).

Collectively, these results point to a system of mutual transcriptional regulation, with a shared function of Wnt5 and Slit in positioning respectively *slit* and *wnt5*-expressing cells, to generate their expression boundaries.

Wnt5 positions the midline probably by restricting *slit* expression domain.

In organisms with bilateral symmetry, the midline is the symmetry axis that divides developing organisms (Evans and Bashaw, 2010). Moreover, midline establishment is required to guide cell migration during embryonic posterior elongation (Wallingford, 2012). To explore if the defective positioning of neural tissues in *wnt5*, *Ror* and *slit(RNAi)* animals was also related to a defect in midline specification, we have analyzed the expression of the midline markers *notum* (dorsal anterior tip midline) and *wnt1* (dorsal posterior tip midline). The expression of *notum* between the brain lobes is deflected in the same way as the CNS in *wnt5*, *Ror* and *slit(RNAi)*, although it is not as clear in the midline expression

domain (Figure 8A). The expression of *wnt1* remains properly located after *Ror* and *wnt5(RNAi)* animals, while in *slit(RNAi)* animals, *wnt1*-expressing cells are scattered and fail to locate at the posterior tip midline (Figure 8A). According to these results and to prior publications, regenerating posterior gut branches fused in *slit(RNAi)* animals (Cebrià et al., 2007) (Figure 8A). No obvious defects, however, were observed in the regeneration of the posterior gut branches in *Ror* and *wnt5(RNAi)* animals (Figura 8A and S6).

When an ectopic Wnt5 source is generated, the expression of *notum* and *wnt1* together with the gut branches are deflected running away from the Wnt5 source, according to the deflection of *slit* expression domain observed (Figure 8B).

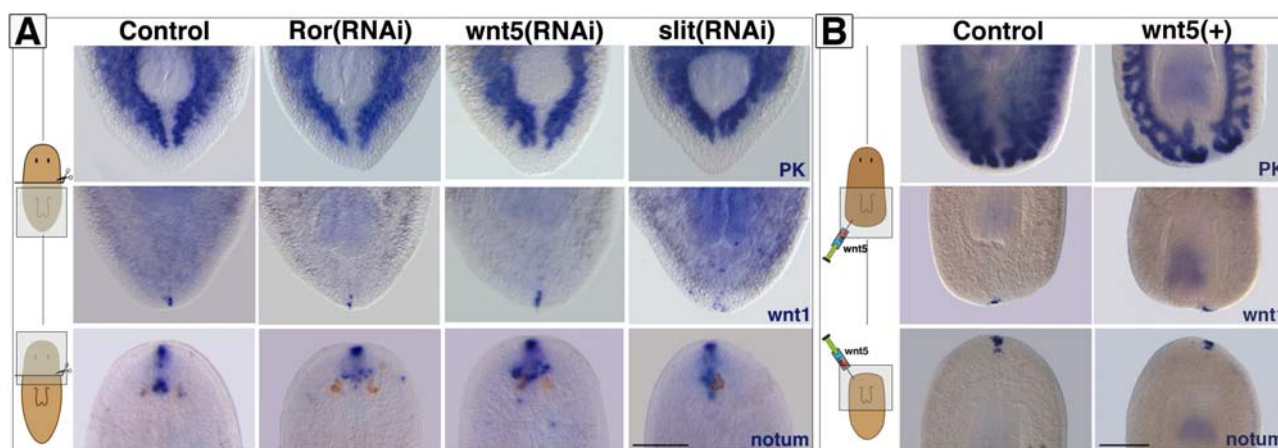


Figure 8: Wnt5 positions the midline by restricting *slit* expression

WISH analysis of the gut system with *pantotenase kinase (PK)*, the posterior midline tip with *wnt1* and the anterior midline tip with *notum* in (A) *Ror*, *wnt5* and *slit(RNAi)* regenerating head or trunk fragments and in (B) animals in which an ectopic Wnt5 source was generated in the ventral/left side of posterior or anterior blastemas. (Top, anterior). In (A) the animals correspond to 10 days regenerating pieces after anterior amputation and in (B) to 3 days regenerating pieces after anterior or posterior amputations. Scale bars: 300 μ m.

Altogether, these observations suggest that in addition to a role in preventing the formation of neural tissues in the ventral midline region, Slit has a general role in ML axis patterning according to the midline establishment. Moreover, Wnt5/Ror will play a role in the positioning of the midline most probably because they restrict the expression domain of *slit*.

DISCUSSION

WNT5/Ror restricts CNS regeneration and *slit* expression domains.

Wnt5a/Ror2 has a conserved role in directed cell migration, either by dictating cell shape changes during embryonic axis elongation or cell polarity and orientation during neurogenesis (Ciani and Salinas, 2005; Kikuchi et al., 2011; Montcouquiol et al., 2006). In planarians, Wnt5/Ror is required to restrict lateral positioning of neural tissues during regeneration and tissue turnover. Similarly, Slit repels neural growth in central regions but

its ML patterning role is clearly not restricted to neural tissues, probably explained by the fact that, in addition to its ventral expression within the CNS, slit it is also highly expressed in the dorsal midline. To note, Gurley and coworkers have observed the formation of ectopic lateral pharynges in a small percentage of *wnt5(RNAi)* animals, and thus, they have proposed a general role of Wnt5 in inhibiting the lateral spread of medially-located structures (Gurley et al., 2010). In our experiments, however, we have never observed any defect related to the pharynx or gut system, probably explained by the use of different RNA interference methods; while they feed the animals with RNAi, we inject the RNAi directly into starved animals. We have shown that the generation of an ectopic Wnt5 source repels the formation of the midline, which ends up markedly deflected. Therefore, the expression of the anterior (*notum*) and posterior (*wnt1*) midline tip markers and the gut branches deflects as well as the *slit* expression domain.

All these data suggest that Wnt5 has two different functions related to its different expression domains; first, *wnt5* is expressed in the ventral margins of the planarian and will be restricting the positioning of the nervous tissues there. Second, there are also few *wnt5*-expressing cells in the proximity of the cells that co-express *slit* and its receptor *Ror* in dorsal and ventral central regions, where it will be restricting the expression domains of *slit* and of the midline. The phenotype of *wnt5/slit* RNAi animals does not mirror that of *slit(RNAi)* animals, since they show both lateral deflections and midline collapse of the neural structures, defects observed in *wnt5* and *slit(RNAi)* animals, respectively. This indicates that Wnt5 plays a role in preventing neuronal cell migration towards the margins independently of its role in restricting *slit* expression.

Nevertheless, blastema growth and elongation seems to be a Slit and Wnt5 independent process. A group of homeobox and homeodomain genes is important for anterior and/or posterior pole regeneration. RNAi of all these pole determinants inhibits blastema growth and elongation and their expression in intact animals and/or in regenerating blastemas is always related to the dorsal midline (Blassberg et al., 2013; Chen et al., 2013; Felix and Aboobaker, 2010; Hayashi et al., 2011; März et al., 2013; Roberts-Galbraith and Newmark, 2013) Scimone et al., 2014). These data indicate a role of these genes in midline establishment and thus, in pole elongation. *slit* and *wnt5(RNAi)* animals, however, are able to regenerate their anterior and posterior poles. Therefore, Slit function in the dorsal midline would be to confer ML polarity in the blastema rather than elongation.

Here we have shown that Wnt5/Ror and Slit will be required to guide the neural regeneration and turnover path within the ML axis. The generation of an ectopic source of recombinant human/mouse Wnt5a confirms the evolutionary conservation of Wnt5 and its role in repelling neural tissue formation during planarian regeneration. Furthermore, Ror will be the receptor expressed in neurons and/or neural precursors that will orient the cells avoiding the Wnt5 source. Our results point to a highly conserved mechanism of Wnt5/Ror, together with Slit, in restricting neural cell migration.

Directed cell migration and axon guidance?

Building neural circuitry relies on directed cell migration and directed segregation of axons driven by repulsive or attractive guidance cues (Andrews et al., 2007; Killeen and Sybingco, 2008). The specific localization of these directive cues and the polarity of their receptors within the cells are essential to properly connect the neural systems. Wnt5 and Slit are known both as directive cues for cell migration during neurogenesis as well as repulsive axon guidance cues (Bloch-Gallego et al., 2005; Fradkin et al., 2010; Kikuchi et al., 2011; Mulligan and Cheyette, 2012). In planarians, *wnt5* and *slit* expression patterns along with the phenotypes generated after their RNAi fit with a common role of these two molecules in repelling the growth of neural tissues in different regions along the ML axis (Adell et al., 2009; Almuedo-Castillo et al., 2011; Cebrià et al., 2007; Gurley et al., 2010). The cellular process underlying this restriction, however, remains unknown. Most probably, the Wnt5 receptor Ror and the unidentified Slit receptor will be asymmetrically expressed in neural and/or neural precursor cells and will restrict their migration by interacting with their respective repulsive ligands. A defect in directed neuronal migration in *slit* and *wnt5(RNAi)* animals is suggested by the defective localization of the regenerating brain primordia, the neural cells during tissue turnover and by the defective migration of *ovo(+)* eye precursors cells. Furthermore, *slit* and *wnt5(RNAi)* planarians showed defective targeting of visual axons; eye cells of *slit(RNAi)* animals fail to project laterally and collapse in the midline and eye cells of *wnt5(RNAi)* planarians fail to project contralaterally to cross the midline and project aberrantly towards the laterals. It has been described that during visual system regeneration, the eye cells form to later project their axons contralaterally to build the optic chiasm and ipsilaterally to connect to the most internal region of the brain (Sakai et al., 2000). Planarian netrins, known attractive axon guidance cues, are expressed in this internal region of the brain and have been proposed to be required to attract axon targeting specifically to connect eye cells to the brain (Cebrià and Newmark, 2005). It is possible that the axons of the eye cells that are required to connect to the brain express the Slit receptor, and Slit restricts their midline projection, while the axons that have to form the chiasm express Ror, which repels lateral targeting by interacting with Wnt5. These defects in *wnt5* and *slit(RNAi)* visual axon targeting are also observed in non-amputated animals in which the preexisting brain remains at the original position. We cannot rule out, however, that these defects are a consequence of defective eye cell migration or defective brain positioning if we assume that eye regeneration depends on the localization of the brain.

Therefore, planarian Slit and Wnt5 will have a conserved role in restricting neural tissue positioning and connectivity by directing cell migration and probably also by acting as repulsive axon guidance cues.

Wnt5 and Slit are a mutually regulated system that establish a corridor for CNS regeneration

Expression patterns of *wnt5* and *slit* in planarians and other organisms suggest that these diffusible molecules act close to the cells that secrete them (Adell et al., 2009; Almuedo-

Castillo et al., 2011; Andrews et al., 2007; Cebrià et al., 2007; Fradkin et al., 2004; Gurley et al., 2010; Zarin et al., 2014). The idea that these molecules function locally is supported by the fact that incorporation of active Wnt5 shows a local effect in the region where it was administered. Therefore, their correct functioning relies on the robust generation and maintenance of their expression boundaries.

A mutual inhibitory regulation between Wnt5 and Slit during planarian regeneration has been proposed (Gurley et al., 2010). Our results are in agreement with a mutual regulatory system in which Wnt5/Ror and Slit respectively delimits *slit* and *wnt5* expression boundaries, but in which Slit would be as well activating *wnt5* expression.

Here we show that the Wnt5 receptor, *Ror*, co-expresses in some cells with *slit*. Moreover, careful analysis of *wnt5* expression shows that, in addition to its strong lateral domains of expression, there are scattered *wnt5*-expressing cells in the proximity of these *slit/Ror*-expressing cells in the central region between the CNS as well as in the posterior dorsal midline. This observation suggests that Wnt5 could be activating a signaling cascade through Ror in those cells.

A possible scenario to explain these observations would be that Wnt5 activates the expression of a *slit* repressor in the same cells in which *slit* is expressed and thus, the expression boundary of *slit* could be established following a “local self-enhancement and long-range inhibition” model (Geirer and Meinhardt, 1972; Meinhardt and Gierer, 2000). In this model, the activator molecule will be activating its own expression along with the expression of its own long-range repressor molecule, which will diffuse slower and farther, enabling the generation of an expression boundary of the activator. The midline stripe expression of Nodal is achieved by the establishment of an expression boundary through its inhibitor Lefty, and it has been shown to operate following this model of differential diffusivity between the activator and the inhibitor secreted from the same cells (Meinhardt, 2004; Muller et al., 2012). Although it is a speculative idea that requires further investigation, the *slit* expression boundary could be established following the same reaction-diffusion model in planarian, with the particularity that the activator molecule, Slit, will activate the expression of its repressor through Wnt5/Ror. In *slit(RNAi)* animals, the expression of *wnt5* fades and loses its pattern, since fewer *wnt5*-expressing cells appeared scattered along the ML axis of the animals. This observation suggests that Slit activates *wnt5* expression, while also restricting it to its domain.

Altogether, the CNS will be positioned by the repulsive action of Wnt5 and Slit respectively in central and lateral regions of the ML axis. Here we provided data that suggest a mutual regulation between these two systems that will allow the formation of their expression boundaries and thus, ensure the robustness of a coordinated system to direct neural tissue regeneration and turnover. Future experiments will focus on finding this putative *slit* inhibitor molecule that will shed light on the regulatory mechanism governing the establishment of expression boundaries, which is the basis of the function of diffusible molecules.

MATERIALS AND METHODS

Planarian culture

Planarians used in these experiments were from a clonal strain of the *S. mediterranea* BCN-10 biotype and were maintained as previously described (Fernández-Taboada et al., 2010). Planarians were starved for 1 week and were 4 to 6 mm in length when used for experiments.

Isolation of *Smed-Ror*

Smed-JNK fragments were identified from the *S. mediterranea* genomic contigs (Washington University, St. Louis, USA).

RNAi analysis

Double-stranded RNAs (dsRNAs) were synthesized by *in vitro* transcription (Roche) as previously described (Sánchez Alvarado and Newmark, 1999), and dsRNA microinjections performed as previously described, following the standard protocol of a 3x32-nl injection of dsRNA for three consecutive days before amputation (one round of injections). Control animals were injected with water or a double-stranded (ds) RNA of the green fluorescent protein (GFP) in the case of combinatorial experiments. For tissue turnover experiments, animals were starved and injected with RNAi for five to six weeks. The following pairs of specific primers were used to generate the dsRNA target gene:

dsRNA against *Smed-Ror*,

5'-: ggtgccgtgtacaaagcagaattag -3';

5'-: ctgcctgtcgtgcgatagtaatcc -3'

Generation of ectopic WNT5 sources

6.4-9.6 nL of a 50 μ g/mL stock solution of recombinant human/Mouse Wnt-5a (R&D systems, 645-WN/CF) was injected in the left side of 18-24 hours regenerated anterior and posterior blastemas of animals placed ventrally. In control animals, the same solution in which Wnt-5a is dissolved was injected (0.1mM EDTA, 0.5%(w/v) CHAPS, 0.1% BSA in PBS 1X). For the analysis of slit expression in non-amputated animals, same amounts of Wnt-5a or the control solution was injected in pre-pharyngeal and post-pharyngeal central regions. It is important to avoid adherence of the Wnt-5a ligand to the needle; thus, small volumes of the Wnt-5a solution were introduced every time in the needle and the injections in the animals have been carried out as fast as possible.

Whole-mount *in situ* hybridization (ISH) and fluorescent whole-mount *in situ* hybridization (FISH)

RNA probes were *in vitro* synthesized using Sp6, T3 or T7 polymerase (Roche) and DIG-, FITC- (Roche) or DNP- (Perkin Elmer) modified ribonucleotides. RNA probes were purified by ethanol precipitation and the addition of 7.5 M ammonium acetate. For ISH, animals were fixed and then processed using an In situ Pro hybridization robot (Abimed/Intavis), as previously described (Umesono et al., 1999). Hybridizations were carried out for 16 h at 56 C. Samples were observed using a Leica MZ16F microscope and images were captured with a Leica DFC300FX camera. For FISH, animals were fixed and processed as previously described (Pearson et al., 2009). Confocal laser scanning microscopy was performed using a Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg) adapted for an inverted microscope (Leitz DMIRB). Images were processed using Fiji software (Schindelin et al., 2012).

Immunostaining

Immunostaining was carried out as described previously (ASA and Newmark). The following primary antibodies were used: antiarrestin (1:15,000; kindly provided by Hidefumi Orii, Himeji Institute of Technology, Hyogo, Japan), antisynapsin (anti-SYNORF1, 1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank), anti- α -tubulin (1:20; Developmental Studies Hybridoma Bank). Images were scanned and processed as described for FISH images.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all members of the E. Saló and F. Cebrià labs for company and discussion; K. Bartscherer for crucial discussions about the regulatory model between Wnt5 and Slit and her lab at Max Planck Institute, Münster for assistance in setting up double FISH protocol; H. Orii and Prof. K. Watanabe for providing anti-arrestin; and B. V. Schardin for English-language editing. Monoclonal anti-SYNORF1 and anti- α -tubulin antibodies were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by the Department of

Biological Sciences, University of Iowa, Iowa City, IA, USA. This work was supported by Grant BFU2008-01544 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain and Grant 2009SGR1018 from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (to E.S.). M.A.-C. and J.R.-L. received a Formación de Personal Investigador fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia.

REFERENCES

- Aboobaker, A. A.** (2011). Planarian stem cells: a simple paradigm for regeneration. *Trends Cell Biol* **21**, 304–311.
- Adell, T., Saló, E., Boutros, M. and Bartscherer, K.** (2009). Smed-Evi/Wntless is required for {beta}-catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration. *Development*.
- Almuedo-Castillo, M., Saló, E. and Adell, T.** (2011). Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 2813–2818.
- Almuedo-Castillo, M., Sureda-Gómez, M. and Adell, T.** (2012). Wnt signaling in planarians: new answers to old questions. *Int J Dev Biol* **56**, 53–65.
- Andrews, W. D., Barber, M. and Parnavelas, J. G.** (2007). Slit?Robo interactions during cortical development. *J Anatomy* **211**, 188–198.
- Angers, S. and Moon, R. T.** (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature Publishing Group* 1–10.
- Blassberg, R. A., Felix, D. A., Tejada-Romero, B. and Aboobaker, A. A.** (2013). PBX/extradenticle is required to re-establish axial structures and polarity during planarian regeneration. *Development* **140**, 730–739.
- Bloch-Gallego, E., Causeret, F., Ezan, F., Backer, S. and Hidalgo-Sánchez, M.** (2005). Development of precerebellar nuclei: instructive factors and intracellular mediators in neuronal migration, survival and axon pathfinding. *Brain Research Reviews* **49**, 253–266.
- Bovolenta, P., Rodriguez, J. and Esteve, P.** (2006). Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. *Development* **133**, 4399–4408.
- Cebrià, F.** (2008). Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: an immunocytochemical study. *Neurosci Res* **61**, 375–384.
- Cebrià, F. and Newmark, P. A.** (2005). Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. *Development* **132**, 3691–3703.
- Cebrià, F. and Newmark, P. A.** (2007). Morphogenesis defects are associated with abnormal nervous system regeneration following roboA RNAi in planarians. *Development* **134**, 833–837.
- Cebrià, F., Guo, T., Jopek, J. and Newmark, P. A.** (2007). Regeneration and maintenance of the planarian midline is regulated by a slit orthologue. *Dev Biol* **307**, 394–406.
- Chen, C.-C. G., Wang, I. E. and Reddien, P. W.** (2013). pbx is required for pole and eye regeneration in planarians. *Development* **140**, 719–729.
- Ciani, L. and Salinas, P. C.** (2005). Signalling in neural development: WNTS in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* **6**, 351–362.
- Dudanova, I. and Klein, R.** (2013). Integration of guidance cues: parallel signaling and crosstalk. *Trends in Neurosciences* **36**, 295–304.
- Evans, T. A. and Bashaw, G. J.** (2010). Axon guidance at the midline: of mice and flies. *Current Opinion in Neurobiology* **20**, 79–85.
- Evsyukova, I., Plestant, C. and Anton, E. S.** (2013). Integrative mechanisms of oriented neuronal migration in the developing brain. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**, 299–353.
- Felix, D. A. and Aboobaker, A. A.** (2010). The TALE class homeobox gene Smed-prep defines the anterior compartment for head regeneration. *PLoS Genet* **6**, 1–8.
- Fernández-Taboada, E., Moritz, S., Zeuschner, D., Stehling, M., Schöler, H. R., Saló, E. and Gentile, L.** (2010). Smed-SmB, a member of the LSm protein superfamily, is essential for chromatoid body organization and planarian stem cell proliferation. *Development* **137**, 1055–1065.
- Fradkin, L. G., van Schie, M., Wouda, R. R., de Jong, A., Kamphorst, J. T., Radjkoemar-Bansraj, M. and Noordermeer, J. N.** (2004). The Drosophila Wnt5 protein mediates selective axon fasciculation in the embryonic central nervous system. *Dev Biol* **272**, 362–375.
- Fradkin, L.G., Dura, J.M. and Noordermeer, J.N.** (2010). Ryks: new partners for Wnts in the developing and regenerating nervous system. *Trends Neurosci* **33**, 84-92.

- Fraguas, S., Barberán, S., Ibarra, B., Stöger, L. and Cebri, F.** (2012). Regeneration of neuronal cell types in *Schmidtea mediterranea*: an immunohistochemical and expression study. *Int J Dev Biol* **56**, 143–153.
- Gierer, A. and Meinhardt, H.** (1972). A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* **12**, 30-39.
- Gurley, K. A., Elliott, S. A., Simakov, O., Schmidt, H. A., Holstein, T. W. and Sánchez Alvarado, A.** (2010). Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Dev Biol* **1–32**.
- Hayashi, T., Motoishi, M., Yazawa, S., Itomi, K., Tanegashima, C., Nishimura, O., Agata, K. and Tarui, H.** (2011). A LIM-homeobox gene is required for differentiation of Wnt-expressing cells at the posterior end of the planarian body. *Development* **138**, 3679–3688.
- Kalil, K., Li, L. and Hutchins, B. I.** (2011). Signaling Mechanisms in Cortical Axon Growth, Guidance, and Branching. *Front. Neuroanat.* **5**, 1–15.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A. and Matsumoto, S.** (2011). Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiologica* **204**, 17–33.
- Killeen, M. T. and Sybingco, S. S.** (2008). Netrin, Slit and Wnt receptors allow axons to choose the axis of migration. *Dev Biol* **323**, 143–151.
- Lapan, S. W. and Reddien, P. W.** (2012). Transcriptome Analysis of the Planarian Eye Identifies ovo as a Specific Regulator of Eye Regeneration. *CellReports*.
- März, M., Seebeck, F. and Bartscherer, K.** (2013). A Pitx transcription factor controls the establishment and maintenance of the serotonergic lineage in planarians. *Development* **140**, 4499–4509.
- Meinhardt, H.** (2008). Current Topics in Developmental Biology. **81**, 1–63.
- Meinhardt, H.** (2012). Turing's theory of morphogenesis of 1952 and the subsequent discovery of the crucial role of local self-enhancement and long-range inhibition. *Interface Focus* **2**, 407–416.
- Meinhardt, H. and Gierer, A.** (2000). Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *BioEssays* **22**, 753–760.
- Meinhardt, H.** (2004). Different strategies for midline formation in bilaterians. *Nat Rev Neurosci* **5**, 502-510.
- Minami, Y., Oishi, I., Endo, M. and Nishita, M.** (2009). Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: Their implications in developmental morphogenesis and human diseases. *Dev Dyn* **NA–NA**.
- Montcouquiol, M., Crenshaw, E. B. and Kelley, M. W.** (2006). Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu Rev Neurosci* **29**, 363–386.
- Muller, P., Rogers, K. W., Jordan, B. M., Lee, J. S., Robson, D., Ramanathan, S. and Schier, A. F.** (2012). Differential Diffusivity of Nodal and Lefty Underlies a Reaction-Diffusion Patterning System. *Science* **336**, 721–724.
- Muller, P., Rogers, K. W., Yu, S. R., Brand, M. and Schier, A. F.** (2013). Morphogen transport. *Development* **140**, 1621–1638.
- Mulligan, K. A. and Cheyette, B. N. R.** (2012). Wnt Signaling in Vertebrate Neural Development and Function. *J Neuroimmune Pharmacol* **7**, 774–787.
- Müller, P. and Schier, A. F.** (2011). Extracellular Movement of Signaling Molecules. *Dev Cell* **21**, 145–158.
- Niehrs, C.** (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Publishing Group* **13**, 767–779.
- Pearson, B., Eisenhoffer, G., Gurley, K., Rink, J., Miller, D. and Sánchez Alvarado, A.** (2009). Formaldehyde-based whole-mount in situ hybridization method for planarians. *Dev Dyn* **238**, 443–450.
- Reddien, P. W.** (2011). Constitutive gene expression and the specification of tissue identity in adult planarian biology. *Trends in Genetics* **27**, 277–285.
- Rink, J. C.** (2012). Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev Genes Evol.*
- Roberts-Galbraith, R. H. and Newmark, P. A.** (2013). Follistatin antagonizes Activin signaling and acts with Notum to direct planarian head regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Sakai, F., Agata, K., Orii, H. and Watanabe, K.** (2000). Organization and regeneration ability of spontaneous supernumerary eyes in planarians -eye regeneration field and pathway selection by optic nerves. *Zool Sci* **17**, 375–381.
- Sanes, J. R. and Zipursky, S. L.** (2010). Design Principles of Insect and Vertebrate Visual Systems. *Neuron* **66**, 15–36.
- Sánchez Alvarado, A. and Newmark, P. A.** (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 5049–5054.

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682.
- Scimone, M. L., Lapan, S. W. y Reddien, P. W.** (2014). A forkhead Transcription Factor Is Wound-Induced at the Planarian Midline and Required for Anterior Pole Regeneration. *PLoS Genet* **10**, e1003999.
- Shaya, O. and Sprinzak, D.** (2011). From Notch signaling to fine-grained patterning: Modeling meets experiments. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 732–739.
- Tanaka, E. M. and Reddien, P. W.** (2011). The Cellular Basis for Animal Regeneration. *Dev Cell* **21**, 172–185.
- Umesono, Y., Watanabe, K. and Agata, K.** (1999). Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes. *Dev Genes Evol* **209**, 31–39.
- Wallingford, J. B.** (2012). Planar Cell Polarity and the Developmental Control of Cell Behavior in Vertebrate Embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Witchley, J. N., Mayer, M., Wagner, D. E., Owen, J. H. and Reddien, P. W.** (2013). Muscle Cells Provide Instructions for Planarian Regeneration. *CellReports* **4**, 633–641.
- Zarin, A. A., Asadzadeh, J. and Labrador, J.-P.** (2014). Transcriptional regulation of guidance at the midline and in motor circuits. *Cell Mol Life Sci* **71**, 419–432.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

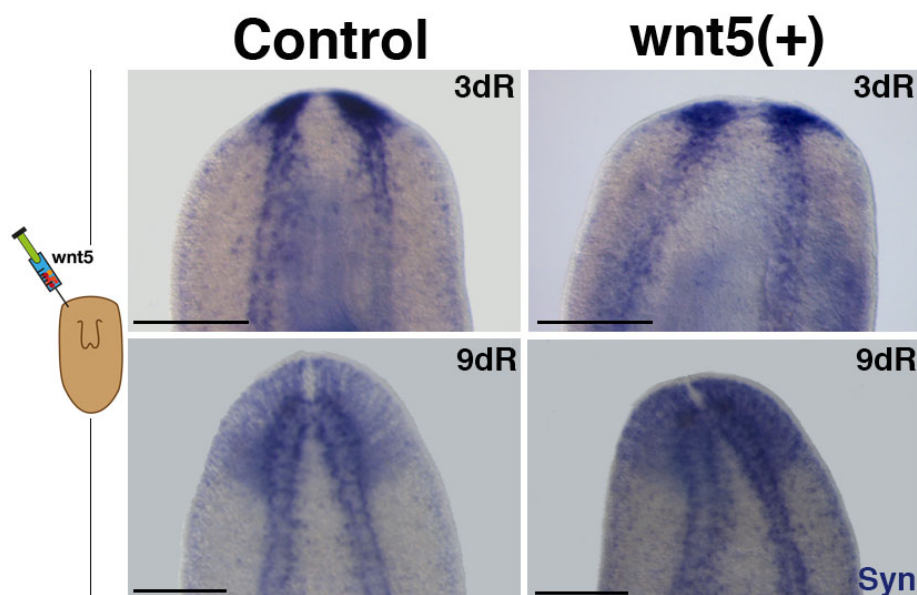


Figure S1: The generation of an ectopic Wnt5 source repels nervous system growth. WISH analysis of the nervous system with *synaptotagmin* (Syn) in animals in which an ectopic Wnt5 source was generated in the ventral/left side of anterior blastemas. (Top, anterior). dR, days of regeneration. Scale bars: 200 μ m.

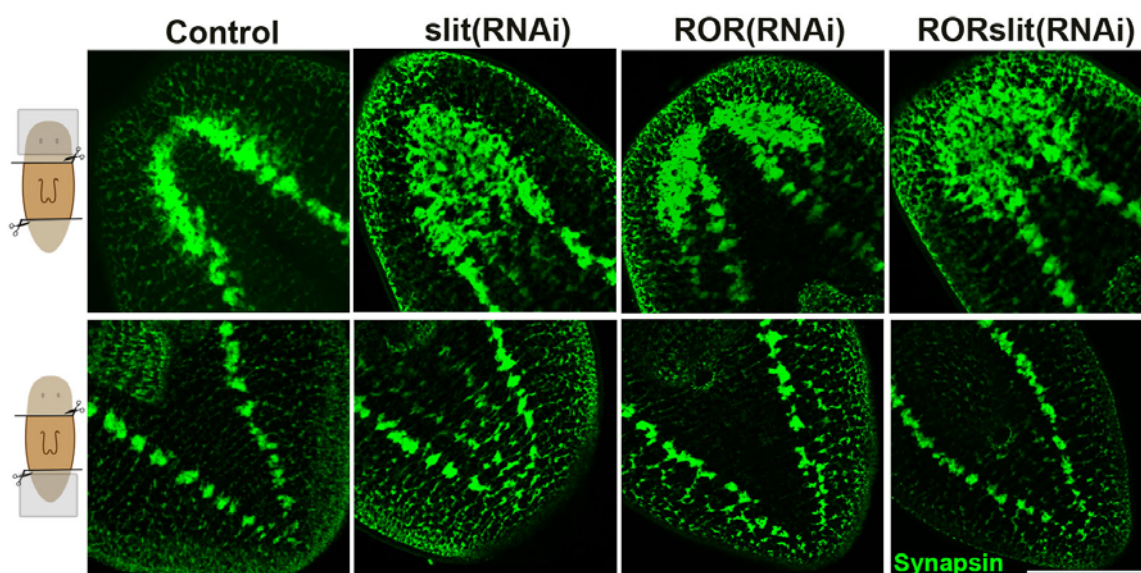


Figure S2: Wnt5/Ror and Slit direct regeneration path of the CNS in an independent manner Immunostaining with anti-synapsin (Synapsin) which allow the visualization of the central nervous system in regenerating trunk fragments 14 days after bipolar amputation. (Top left, anterior). All the images correspond to confocal z-projections. Scale bars: 200 μ m.

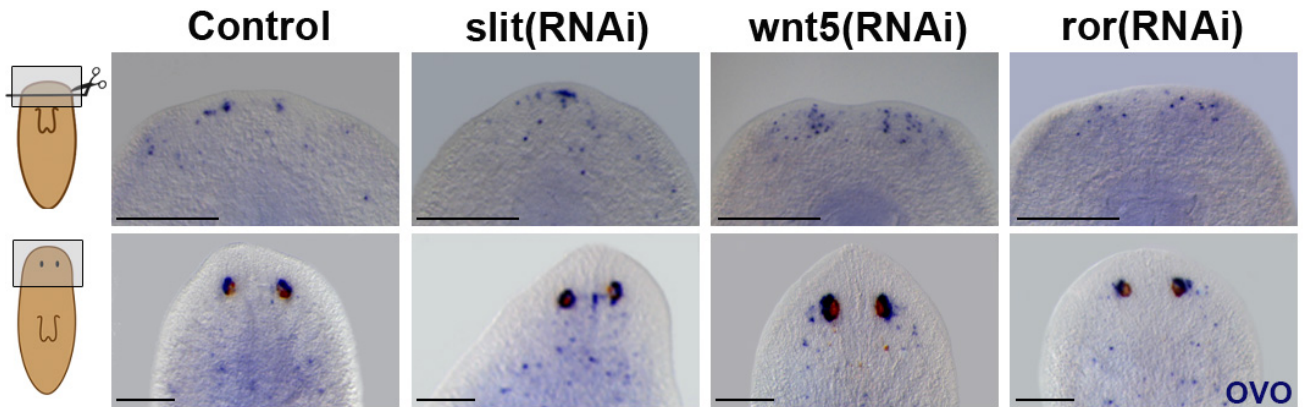


Figure S3: Wnt5/Ror and Slit also directs the migration path of eye progenitor cells

WISH analysis of *ovo* which show the eye and progenitor eye cells after 2,5 days regenerated blastemas after anterior amputation or in the head region of non-amputated RNAi animals. (Top, anterior). Scale bars: 200 μ m.

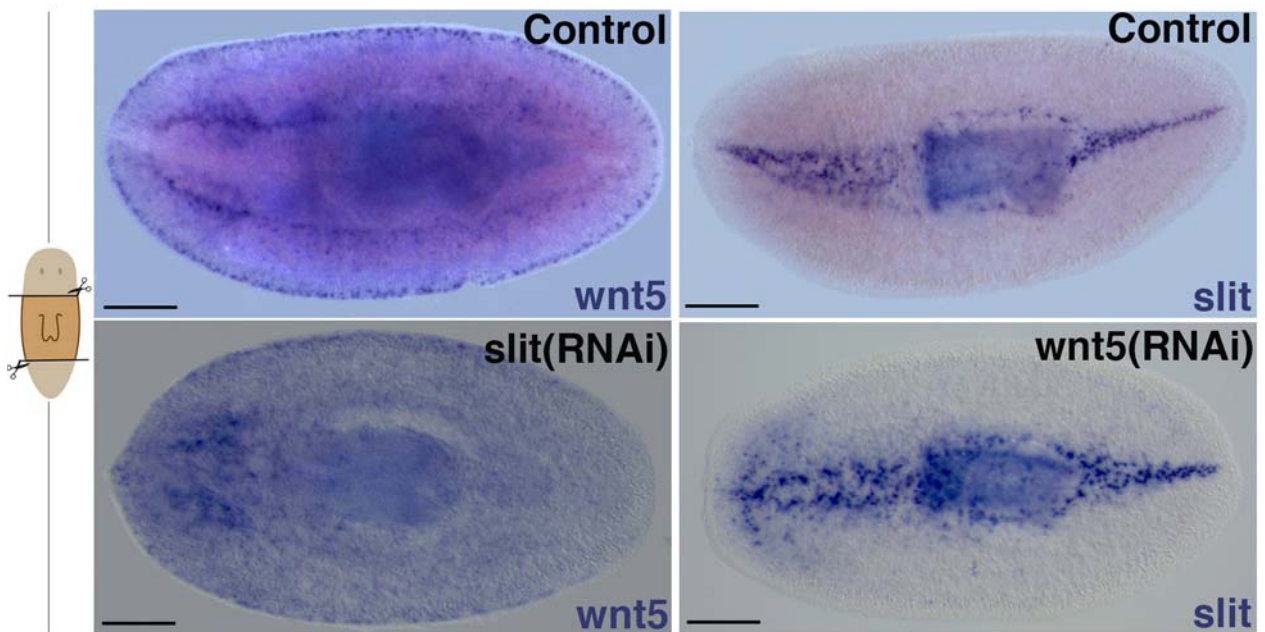


Figure S4: Wnt5 and Slit are a mutually regulated system.

WISH analysis of *wnt5* and *slit* expression in bipolar amputated *slit* and *wnt5*(RNAi) animals, respectively. The animals corresponds to 14 days regenerating trunk pieces (Left, anterior). Scale bars: 200 μ m.

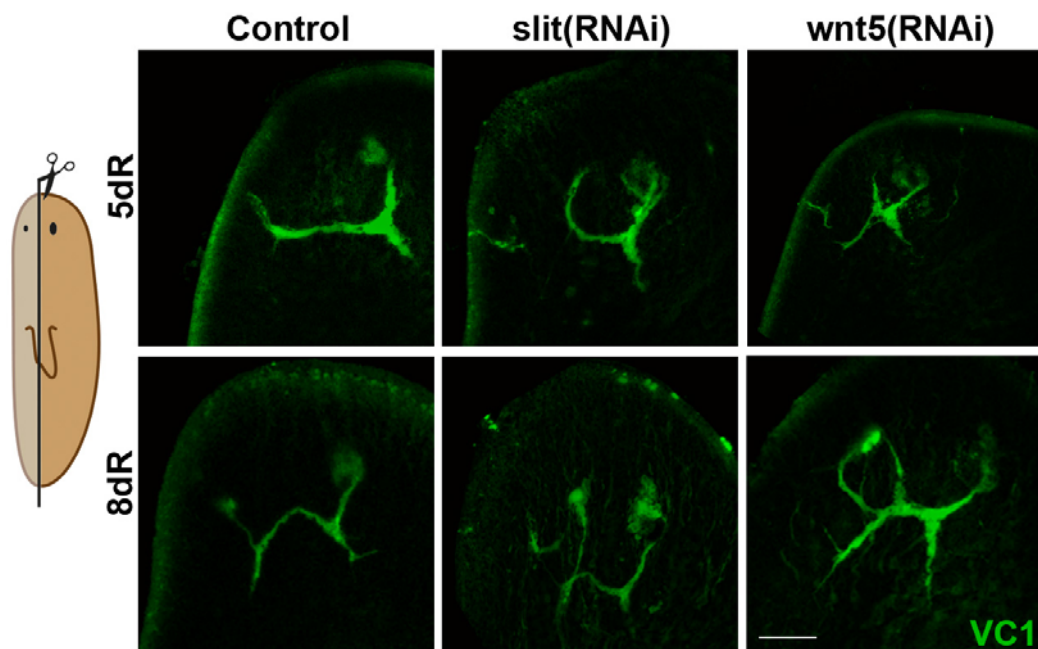


Figure S5: *Wnt5* and *Slit* direct visual axon targeting during lateral regeneration.

Immunostaining with anti-VC1(VC-1) which allows the visualization of the visual system in laterally amputated animals (Top, anterior). All the images correspond to confocal z-projections. dR, days of regeneration. Scale bars: 100 μ m.

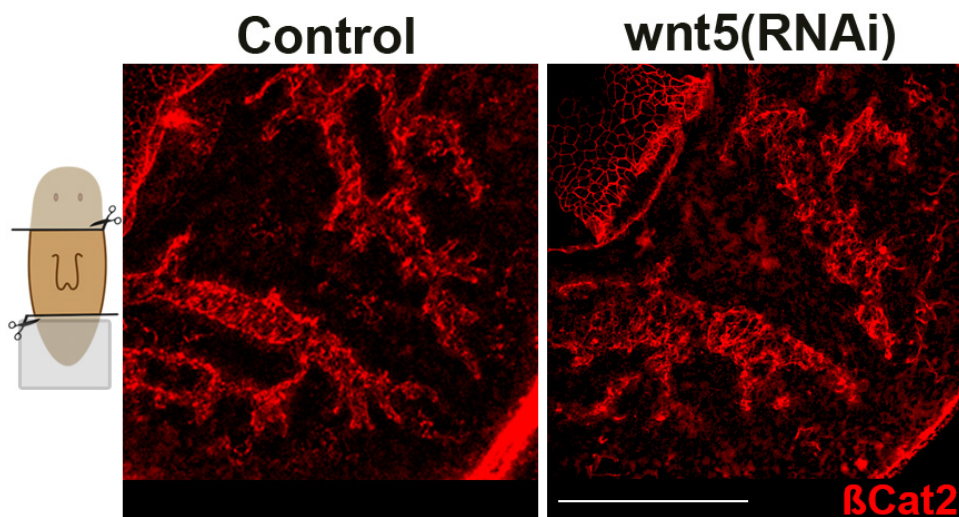


Figure S6: Regeneration of the digestive gut system after *wnt5* RNAi. Immunostaining with anti- β -catenin-2 (β cat2) which allows the visualization of the gut system epithelium. Posterior region of regenerating trunk fragments after a bipolar amputation are shown. (Top left, anterior). All the images correspond to confocal z-projections. Scale bars: 200 μ m.

Artículo 3:

“JNK controls the onset of mitosis in planarian stem cells and triggers apoptotic cell death required for regeneration and remodeling”

María Almuedo-Castillo, Xenia Crespo, Florian Seebeck, Kerstin Bartscherer, Emili Saló y Teresa Adell.

PLOS Genetics, aceptado y en proceso de publicación.

Índice de impacto (2012): 8,517

Resumen en castellano:

La JNK controla la entrada en mitosis de las célula madre de planaria y activa la muerte celular apoptótica necesaria para la regeneración y el “remodeling”

La regeneración de tejidos requiere la coordinación entre la proliferación de las células madre, su diferenciación y la muerte celular de aquellas células innecesarias. Se desconocen cuáles son las señales y los mecanismos moleculares encargados de integrar estos procesos celulares. Para abordar estas cuestiones, empleamos nuestra especie modelo, la planaria *Schmidtea mediterranea*, debido a su impresionante capacidad regenerativa; la presencia de una población de células madres, los neoblastos, y la capacidad de decodificar las señales producidas tras una herida, las hace capaces de regenerar un organismo nuevo, perfectamente proporcionado y funcional a partir de cualquier fragmento generado tras la amputación. Gracias al análisis funcional de la vía JNK, hemos podido observar que esta proteína es necesaria específicamente cuando la herida viene acompañada de pérdida de tejido y que actúa como un centro regulador de procesos moleculares claves durante la regeneración y el recambio tisular. La vía JNK en planarias es esencial para inducir la respuesta regenerativa, ya que modula la expresión de aquellos genes que son requeridos tempranamente en respuesta a una amputación, activa la muerte celular por apoptosis y establece un control temporal de la entrada en mitosis de los neoblastos. Cuando interferimos la actividad de la vía JNK gracias a la técnica de RNA de interferencia, estos procesos están desregulados y el proceso de regeneración se bloquea.

Además, hemos observado que la apoptosis inducida por la JNK es necesaria durante el decrecimiento y en las regiones alejadas de la herida para una correcta remodelación de los órganos y para que la reducción de tamaño ocurra de manera coordinada y den lugar a un organismo proporcionado.

Estas observaciones indican que la JNK traduce la señalización de la herida en la activación de la apoptosis y el control temporal del ciclo celular de los neoblastos, resaltando también la importancia de estos dos procesos en la diferenciación y regeneración de nuevos tejidos.

JNK controls the onset of mitosis in planarian stem cells and triggers apoptotic cell death required for regeneration and remodeling

María Almuedo-Castillo¹, Xenia Crespo¹, Florian Seebeck^{2,3}, Kerstin Bartscherer^{2,3}, Emili Saló^{1,*} and Teresa Adell^{1,*}

¹ Department of Genetics and Institute of Biomedicine, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Catalonia, Spain.

² Max Planck Research Group Stem Cells and Regeneration, Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, 48149 Münster, Germany.

³ Faculty of Medicine, University of Münster, 48149 Münster, Germany.

*Corresponding authors (tadellc@ub.edu; esalo@ub.edu)

Regeneration of lost tissues depends on the precise interpretation of molecular signals that control and coordinate the onset of proliferation, cellular differentiation and cell death. However, the nature of those molecular signals and the mechanisms that integrate the cellular responses remain largely unknown. The planarian flatworm is a unique model in which regeneration and tissue renewal can be comprehensively studied *in vivo*. The presence of a population of adult pluripotent stem cells combined with the ability to decode signaling after wounding enable planarians to regenerate a complete, correctly proportioned animal within a few days after any kind of amputation, and to adapt their size to nutritional changes without compromising functionality. Here, we demonstrate that the stress-activated c-jun–NH₂–kinase (JNK) links wound-induced apoptosis to the stem cell response during planarian regeneration. We show that JNK modulates the expression of wound-related genes, triggers apoptosis and attenuates the onset of mitosis in stem cells specifically after tissue loss. Furthermore, in pre-existing body regions, JNK activity is required to establish a positive balance between cell death and stem cell proliferation to enable tissue renewal, remodeling and the maintenance of proportionality. During homeostatic degrowth, *JNK* RNAi blocks apoptosis, resulting in impaired organ remodeling and rescaling. Our findings indicate that JNK-dependent apoptotic cell death is crucial to coordinate tissue renewal and remodeling required to regenerate and to maintain a correctly proportioned animal. Hence, JNK might act as a hub, translating wound signals into apoptotic cell death, controlled stem cell proliferation and differentiation, all of which are required to coordinate regeneration and tissue renewal.

AUTHOR SUMMARY

Planarians, thanks to their extraordinary regenerative capacity, represent a unique model of animal regeneration. After amputation, new animals regenerate from each individual piece of tissue, leading Dalyell to describe them as “immortal under the edge of the knife” in 1814. Planarians also continuously renew their tissues and adapt their size in accordance with nutritional supply. This amazing plasticity relies on the presence of a population of adult pluripotent stem cell, the neoblasts. However, little is known about the mechanisms that trigger cell responses, such as cell death and division, which are

required to regenerate and maintain tissues and organs in response to injury or nutritional challenge. Here, we show that JNK acts as a hub in the coordination of these events. Specifically in response to tissue loss, JNK modulates the expression of wound-related genes, induces the elimination of unnecessary cells by apoptotic cell death and controls cell division in neoblasts. Loss of JNK function results in the deregulation of these processes and prevents regeneration. Moreover, we demonstrate that JNK-dependent apoptosis is crucial to generate proportioned organisms during tissue turnover. Our findings reveal a central mechanism in planarians that senses tissue loss and translates this information into cellular responses leading to regeneration and tissue renewal.

INTRODUCTION

The regeneration of missing tissues requires tight coordination between stem cell proliferation, differentiation, and cell death. However, it remains unclear how these processes are integrated to generate a well-proportioned organism. We addressed this question using the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*, a popular model system in regeneration research. These animals stand out in housing a pluripotent cell population (neoblasts) throughout their lives [1-7]. Due to their pluripotent nature, neoblasts confer planarians with unmatched plasticity, allowing them to regenerate any body part within a few days and to continuously modulate their size in accordance with energy supply while sustaining physiological functions [8-12]. Planarians thus are a unique model in which to study the molecular processes that underlie regeneration *in vivo*. After any kind of amputation in planarians, the wound is closed by muscle contraction within a few minutes [13,14]. Subsequent signaling from the wound area triggers specific gene activation [15,16], the induction of apoptotic cell death [17] and the controlled induction of neoblast proliferation and differentiation [18,19].

JNK is a stress-activated protein kinase (SAPK) that belongs to a large family of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and regulates essential cellular processes, such as stem cell proliferation, differentiation and programmed cell death, in response to stress [20,21]. As a stress indicator, JNK has been implicated in cell cycle regulation, where it ensures the controlled onset of mitosis [22,23]. Deregulation of JNK-mediated signaling has been demonstrated in a wide variety of human diseases, including neurodegenerative disorders, diabetes and cancer [20, 24]. Transcriptional profile analyses have identified planarian orthologs of downstream effectors of the JNK pathway such as *jun* and *fos* as possible participants in neoblast maintenance [7] and in the wound response program [16].

Here we show that loss of function of the *S. mediterranea* JNK ortholog after RNA interference (RNAi) prevents the regeneration of missing structures. In response to wounding, *JNK(RNAi)* planarians exhibited decreased expression of wound-induced genes, a severe attenuation of the apoptotic response and acceleration of the dynamics of neoblast proliferation between G2- to M-phase transition. In pre-existing regions, the positive balance between cell death and stem cell proliferation was reversed, leading to improper remodeling and rescaling in *JNK(RNAi)* animals. Furthermore, *JNK* RNAi specifically interfered with the maintenance of body proportion during degrowth, but not growth, as only decreases in size were dependent on the activation of apoptosis. These findings point to JNK as an essential stress response element required for the integration

and coordination of the apoptotic and proliferative responses triggered by tissue loss to ensure successful regeneration and tissue remodeling. Moreover, our results contribute to a novel aspect of regeneration: the importance of temporal control of the cell cycle progression of stem cells for balanced differentiation [25].

RESULTS

JNK is required for proper regeneration of missing structures

We identified a single JNK ortholog in the *S. mediterranea* genome (*Smed-JNK*) (Ref for genome, or weblink to Washington) (see alignment in Figure S1A). We performed RNAi of *JNK* to decipher its function during planarian regeneration (Figure S1B-S1C). After head amputation, trunk fragments were unable to regenerate anterior structures such as the brain and the anterior digestive branch. Similarly, head fragments failed to regenerate medial and posterior structures, including pharynx and tail (Figure 1A). Analysis of the pattern of several differentiated structures, such as brain branches (*gpas*+ [26], anterior chemoreceptors (*cintillo*+ [27] and the visual system (*ovo*+ and VC1+) [28, 29], revealed aberrant regeneration in the anterior blastema of *JNK(RNAi)* planarians (Figure 1B).

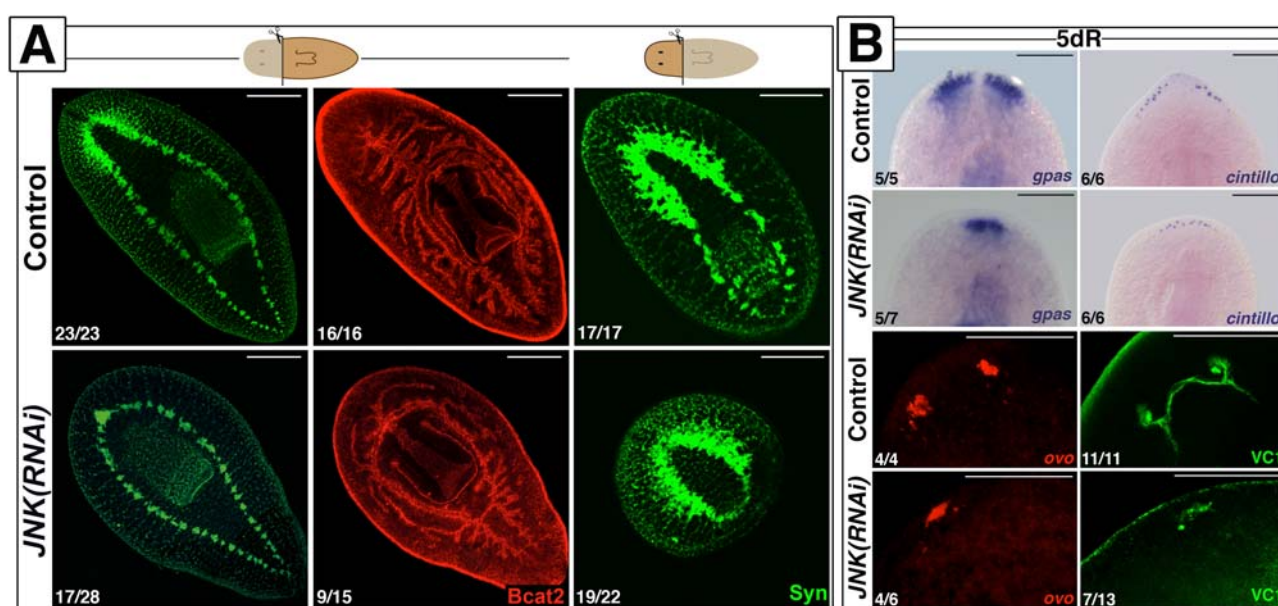


Figure 1. JNK is required for anterior and posterior regeneration

(A) Immunostaining with anti-synapsin (Syn) and anti- β -catenin-2 (Bcat2), which allow the visualization of the central nervous and digestive systems, respectively, in regenerating trunk and head fragments 15 days after anterior amputation. (Top left, anterior). (B) Expression analysis by WISH of the brain branches (*gpas*+), the anterior chemoreceptors (*cintillo*+ and FISH analysis of the expression of eye/eye progenitor cells (*ovo*+). The visual system was visualized by immunostaining with anti-VC1 (VC-1). (Top, anterior). The number of representative samples with respect to the total is indicated in each image Syn, Bcat2 and VC1 images correspond to confocal z-projections. Scale bars: 300 μ m (A), 200 μ m (B). dR, days of regeneration.

We next investigated whether this inability to regenerate was associated with a prior defect in polarity determination. In control animals, a few hours after injury, the expression of the polarity genes (*notum*, *sFRP1*, *wnt1*) is activated in the wound region, and is subsequently polarized and confined to the posterior or anterior midline regions [30-32]. The initial induction of these polarity genes is irradiation insensitive and thus stem cell independent,

whereas the polarization of their expression domains relies on stem cell proliferation [31,32]. Whole-mount *in situ* hybridization (WISH) analysis revealed that the early expression of *notum* (18 hours) and *sFRP1* (24 hours) in anterior wounds of *JNK(RNAi)* animals was indistinguishable from that of control animals (Figure S2) [30-32], as was the early expression (24 hours) of *wnt1* in both anterior and posterior wounds [31] (Figure S2). However, the subsequent polarized and confined expression of these genes was severely attenuated in *JNK(RNAi)* animals (Figure S2). Fading of the anterior expression of *wnt1*, which occurs around 48 h after injury and is known to be stem cell independent [32], was also observed in *JNK(RNAi)* animals (Figure S2). Thus, while the initial establishment of polarity by differentiated cells is JNK-independent, JNK is specifically required for the maintenance of polarity gene expression during later, stem cell-dependent stages. Together, these results demonstrate that JNK is required for proper regeneration of missing tissues independently of the initial specification of identity.

JNK modulates early gene expression triggered after wound closure

Early wound-generated signaling has been proposed to mediate the onset of regeneration after injury [15,16], however the underlying molecular mechanisms remain largely unknown. To assess a putative role of JNK signaling in wound healing, we analyzed the dynamics of wound closure and quantified the expression of the early wound-induced genes *egr1* and *runt1* [15,16] after *JNK RNAi*. Although normal wound closure was observed in *JNK(RNAi)* animals, the blastema shape and size were aberrant (Figure S3), and expression of these early wound-induced genes was diminished (Figure 2-S4), indicating that JNK might be important for proper signal transmission or interpretation at the wound.

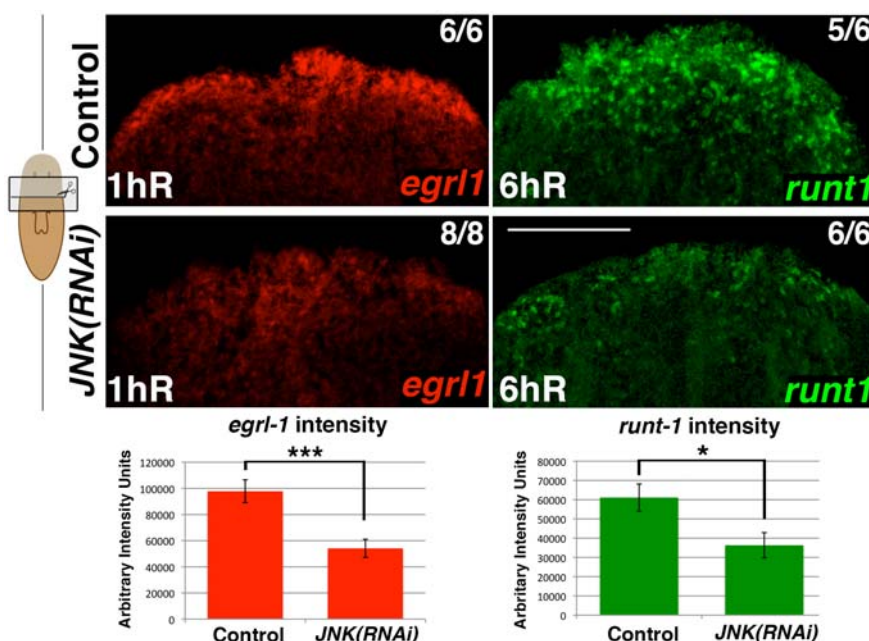


Figure 2. JNK modulates early wound-induced gene expression
FISH analysis of *egr1* and *runt1* expression in trunk fragments in response to wounding (after anterior amputation) and quantification of *egr1* and *runt1* expression. At least five biological replicates were used. (Top, anterior). Error bars represent the standard error of the mean. Scale bars: 200 μ m. hR, hours of regeneration.

JNK attenuates the cell cycle progression of planarian stem cells between G2- to M-phase transition

Neoblast are the only mitotically active somatic cells in the adult planarian [34]. Double fluorescent whole-mount *in situ* hybridization (FISH) analysis of *JNK* and the neoblast

marker *histone 2B (h2b)* [34] showed that *JNK* is expressed in *h2b*-negative differentiated tissues, such as the brain, and in *h2b*-positive neoblasts (Figure 3A). Accordingly, *JNK* expression vanishes specifically in the subpopulation of proliferative cells after eliminating neoblasts by *h2b* RNAi [34] (Figure S5A) or by irradiation [35] (Figure S5B). Expression analysis of *h2b* by FISH and qRT-PCR showed that the proportion of neoblasts in *JNK(RNAi)* animals was similar to that of controls (Figure S5C-S5D). In agreement, sorting of the different planarian cell populations by FACS, a method by which planarian cells can be separated based on their DNA content and size [36,37], showed no alterations in the proportion of actively cycling cells (in the S or G2/M phase of the cell cycle; X1 subpopulation) after *JNK* RNAi (Figure S5E). Therefore, although *JNK* is expressed in neoblasts and essential for regeneration, it is not required for their viability.

Amputation in planarians triggers two waves of neoblast proliferation in a temporally coordinated manner [18,19,38,39]. The first proliferative peak can be detected 6 hours after amputation in response to any type of injury, whereas the second peak, which appears 48 hours after amputation, is only observed after injuries that involve tissue loss and subsequent neoblast recruitment to the wound area [19]. We performed a thorough analysis of the mitotic response in the wound region after anterior amputation by quantifying pH3-positive neoblasts. Although *JNK(RNAi)* animals displayed a bimodal mitotic response after wounding, the temporal dynamic of the response was altered (Figure 3B-S5F). During the first mitotic response (6 hours after amputation), we observed a significant increase in the number of neoblasts entering mitosis as compared with controls (Figure 3B). Furthermore, the second mitotic peak in *JNK(RNAi)* animals was sharper and occurred 37 hours after amputation, 10 hours earlier than in control animals, indicating an earlier onset of mitosis. Finally, we observed an increase in the number of mitotic neoblasts 5 days after amputation in *JNK(RNAi)* animals (Figure 3B). A similar alteration was observed in the wound region of *JNK(RNAi)* animals after posterior amputation (Figure S5G). Quantification of the number of mitotic cells using an alternative method, a modified Gomori technique [18], revealed an alteration in the mitotic profile of *JNK(RNAi)* animals comparable to that demonstrated by quantifying the number of pH3+ cells (Figure S5H).

To further characterize the alteration of the cell cycle dynamics after *JNK* RNAi, we labeled cells in the S-phase of the cell cycle by injecting planarians with the thymidine analogue chlorodeoxyuridine (CldU) before amputation. Detection of CldU labeling in cells expressing the neoblast marker *piwi-1* [35] allowed us to specifically quantify the number of neoblasts that went through S-phase but did not start to differentiate at the time of fixation (16h post-CldU injection and 6h post-amputation). Quantification of CldU/*piwi1*+ cells, as well as of CldU+ cells, revealed no differences between the control and *JNK(RNAi)* animals (Figure 3C), indicating that *JNK* is not required for normal progression through S phase. Conversely, quantification of CldU/*piwi1*+ cells positive for the mitotic marker pH3 (CldU+/*piwi1*+/pH3+) corroborated the significant increase in mitotic cells in *JNK(RNAi)* animals (Figure 3C). The maintenance of the total CldU+ cells shows that the increase of mitotic cells in *JNK(RNAi)* is not explained by a previous increase in S-phase cells, but by a shorter G2 phase and hence a faster entry into mitosis.

FISH and qRT-pCR analysis of post-mitotic neoblast progeny markers - referred to as early (*NB.32.1g*) and late (*Agat-1*) division progeny genes [40] - revealed that the number of cells expressing these markers and their expression levels were unaltered between

control and *JNK(RNAi)* animals in any of the regions analyzed (Figures S6). This suggests that the acceleration of the cell cycle of *JNK(RNAi)* neoblasts does not alter their capacity to exit the proliferative state and produce progeny.

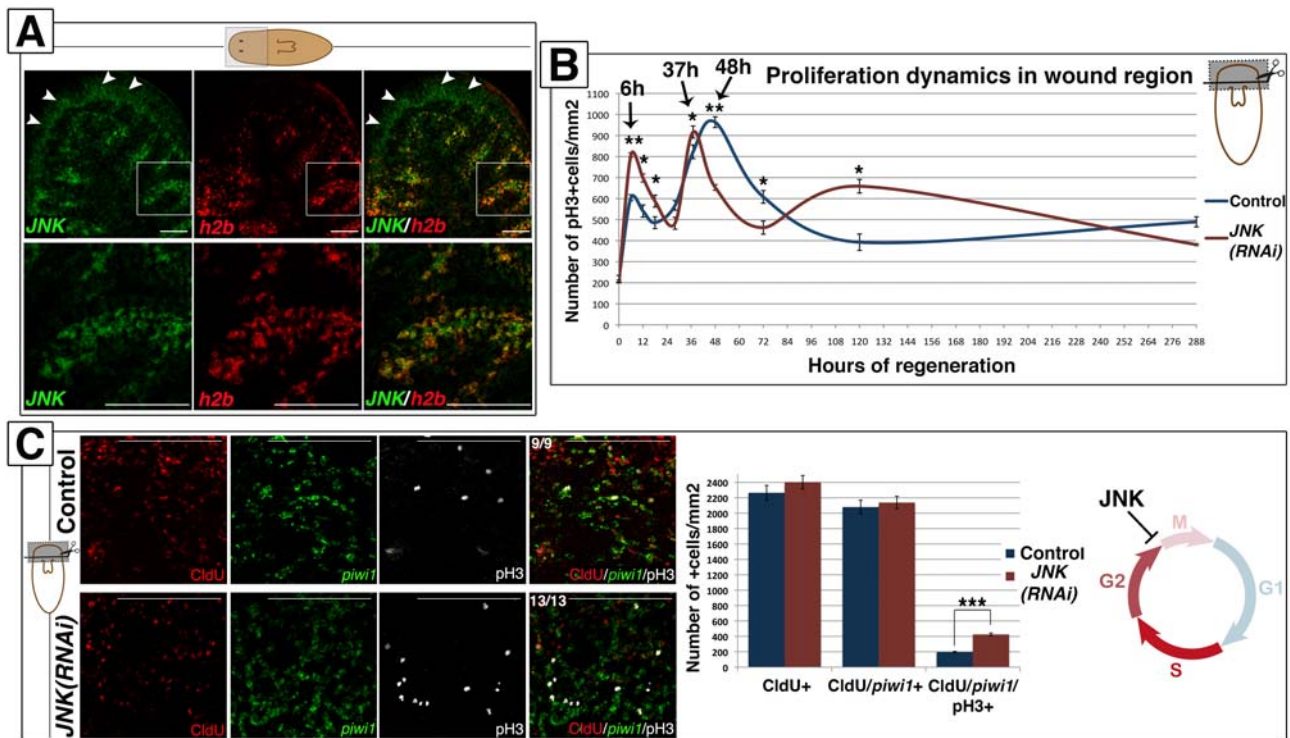


Figure 3. JNK attenuates the cell cycle progression of planarian neoblasts

(A) Double FISH analysis showing *JNK* and *h2b* expression in anterior region of intact animals. White arrowheads point to the sole expression of *JNK* in the brain. White boxes point to the region corresponding to the magnifications showed below where *JNK* and *h2b* are coexpressed in neoblast cells between the gut branches. (B) Graph depicting the quantity of mitotic cells (pH3+) in the wound region during anterior regeneration. At least nine biological replicates were used per time point. (C) Triple labeling of CldU+, *piwi1*+ and pH3+ cells in the wound region 6 hours after anterior amputation. To note all the pH3+ (white) cells were also CldU+ (red). Quantifications of the number of these single CldU+, double CldU+/*piwi1*+ and triple CldU+/*piwi1*+/pH3+ cells are shown. At least nine biological replicates were used. All images correspond to confocal z-projections. (Top left, anterior). Error bars represent the standard error of the mean. Data were analyzed by Student's t-test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; differences are considered significant at $P < 0.05$. Scale bars: 100 μm (B), 50 μm (C). hR, hours of regeneration; dR, days of regeneration.

Altogether, these results indicate that, although *JNK* is expressed in neoblasts, it is not essential for their viability but for the control of their cell cycle length. Hence, in planarians, *JNK* controls the wound-induced proliferative response attenuating the transition between G2- to M-phase.

JNK is required for apoptotic cell death and to restore body proportion after amputation

Cell death is necessary for tissue remodeling during planarian regeneration [17, 41]. In planarians, amputation triggers two peaks of apoptotic cell death, one 4 hours after injury, which is localized in the wound region, and a second peak 3 days after amputation that spreads throughout the organism [17]. These apoptotic responses are stem cell-independent and thus, occur almost exclusively in post-mitotic cells [17]. Using the TUNEL assay, we analyzed apoptotic cell death after anterior amputation in whole-mount preparations and tissue sections, and found that *JNK RNAi* prevents the activation of apoptosis both in regenerating and pre-existing regions (Figure 4A-S7A-S7B). Analysis of

mitotic rates during the regenerative process in pre-existing regions revealed an altered profile with a general increment in the number of mitotic cells in *JNK(RNAi)* animals with respect to control counterparts (Figure 4C), an effect that was also observed after posterior amputation (Figure S7C). Thus, in pre-existing regions in which remodeling is required, *JNK(RNAi)* planarians exhibited a complete inhibition of the apoptotic response, together with an increase in the rate of proliferation.

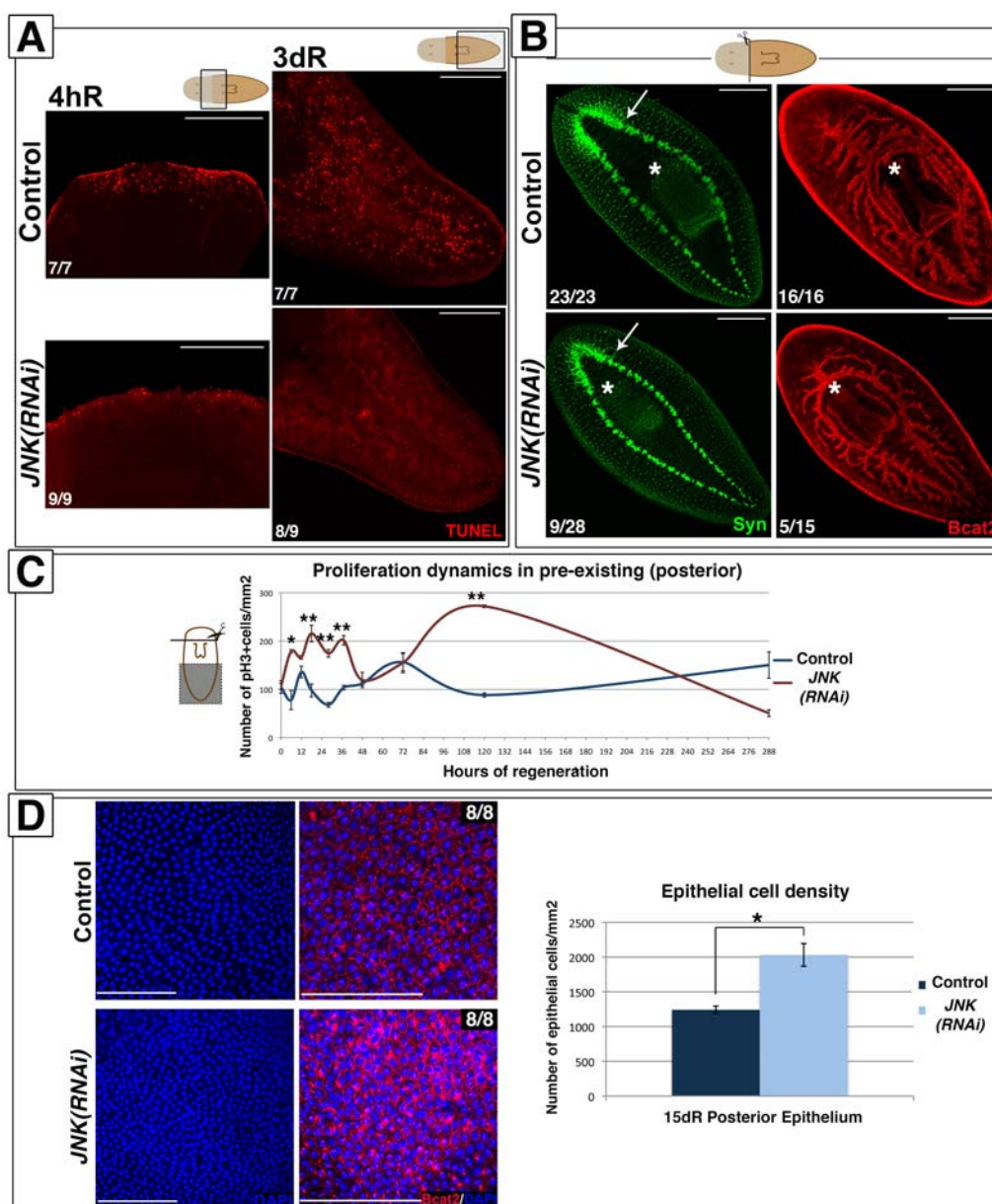


Figure 4. JNK triggers apoptosis and restores proportionality after amputation

(A) Whole-mount TUNEL staining showing apoptotic cells in the wound region (4 hR) and in pre-existing regions (3 dR) after anterior amputation. (Top/top left, anterior). (B) Immunostaining with anti-synapsin (Syn) and anti- β -catenin-2 (Bcat2) antibodies in regenerating trunk fragments 15 days after anterior amputation. These animals are the same as those used in the experiment depicted in Figure 1A. The white asterisk and arrow indicate the pharynx and the distal-most part of the brain, respectively. (Top left, anterior). (C) Graph showing the quantity of mitotic cells (pH3+) in pre-existing (posterior) regions after anterior regeneration. At least nine biological replicates were used per time point. (D) DAPI and Bcat2 staining of the epithelia (Top left, anterior) and quantification of the number of epithelial cells/mm² in these post-pharyngeal (pre-existing) regions in regenerating trunks 15 days after amputation. Eight biological replicates were used per time point. All images correspond to confocal z-projections. Error bars represent standard error of the mean. Data were analyzed by Student's t-test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; differences are considered significant at $P < 0.05$. Scale bars: 200 μ m (A), 300 μ m (B), 50 μ m (D). hR, hours of regeneration; dR, days of regeneration.

This inversion of the balance between cell death and cell proliferation in *JNK(RNAi)* animals prevents the restoration of correct body proportion, as evidenced by their inability to re-adjust the position of pre-existing organs such as the pharynx as regeneration proceeds (Figure 4B). The disruption of rescaling is not due to a complete inability to regenerate, as these defects were also observed in the less penetrant *JNK(RNAi)* phenotypes, which can at least partially regenerate anterior structures such as the brain (Figure 4B).

The lack of apoptosis in pre-existing regions should generate a larger number of cells than found in controls. To determine the fate of these cells we quantified the number of DAPI-stained epidermal cells. Interestingly, the number of epidermal cells was increased in the posterior epithelium of *JNK(RNAi)* versus control animals (Figure 4D), suggesting that an increased number of cells might contribute to the epidermis, and possible other tissues.

These findings indicate that JNK activity is essential to trigger wound-induced apoptotic cell death as well as the second systemic apoptotic response during planarian regeneration. Inhibition of JNK-dependent apoptosis and probably together with the increase in proliferative rates, prevents remodeling of pre-existing regions and causes the higher density of epithelial cells. Importantly, these results demonstrate that in planarians, the induction of neoblast proliferation might be independent of apoptotic cell death.

JNK requirements are specific to injuries involving tissue loss

Wound signaling induced by a simple incision without the loss of tissue causes cell responses different from that induced by amputation [19]. Healing of a simple incision is characterized by single apoptotic and mitotic peaks; secondary peaks are only observed in response to injury involving tissue loss [19] (Figure 5A-5B-S8A). Wound-associated mitotic and apoptotic responses after a simple lateral incision did not differ between *JNK(RNAi)* and control animals (Figure 5A-5B-S8A). Moreover, the expression of early response genes, normally triggered by this type of injury [15], was unchanged in *JNK(RNAi)* animals (Figure S8B).

To determine the degree of injury that requires JNK-mediated regeneration we performed lateral amputations, removing small portions of tissue (notching). As seen after complete amputation, we observed two temporally coordinated mitotic peaks in control animals (Figure 5C-S8C). In *JNK(RNAi)* animals, both proliferative peaks were affected in the same manner observed after anterior amputations: the first mitotic peak was augmented and the second occurred 10 hours earlier than in controls (Figure 5C-S8C). Analysis of the apoptotic rates in control animals revealed that lateral notches also induced two apoptotic responses: an early wound-related peak and a second more systemic peak, reflecting the need for remodeling after the loss of tissue. As observed after anterior amputation, JNK was essential to trigger an apoptotic response after notching (Figure 5D) and regeneration was impaired in *JNK(RNAi)* animals, as evidenced by the disrupted ventral nerve cord (Figure S8D). Thus, in contrast to the healing process observed after simple incision, regeneration after notching requires JNK for proper cell cycle dynamics and apoptosis. Taken together, these findings demonstrate that JNK is only essential for responses that require the regeneration of missing tissues.

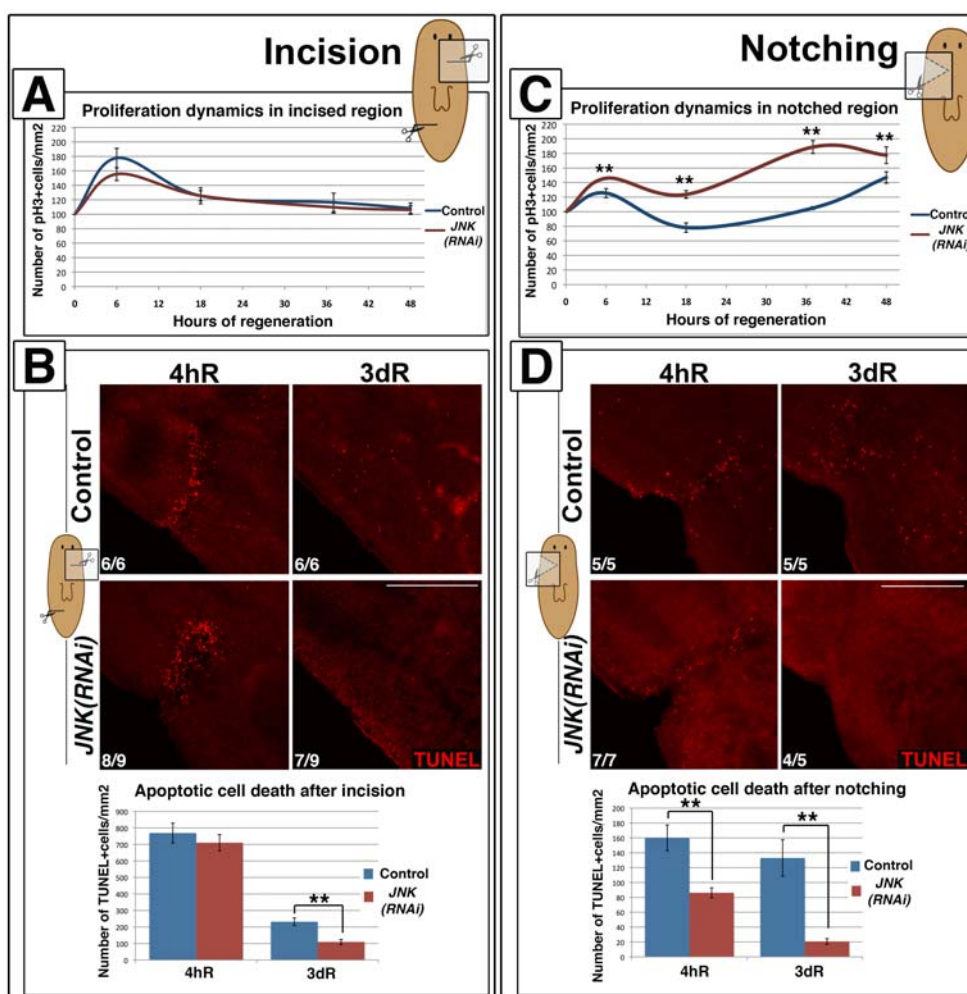


Figure 5. JNK is specifically required for *de novo* tissue regeneration

(A) Graph showing proliferation dynamics after a lateral incision without loss of tissue. At least four biological replicates (2 incisions per organism) were used per time point. **(B)** Whole-mount TUNEL staining showing apoptotic cell death responses and graph depicting the quantification of TUNEL-positive cells after a simple incision. At least six biological replicates (2 incisions per organism) were used per time point. **(C)** Graph showing proliferation dynamics after a small lateral amputation with loss of tissue. At least four biological replicates were used per time point for quantification. **(D)** Whole-mount TUNEL staining showing apoptotic cell death responses and graph depicting the quantification of TUNEL-positive cells after a small lateral amputation. At least five biological replicates were used per time point. (Top left, anterior). TUNEL images correspond to confocal z-projections. The area analyzed for quantification of TUNEL+ cells density was more restricted to the wound region for incisions than for notchings. Error bars represent the standard error of the mean. Data were analyzed using a Student's t-test. ** $P < 0.01$; differences are considered significant at $P < 0.05$. Scale bars: 200 μm . hR, hours of regeneration; dR, days of regeneration.

Rescaling during degrowth requires JNK-dependent activation of apoptosis

Planarians undergo degrowth in the absence of nutrients while maintaining their physiological functions [8]. Degrowth is accompanied by an increase in cell death [17, 42] and maintenance of the neoblast population and baseline rates of proliferation. During starvation-induced degrowth (Figure S9A–S9B) *JNK* RNAi resulted in the near to complete abolition of apoptotic cell death (Figure 6A). However, baseline mitotic rates and neoblast population levels remained constant after *JNK* RNAi (Figure 6B–S9C–S9D).

Planarians exhibit allometric rescaling during their continuous size changes with positive rescaling of the post-pharyngeal region as compared with the pre-pharyngeal region [43]. We investigated whether the imbalance between apoptosis and proliferation in *JNK*(RNAi) animals undergoing degrowth altered rescaling.

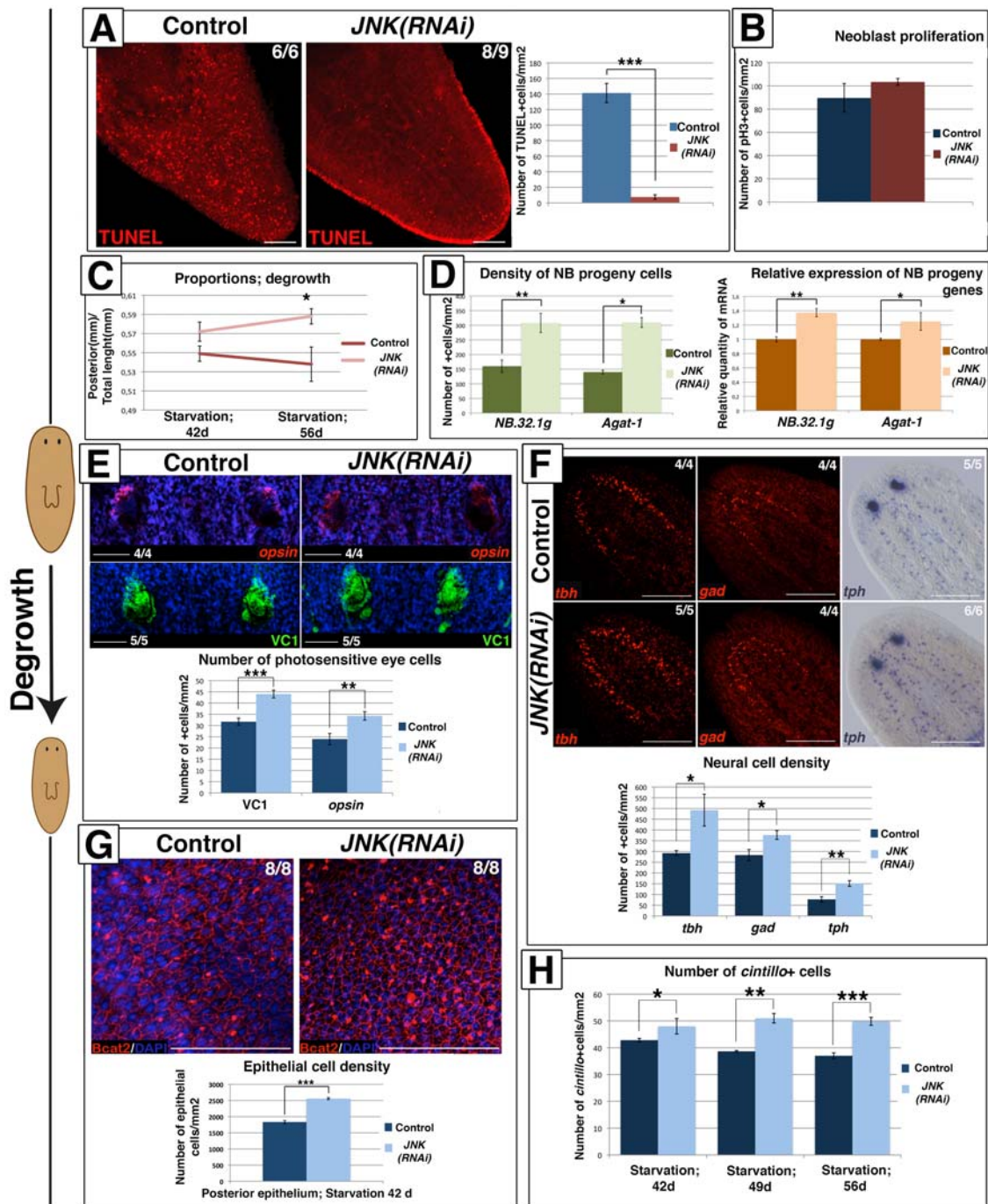


Figure 6. JNK-dependent apoptosis is required for proper remodeling during degrowth

(A) Whole-mount TUNEL staining showing apoptotic cell death during degrowth in post-pharyngeal regions and graph showing quantification of cells dying by apoptosis (TUNEL-positive) in animals starved for 42 days. At least six biological replicates were used. (B) Graph showing quantification of mitotic (pH3+) cells in animals starved for 42 days. At least nine biological replicates were used. (C) Graph showing the size of the post-pharyngeal region (from pharynx anchoring to tail tip) relative to the whole-body length during degrowth. Values represent the means of 15 biological replicates. (D) Quantification of *NB.32.1g* and *Agat-1* expression in starved animals. The green histograms depict the quantification of cells positive for these two markers after FISH. At least four biological replicates were used. The orange histograms depict the relative expression of the two markers as determined by qRT-PCR. Values represent the means of three biological replicates. (E) FISH analysis of photoreceptor cells (*opsin*+), immunostaining of the visual system (VC1+) with DAPI counterstaining and graph showing the quantification of the number of photoreceptor cells/eye in animals starved for 42 days. Four biological replicates (8 eyes) were used. (F) FISH analysis of GABAergic (*gad*+), octopaminergic (*tbh*+), serotoninergic (*tph*+), WISH analysis of serotoninergic (*tph*+), and graph showing the quantification of the number of neural cells/mm² in the brains of animals starved for 42 days. (G) Staining of the epithelia with DAPI and anti- β -catenin-2 antibody (Bcat2), and graph showing the quantification of the number of epithelial cells/mm² in post-pharyngeal regions of animals starved for 42 days. Eight biological replicates were used. (H) Quantification of the number of *cintillo*+ cells in the anterior region during the starvation process. At least five biological replicates were used. (Top left, anterior). All images, except for the *tph* image, correspond to confocal z-projections. Error bars represent standard error of the mean. Data were analyzed by Student's t-test. *P<0.05; **P<0.01; ***P < 0.001; differences are considered significant at P<0.05. Scale bars: 100 μ m (A), 50 μ m (E), 300 μ m (F), 50 μ m (G). d, days of starvation.

To this end, we analyzed proportionality by measuring the length of the posterior portion of the body (from the pharynx anchoring to the tail tip) relative to whole-body length (Figure S9E). No decrease in the length of the posterior portion was observed in *JNK(RNAi)* versus control animals as starving proceeded (42 days vs. 56 days of starvation), indicating that rescaling is impaired when JNK-dependent apoptosis is prevented (Figure 6C). Starvation-induced degrowth leads to a decrease in the number of neoblast progeny cells [42] and a coordinated reduction in the number of cells in pre-existing organs to accommodate to the adjustment in body size. We studied the effects of blocking apoptosis in degrowing *JNK(RNAi)* animals on the number of progeny cells and the morphogenesis of structures such as the epithelium, eyes and brain. The decrease in neoblast progeny observed in *JNK(RNAi)* animals was less pronounced than that seen in starved control animals (Figure 6D-S9F). Quantification of the number of visual system cells (*VC1+*, *opsin+*) [29,44], specific neuronal cell types (*GABAergic*, *gad+* [45]; *octopaminergic*, *tbh+* [46] and *serotonergic*, *tph+* [47]) and epithelial cells, revealed an increase in the density of all differentiated cell types tested in degrowing *JNK(RNAi)* animals (Figure 6E-6F-6G-S9G). Moreover, analysis of the population of *cintillo+* cells during starvation revealed a decreasing number of this anterior-specific cell type in degrowing control animals but not in degrowing *JNK(RNAi)* animals (Figure 6H-S9H).

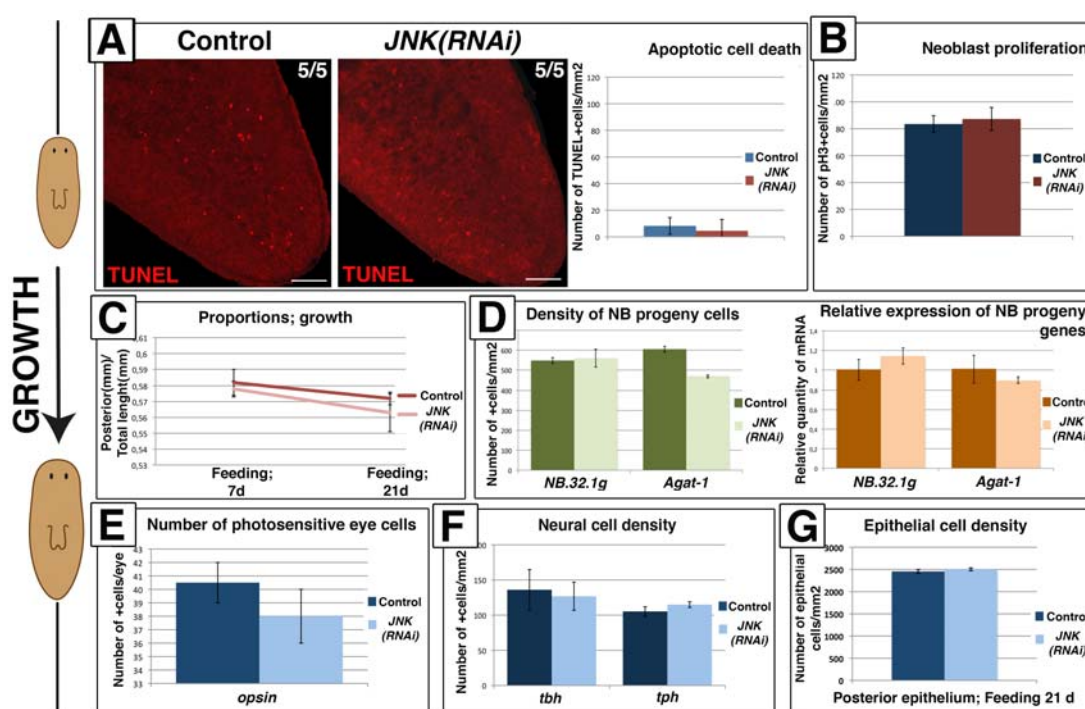


Figure 7. Remodeling during growth does not depend on JNK-dependent apoptotic cell death

(A) Whole-mount TUNEL staining showing apoptotic cell death during growth in post-pharyngeal regions and graph showing the quantification of cells dying by apoptosis (TUNEL+) in animals fed for 7 days. At least five biological replicates were used. (B) Graph showing quantification of mitotic cells (pH3+) in animals fed for 7 days. At least 10 biological replicates were used. (C) Graph showing the size of the post-pharyngeal area (from the pharynx anchoring to tail tip) relative to whole-body length during growth. Values represent the means of 15 biological replicates. (D) Quantification of *NB.32.1g* and *Agat-1* expression. Green histograms depict the quantification of cells positive for these two markers after FISH. At least four biological replicates were used. Orange histograms depict the relative expression levels of the two markers as determined by qRT-PCR. Values represent means of three biological replicates. (E) Quantification of the number of photoreceptor cells (*opsin+*)/eye of animals fed for 21 days. Three biological replicates (6 eyes) were used. (F) Quantification of the number of neural cells/mm² in the brains of animals fed for 21 days. At least four biological replicates were used. (G) Quantification of the number of epithelial cells/mm² in post-pharyngeal regions of animals fed for 21 days. Six biological replicates were used. (Top left, anterior). All images correspond to confocal z-projections. Error bars represent standard error of the mean. Data were analyzed by Student's t-test. Differences are considered significant at P<0.05. Scale bar: 100 μ m. d, days of feeding.

Analysis of brain morphology in DAPI-stained tissue sections indicated that the increase in cell density in *JNK(RNAi)* animals was associated with a disruption of brain architecture (Figure S9I).

The process of degrowth is reversible; starved planarians return to their original size when feeding is reinstated [8,42]. A proliferative peak has been described 1 day after feeding, after which mitotic rates return to baseline levels [38,42]. Planarian growth is also accompanied by a decrease in apoptotic cell death to minimum levels [17] and an increase in the number of neoblast progeny cells [42]. During growth promoted by sustained feeding (Figure S10A–S10B), *JNK(RNAi)* animals exhibited no changes in the rate of apoptotic cell death since minimal levels of apoptosis were also observed in growing control animals (Figure 7A). Furthermore, growing *JNK(RNAi)* maintained neoblast population levels and baseline mitotic rates (Figure 7B-S10C–S10D). In agreement with these observations, growing *JNK(RNAi)* planarians underwent normal rescaling (Figure 7C-S10E). Moreover, we observed no differences in the number of neoblast progeny cells (Figure 7D-S10F), density of the differentiated cells analyzed (Figure 7E-7F-7G-S10G-S10H-S10I) or in brain structure (Figure S10J) between growing *JNK(RNAi)* animals and controls.

Taken together, these findings demonstrate that JNK is required to maintain body proportions and to remodel organs by the induction of apoptotic cell death specifically during degrowth when apoptosis is required to allow size reduction.

DISCUSSION

JNK-mediated control of cell cycle progression is required for the stem cell proliferative response during planarian regeneration

The coordination of cell proliferation, differentiation, and apoptosis is central to a number of physiological and pathological processes, including tissue homeostasis, development and cancer [48]. Planarians are a promising model organism for the *in vivo* analysis of the coordination of these processes. The molecular basis for the initiation of neoblast proliferation in response to injury remains largely unknown. It has been proposed that the first mitotic peak would correspond to the shortening of the G2/M transition of neoblasts that were in G2- or S-phase at the time of the injury [18,19]. Furthermore, given that the mitotic minimum between the two peaks is not due to the cessation of proliferative input, it has been proposed that the same early wound-induced signal triggers the two temporally distinct mitotic peaks [19]. These findings suggest that the two proliferative waves correspond to different sets of neoblasts: those in the G2- or S-phase that enter mitosis earlier and produce the first mitotic peak, and those still in G0/G1-phase that produce the second one, as they need to migrate and complete the cell cycle to enter mitosis [18]. Neoblast descendants from the first peak may also participate in the second peak. Our CldU labeling results showed that 6 hours after amputation, all pH3 positive cells were also positive for CldU (pH3+/CldU+), indicating that all the cells entering mitosis 6 hours post-amputation had been in S-phase during CldU labeling. The fact that we were unable to detect neoblasts in the G2-phase prior to amputation (pH3+/CldU-) supports the hypothesis that this G2 subpopulation does not significantly contribute to the first proliferative peak [49]. However, two factors must be considered: i) these neoblasts would

be the first ones reaching M-phase earlier since the first mitotic response already starts 3 hours after cutting [19,38], and ii) these neoblasts might have already started to enter mitosis during the previous stimulus induced by the CldU injection (10 hours before amputation).

The role of JNK as a cell cycle checkpoint has been previously described in human cell cultures. JNK responds to stress stimuli by delaying the G1/S [50] and the G2/M transitions, thus temporally controlling the onset of mitosis [22,23]. Interestingly, our double CldU/pH3 labeling results showed an increase in mitotic cells in *JNK(RNAi)* animals while maintaining the number of cycling cells that have gone through S-phase. These results indicate that in planarians JNK attenuates cell cycle progression between G2- to M-phase rather than between G1- to S-phase transition.

The sharper and earlier second mitotic peak seen in *JNK(RNAi)* versus control animals further supports compression of the cell cycle progression of neoblasts after JNK inhibition. The increase of mitotic neoblasts in *JNK(RNAi)* animals five days after anterior amputation may indicate that the mitotic response remains active due to failed execution of the regenerative response.

A previous study on the role of JNK in the planarian species *Dugesia japonica* showed that treatment with the JNK inhibitor SP600125 blocks the entry of neoblasts into M-phase, leading the authors to propose a role for JNK in promoting the G2- to M-phase transition of neoblasts [51]. The lack of consistency between those findings and our own data might be due to species-specific differences or off-target effects by SP600125, which can bind to a broad range of protein kinases [52,53].

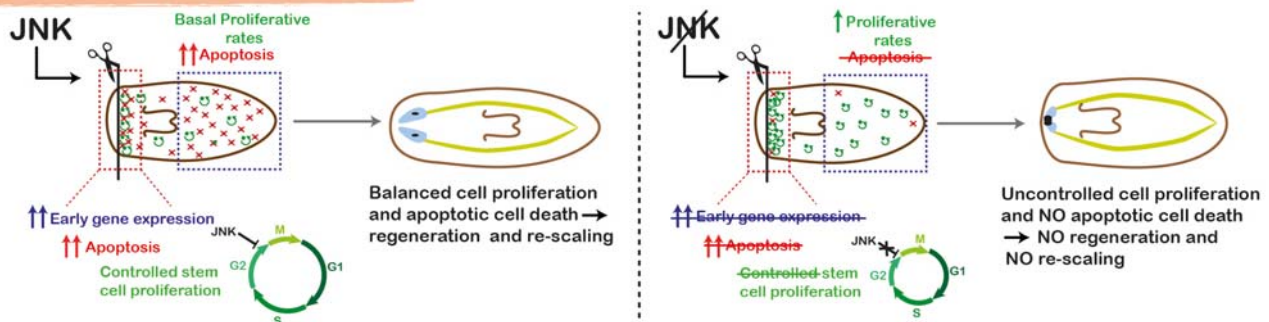
Our data reveal a molecular mechanism in planarians that controls the onset of neoblast division in response to injury, specifically by the attenuation of the G2- to M transition.

JNK controls wound signaling, cell death and coordinated stem cell proliferation specifically elicited by tissue loss

Injury triggers a plethora of signals that regulate the onset of regeneration. In planarians, early regeneration involves not only temporally controlled neoblast proliferation [18,19], but also the induction of the expression of a repertoire of early genes [15,16] and an apoptotic response [17], accompanied by tightly coordinated cell differentiation and identity specification (Figure 8). Our results demonstrate that in contrast to the previously described function of JNK during *Drosophila* imaginal disc regeneration [54,55], wound closure in planarians is JNK-independent, probably because in planarians this is a predominantly mechanical process that does not require directed cell migration through actin cables and filopodial extensions. However, JNK is required during the first stages of regeneration to properly induce the expression of early wound-induced genes, the initiation of the wound-associated apoptotic peak and the controlled onset of mitosis (Figure 8). Due to the pleiotropy of JNK, we are not able to discern if JNK independently controls all these processes, or if they are functionally dependent.

Both the wound-related expression of *Runt1*, which has been directly linked with the specification of neural precursors [16], and the production of *ovo+* eye progenitors [28] were decreased after amputation in *JNK(RNAi)* animals as compared with controls. This decrease points to impaired production of neural progenitor cell types, as also suggested by the impaired regeneration of neural tissues in these animals.

Amputation → REGENERATION



Starvation → DEGWORTH

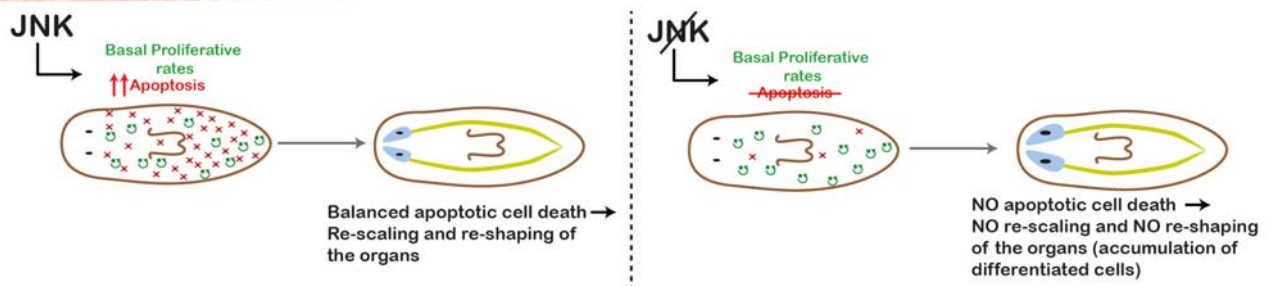


Figure 8. Schematic showing role of JNK in planarian regeneration and homeostatic degrowth.

In the wound region, JNK triggers early-gene expression and apoptosis, and mediates temporal control of the cell cycle progression of neoblasts, which ensures the balanced differentiation of different cell types and hence proper regeneration of missing tissues. In pre-existing regions, JNK triggers apoptosis and maintains basal levels of proliferation to ensure that body proportion is properly restored after amputation. RNA interference of JNK activity prevents all these processes in both the wound region and in pre-existing regions, as well as regeneration and rescaling.

Regeneration after notching, a process that does not require anterior or posterior re-specification, was also defective in *JNK(RNAi)* animals. Given that early establishment of polarity was unaffected by *JNK RNAi*, these findings suggest that JNK is required for tissue regeneration of structures and the production of neural progenitor cells, independently of the initial identity specification.

Expression of the post-mitotic neoblast progeny markers *NB.32.1g* and *Agat-1* is associated with the initiation of the differentiation process [40]. The maintenance of their expression in *JNK(RNAi)* planarians suggests that, although the cell cycle is altered, the neoblasts can exit their proliferative cycle and produce the progeny related to these specific markers. Alternatively, a reduction in the number of progeny cells related to defective differentiation in *JNK(RNAi)* animals might be compensated for the lack of death of these progeny cells, making the reduction impossible to detect. However, the nature of the cells expressing these progeny genes remains obscure. It has been shown that these genes do not specify a common state for all post-mitotic neoblasts [56], and there is no evidence indicating that they mark a specific cell lineage.

Whether induction of apoptosis or the control of mitotic onset is the most relevant JNK function during regeneration remains to be elucidated. On the one hand, several recent findings support a link between alterations in cell cycle progression and improper differentiation; shortening of the cell cycle can inhibit neuronal differentiation during *Xenopus* development [57] and enhance the differentiation of epidermal keratinocytes [58]. In planarians, JNK-mediated arrest of cell cycle progression may be required to provide a time window during which neoblasts embark upon specific programs of differentiation. In

that sense, our data support the recently proposed “specialized” neoblast model [19,59], which proposes that a pluripotent neoblast commences determination before becoming post-mitotic progeny, giving rise to specialized progenitors. On the other hand, wound-induced apoptosis has been shown to be essential for tissue regeneration since apoptotic cells release mitogenic factors to stimulate the proliferation of surrounding cells, a process known as compensatory proliferation [48,60,61], which has been recently renamed “apoptosis-induced proliferation” [62]. Our results, however, indicate that apoptosis-induced proliferation might not occur during planarian regeneration. While *JNK* RNAi led to a reduction in apoptosis, a subsequent reduction in proliferation was not observed either in the blastema or during the remodeling of pre-existing tissues. The induction of neoblast proliferation in response to amputation or during tissue turnover thus appears to be independent of factors released by apoptotic cells, if present. Alternatively, given that compensatory proliferation is controlled by JNK during *Drosophila* wing disc development [63], it is possible that no direct relationship between apoptosis and proliferation is observed in *JNK(RNAi)* animals because compensatory proliferation may also be JNK-dependent in planarians. Furthermore, it should be noted that JNK is required for the appropriate expression of the early-wound induced genes, probably also essential to launch regeneration [15,16].

Finally, our data demonstrate that JNK is required for appropriate regenerative responses elicited exclusively by tissue loss and not after simple wounding. Therefore, in agreement with previous studies demonstrating distinct roles of the two mitotic peaks (at 6 h and 48 h) depending on the degree of injury [19] and the requirement of *Smed-follistatin* specifically for the “missing-tissue response” [64], our findings distinguish between the response to a small incision and that of an amputation. According to the role of JNK as a stress-activated protein to coordinate a complex response, JNK is exclusively required in large scale tissue recovery events, whereas mild tissue damage can be repaired in a JNK-independent manner.

JNK-dependent apoptosis is required for remodeling and the maintenance of body proportion

The ability to generate a proportioned organism after amputation depends on a carefully maintained balance between stem cell proliferation and differentiation to create new tissues, and cell death to eliminate unnecessary cells and re-shape organs [48]. Planarians respond to amputation by increasing neoblast proliferation and differentiation in regions close to the wound in order to regenerate the missing structures. In parallel, pre-existing regions decrease in size in order to adjust their proportions relative to the new whole-body size, mainly by augmenting cell death while maintaining baseline proliferative rates [17,41,65-67] (Figure 8). Similarly, proliferative rates are maintained during homeostatic changes in body size, whereas the control of cell death is the decisive shift. Our findings demonstrate that JNK is essential to trigger apoptotic cell death in planarians. In agreement with the essential role of apoptosis during planarian remodeling [17,41], animals in which JNK-mediated apoptotic cell death was prevented were unable to relocate pre-existing structures and hence to restore body proportion not only after amputation, but also during starvation-induced degrowth (Figure 8). The pro-apoptotic role of JNK in vertebrates, in which JNK acts as a tumor suppressor gene, has been extensively documented [20]. Our results show that after *JNK* RNAi, the positive balance

between cell death and cell proliferation required to decrease body size is reversed (Figure 8). However, we observed no overgrowths in *JNK(RNAi)* animals. A tempting explanation is that the lack of apoptosis results in an ectopic accumulation of certain cell types, as reflected by the increased density of differentiated cells, such as neural and epithelial cells, observed in degrowing *JNK(RNAi)* planarians.

JNK RNAi during diet-induced changes in body size resulted in impaired rescaling only in planarians that were starved, and hence decreased in size. By contrast, animals that were growing while actively feeding exhibited normal body proportions. While downregulation of apoptosis is essential during active feeding so that planarians can grow, high rates of apoptosis are required during starvation. Our results show that JNK-dependent apoptosis is only required during degrowth, while proliferation is maintained during both conditions. These findings demonstrate that defective rescaling and the accumulation of neoblast progeny and differentiated cells in degrowing *JNK(RNAi)* planarians are a consequence of an inhibited apoptotic response. Remarkably, the number of *cintillo+* cells was maintained during starvation in *JNK(RNAi)* animals, indicating that differentiated cells accumulated due to the lack of cell death, and not as a result of ectopic cell differentiation. Finally, our data indicate that apoptotic cell death is required during homeostatic tissue turnover not only to re-scale but also to re-shape organs, as the ectopic accumulation of differentiated cells in *JNK(RNAi)* animals might be associated with ultrastructural changes in the brain.

That the maintenance of mitotic rates during gradual degrowth is independent of JNK supports the role of JNK as a molecular modulator of cell cycle progression specifically during regeneration, a process that requires the coordination of massive neoblast proliferation and differentiation. Similar to planarians, *Drosophila* imaginal discs undergo dynamic regulation of cell death and proliferation, as growth depletion in one compartment of the *Drosophila* wing disc results in increased apoptotic cell death and decreased proliferation in the adjacent compartment, reducing its size in order to maintain a properly proportioned organ [68]. It has been proposed that the combined autonomous and non-autonomous activity of p53 is fundamental in this process, as it exerts distinct effects in damaged and distant tissues. The generation of differential outputs from a single stress response element, based on proximity to the injury, may be a general mechanism to coordinate basic cellular responses in order to maintain proportionality during regeneration.

MATERIALS AND METHODS

Planarian culture

Planarians used in these experiments were from a clonal strain of the *S. Mediterranea* BCN-10 biotype and were maintained as previously described [69]. Planarians were starved for 1 week and were 4 to 6 mm in length when used for experiments.

Isolation of *Smed-JNK*

Smed-JNK fragments were identified from the *S. mediterranea* genomic contigs (Washington University, St. Louis, USA). The following pairs of specific primers were used to clone a fragment of *Smed-JNK*:

5'-:GCTATTGGTTCCGGTGACAAG-3';

5'-:CGACCGAGATTGTTGAAGTGG-3'

The corresponding full-length transcripts were amplified by rapid amplification of cDNA ends (RACE) using the Invitrogen GeneRacer Kit (Invitrogen).

RNAi analysis

Double-stranded RNAs (dsRNAs) were synthesized by *in vitro* transcription (Roche) as previously described [44], and dsRNA microinjections performed as previously described [44], following the standard protocol of a 3x32-nl injection of dsRNA for three consecutive days before amputation (one round of injections). To obtain reliable gene interference, we performed three consecutive rounds of RNAi injections; an anterior amputation was performed after the first and third rounds. Control animals were injected with water or a double-stranded (ds) RNA of the green fluorescent protein (GFP) sequence. The same RNAi experimental design was used in all experiments but different types of injuries were induced (incision, notching or amputation), as indicated in the text. For degrowth and growth experiments, animals were starved and injected with RNAi for three weeks. Subsequently, degrowing animals were maintained under starvation conditions while growing animals were fed every second day. The following pairs of specific primers were used to generate the dsRNA target gene:

dsRNA against *Smed-JNK*,

5'-:GCTATTGGTTCCGGTGCACAAG-3';

5'-: GGACGTCCTTTCGTGATCTAAGTCC-3'

Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from a pool of five trunk fragments, six wound region fragments and six post-pharyngeal (pre-existing) region fragments of RNAi-treated planarians using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA samples were treated with DNase I (Roche) and cDNA was synthesized using a First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen). Real-time PCR was performed using SYBR Green (Applied Biosystems) in an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Three samples were run in parallel for each condition. Data were normalized to the expression of the internal control (UDP). Similar results were obtained using elongation factor 2 (EF-2) as an alternative internal control. The following sets of specific primers were used:

Smed-JNK mRNA,

5'-TCAACGAATCTCGGTTCG-3', 5'-AGTGAGCTCTCTTTCATCAACC-3';

Smed-h2b mRNA,

5'-GAGAAAGTTGAACGGCCC-3', 5'-AAGATAATACGTACTTCAACGACG-3';

Smed-Agat-1 mRNA,

5'-GCCCAGAAAGACCATGC-3', 5'-GAGACAACCATTGAGAGCTG-3';

NB32.1g mRNA,

5'-CATCGCGCAACTTTTG-3', 5'-GTTTACGGAGAATGCCG-3';

Smed-UDP mRNA was detected using primers previously described in [70]:

Smed-EF-2,

5'-CGAGCCGGAAGATTTGTAT-3', 5'-TGGAGTCACTTGAATATCTCC-3'.

Irradiation

Intact planarians were X-irradiated at 96 Gy and fixed for *in situ* hybridization 1 day after irradiation.

Whole-mount *in situ* hybridization (ISH) and fluorescent whole-mount *in situ* hybridization (FISH)

RNA probes were *in vitro* synthesized using Sp6 or T7 polymerase (Roche) and DIG-, FITC- (Roche) or DNP- (Perkin Elmer) modified ribonucleotides. RNA probes were purified by ethanol precipitation and the addition of 7.5 M ammonium acetate. For ISH, animals were fixed and then processed using an In situ Pro hybridization robot (Abimed/Intavis), as previously described [71]. Hybridizations were carried out for 16 h at 56 C. Samples were observed using a Leica MZ16F microscope and images were captured with a Leica DFC300FX camera. For FISH, animals were fixed and processed as previously described [72]. Confocal laser scanning microscopy was performed using a Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg) adapted for an inverted microscope (Leitz DMIRB). Images were processed using Fiji software [73]. The numbers of *NB32.1g+* and *Agat-1+* cells were quantified using the "Find maxima" plug-in in Fiji, maintaining a fixed noise tolerance of 100 and correcting by hand. *opsin+*, *gad+*, *tbh+*, *tph+* and *cintillo+* cells were quantified by hand using the "multi-point selection" tool in Fiji. *egrl-1* and *runt-1* images were captured with identical laser settings: 18 stacks were used to build the z-projection and the intensity of equivalent areas was quantified

using the “Measure” plug-in in Fiji.

Immunostaining

Immunostaining was carried out as described previously [44]. The following antibodies were used: anti-synapsin (anti-SYNORF1, 1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank), anti-Smed- β -catenin2 (1:1000; Chai et al., 2010) and anti-phospho-histone H3 (Ser10) (D2C8) (pH3) (1:500; Cell Signaling Technology). Images were scanned, processed and quantified as described for FISH images. To avoid technical variance and obtain a reliable quantification of pH3+ cells, at least two independent experiments of RNAi and pH3 immunostaining were carried out for each of the experimental designs (anterior amputation, incision, degrowth and growth), except for in the notching and posterior amputation experiments.

Whole-mount TUNEL

Animals were fixed and stained for TUNEL as previously described [17] using the ApopTag Red *In Situ* Apoptosis Detection Kit (CHEMICON, S7165), with some modifications to increase permeability: between the fixation step with 4% formaldehyde in PBST, samples were incubated with ProteinaseK (20 μ g/mL) in PBSTx (PBS with 0.3% Triton X-100) for 10 minutes at 37°C in a water bath while agitating by hand, and an additional reduction step was added after fixation [72]. Finally, samples were incubated overnight in terminal transferase enzyme at 37°C, and again overnight at 4°C with anti-dioxigenin-rhodamine. Images were scanned, processed and quantified as described for FISH images. To avoid technical variance and obtain a reliable quantification of TUNEL+ cells, at least two independent experiments of TUNEL staining were carried out for each of the experimental designs (anterior amputation, notching, incision, degrowth and growth).

TUNEL in paraffin-embedded tissue

Animals were sacrificed in 10% n-acetyl cysteine in PBS, docked for 8 minutes at RT to remove mucous and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 4 hours at 4°C. Paraffin embedding, sectioning and deparaffinization were carried out as previously described [74]. Staining was performed according to the manufacturer’s recommendations with the following modifications: sections were treated with ProteinaseK for 30 minutes and with TdT for 2 hours and were incubated in the anti-dioxigenin conjugate overnight at 4°C in a humidified chamber.

Counting of mitotic cells

Fixation and partial maceration of the animals, staining of nuclei and calculation of the mitotic index were carried out following a modified Gomori technique as previously described [18].

Flow cytometry

The dissociation of planarians, cellular labeling, and isolation of cells by FACS were performed as described previously [37].

CldU labeling

After RNAi injection protocol, control and JNK(RNAi) animals were injected a single time 10 hours prior amputation as previously described in [75]. 6 hours after amputation animals were fixed as previously described in [75] for FISH with Smedwi-1 DIG probe. After FISH staining, animals were processed for anti-pH3 immunostaining as described above. Animals were then processed for CldU staining as previously described in [75]. Blocking and incubation with the CldU antibody were performed in 1%BSA/10%NGS in PBSTx.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all members of the E. Saló, F. Cebrià and K. Bartscherer groups for company and discussions; L. Gentile, C. Ortmeier and H. Schmitz (MPI Münster) for assistance in gathering data that were not ultimately included in this paper; J. M. Martín-Durán, M. Milán, F. Cebrià, F. Serras, and J. Baguña for suggestions and discussion of the manuscript; N. Agell and N. Salvador for helpful discussion regarding cell cycle regulation; H. Orii and Prof. K. Watanabe for providing anti-arrestin; and O. Howard and B. V. Schardin for English-language editing. Monoclonal anti-SYNORF1 antibodies were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Human Development and maintained by the Department of Biological Sciences, University of Iowa, Iowa City, IA, USA.

REFERENCES

1. Newmark PA, Sánchez Alvarado A (2002) Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat Rev Genet* 3: 210-219.
2. Reddien PW, Sánchez Alvarado A (2004) Fundamentals of planarian regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 725-757.
3. Saló E (2006) The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *Bioessays* 28: 546-559.
4. Handberg-Thorsager M, Fernandez E, Saló E (2008) Stem cells and regeneration in planarians. *Front Biosci* 13: 6374-6394.
5. Tanaka EM, Reddien PW (2011) The cellular basis for animal regeneration. *Dev Cell* 21: 172-185.
6. Wagner DE, Wang IE, Reddien PW (2011) Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* 332: 811-816.
7. Wagner DE, Ho JJ, Reddien PW (2012) Genetic regulators of a pluripotent adult stem cell system in planarians identified by RNAi and clonal analysis. *Cell Stem Cell* 10: 299-311.
8. Romero R, Baguña J (1988) Quantitative cellular analysis of life-cycle strategies of iteroparous and semelparous triclads. *Fortschr Zool* 36: 283-289.
9. Aboobaker AA (2011) Planarian stem cells: a simple paradigm for regeneration. *Trends Cell Biol* 21: 304-311.
10. Sánchez Alvarado A (2012) Q&A: what is regeneration, and why look to planarians for answers?. *BMC Biol* 10: 88.
11. Baguña J (2012) The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. *Int J Dev Biol* 56: 19-37.
12. Rink JC (2013) Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev Genes Evol* 223: 67-84.
13. Chandebois R (1980) The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian regeneration. II. Distalization. *Develop Growth & Differ* 22: 693-704.
14. Baguña J, Saló E, Collet J, Auladell MC, Ribas M (1988) Cellular, molecular and genetic approaches to regeneration and pattern formation in planarians. *Progress in Zoology* 36: 65-78.
15. Sandmann T, Vogg MC, Owlarn S, Boutros M, Bartscherer K (2011) The head-regeneration transcriptome of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Genome Biol* 12: R76.
16. Wenemoser D, Lapan SW, Wilkinson AW, Bell GW, Reddien PW (2012) A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes Dev* 26: 988-1002.
17. Pellettieri J, Fitzgerald P, Watanabe S, Mancuso J, Green DR, et al. (2010) Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev Biol* 338: 76-85.
18. Saló E, Baguña J (1984) Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *J Embryol Exp Morphol* 83: 63-80.
19. Wenemoser D, Reddien PW (2010) Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev Biol* 344: 979-991.
20. Chen F (2012) JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells. *Cancer Res* 72: 379-386.
21. Zhang JY, Selim MA (2012) The role of the c-Jun N-terminal Kinase signaling pathway in skin cancer. *Am J Cancer Res* 2: 691-698.
22. Gutierrez GJ, Tsuji T, Cross JV, Davis RJ, Templeton DJ, et al. (2010) JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G(2)/M DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* 285: 14217-14228.
23. Gutierrez GJ, Tsuji T, Chen M, Jiang W, Ronai ZA (2010) Interplay between Cdh1 and JNK activity during the cell cycle. *Nat Cell Biol* 12: 686-695.
24. Fuchs Y, Steller H (2011) Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147: 742-758.
25. Heber-Katz E, Zhang Y, Bedelbaeva K, Song F, Chen X, Stocum DL (2013) Cell cycle regulation and regeneration. *Curr Top Microbiol Immunol* 367: 253-276.
26. Iglesias M, Almuedo-Castillo M, Aboobaker AA, Saló, E (2011) Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by the Wnt/ β -catenin pathway. *Dev Biol* 358: 68-78.
27. Oviedo NJ, Newmark PA, Sánchez Alvarado A (2003) Allometric scaling and proportion regulation in the

freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev Dyn* 226: 326-333.

28. Lapan SW, Reddien PW (2012) Transcriptome analysis of the planarian eye identifies ovo as a specific regulator of eye regeneration. *Cell Rep* 2: 294-307
29. Sakai F, Agata K, Orii H, Watanabe K (2000) Organization and regeneration ability of spontaneous supernumerary eyes in planarians -eye regeneration field and pathway selection by optic nerves-. *Zoolog Sci* 17: 375-381.
30. Petersen CP, Reddien PW (2011) Polarized notum activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration. *Science* 332: 852-855.
31. Petersen CP, Reddien PW (2009) A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17061-17066.
32. Gurley KA, Elliott SA, Simakov O, Schmidt HA, Holstein TW, et al. (2010) Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Dev Biol* 347: 24-39.
33. Baguñà J, Saló E, Auladell C (1989) Regeneration and pattern formation in planarians III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells, *Development* 107.
34. Solana J, Kao D, Mihaylova Y, Jaber-Hijazi F, Malla S, et al. (2012) Defining the molecular profile of planarian pluripotent stem cells using a combinatorial RNAseq, RNA interference and irradiation approach. *Genome Biol* 13: R19.
35. Reddien PW, Oviedo NJ, Jennings JR, Jenkin JC, Sánchez Alvarado A (2005) SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* 310: 1327-1330.
36. Hayashi T, Asami M, Higuchi S, Shibata N, Agata K (2006) Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Dev Growth Differ* 48: 371-380.
37. Moritz S, Stöckle F, Ortmeier C, Schmitz H, Rodríguez-Esteban G, et al. (2012) Heterogeneity of planarian stem cells in the S/G2/M phase. *Int J Dev Biol* 56: 117-25.
38. Baguñà J (1976) Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n. sp. I. Mitotic studies during growth, feeding and starvation. *J Exp Zool* 195: 53-64.
39. Baguñà J (1976) Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n. sp. II. Mitotic studies during regeneration and a possible mechanism of blastema formation. *J Exp Zool* 195: 65-80.
40. Eisenhoffer GT, Kang H, Sánchez Alvarado A (2008) Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell* 3: 327-339.
41. Beane WS, Morokuma J, Lemire JM, Levin M (2013) Bioelectric signaling regulates head and organ size during planarian regeneration. *Development* 140: 313-22.
42. González-Estévez C, Felix DA, Rodríguez-Esteban G, Aboobaker AA (2012) Decreased neoblast progeny and increased cell death during starvation-induced planarian degrowth. *Int J Dev Biol* 56: 83-91.
43. Abeloos M (1928) Sur la dysharmonie de croissance chez *Planaria gonocephala* Dugès et sa réversibilité au cours de jeûne. *C R Soc De Biol* 98: 917.
44. Sánchez Alvarado A, Newmark PA (1999) Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5049-5054.
45. Nishimura K, Kitamura Y, Umesono Y, Takeuchi K, Takata K, et al. (2008) Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience* 153: 1103-1114.
46. Fraguas S, Barberán S, Ibarra B, Stöger L, Cebrià F (2012) Regeneration of neuronal cell types in *Schmidtea mediterranea*: an immunohistochemical and expression study. *Int J Dev Biol* 56: 143-153.
47. Fraguas S, Barberán S, Cebrià F (2011) EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Dev Biol* 354: 87-101.
48. Bergmann A, Steller H (2010) Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal* 3: re8.
49. Newmark PA, Sánchez Alvarado A (2000) Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol* 220:142-153.
50. Pérez-Castro AJ, Freire R (2012) Rad9B responds to nucleolar stress through ATR and JNK signalling, and delays the G1-S transition. *J Cell Sci* 125: 1152-1164.
51. Tasaki J, Shibata N, Sakurai T, Agata K, Umesono Y (2011) Role of c-Jun N-terminal kinase activation in blastema formation during planarian regeneration. *Dev Growth Differ* 53: 389-400.
52. Kim JA, Lee J, Margolis RL, Fotedar R (2010) SP600125 suppresses Cdk1 and induces endoreplication

- directly from G2 phase, independent of JNK inhibition. *Oncogene* 29:1702-1716.
53. Tanemura S, Momose H, Shimizu N, Kitagawa D, Seo J, et al. (2009) Blockage by SP600125 of Fcepsilon receptor-induced degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway. *J Biochem* 145: 345-54.
54. Bosch M, Serras F, Martín-Blanco E, Baguña J (2005) JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* 280: 73-86.
55. Bergantiños C, Corominas M, Serras F (2010) Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. *Development* 137: 1169-79.
56. Currie KW, Pearson BJ (2013) Transcription factors *lhx1/5-1* and *pitx* are required for the maintenance and regeneration of serotonergic neurons in planarians. *Development* 140: 3577-3588
57. Ali F, Hindley C, McDowell G, Deibler R, Jones A, et al. (2011) Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* 138: 4267-4277.
58. Zanet J, Freije A, Ruiz M, Coulon V, Sanz JR, et al. (2010) A mitosis block links active cell cycle with human epidermal differentiation and results in endoreplication. *PLoS One* 5: e15701.
59. Reddien PW (2013) Specialized progenitors and regeneration. *Development* 140: 951-957.
60. Martín FA, Pérez-Garijo A, Morata G (2009) Apoptosis in *Drosophila*: compensatory proliferation and undead cells. *Int J Dev Biol* 53: 1341-1347.
61. Chera S, Ghila L, Dobretz K, Wenger Y, Bauer C, et al. (2009) Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. *Dev Cell* 17: 279-289.
62. Mollereau B, Perez-Garijo A, Bergmann A, Miura M, Gerlitz O, Ryoo HD, Steller H, Morata G (2013) Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification. *Cell Death Differ* 20: 181.
63. Ryoo HD, Gorenc T, Steller H (2004) Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* 7: 491-501.
64. Gaviño MA, Wenemoser D, Wang IE, Reddien PW (2013) Tissue absence initiates regeneration through Follistatin-mediated inhibition of Activin signaling. *Elife* 10;2:e00247
65. Pellettieri J, Sánchez Alvarado A (2007) Cell turnover and adult tissue homeostasis: from humans to planarians. *Annu Rev Genet* 41: 83-105.
66. González-Estévez C, Saló E (2010) Autophagy and apoptosis in planarians. *Apoptosis* 15: 279-292.
67. Bender CE, Fitzgerald P, Tait SW, Llambi F, McStay GP, et al. (2012) Mitochondrial pathway of apoptosis is ancestral in metazoans. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 4904-4909.
68. Mesquita D, Dekanty A, Milán M (2010) A *dp53*-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in *Drosophila*. *PLoS Biol* 8: e1000566.
69. Fernández-Taboada E, Moritz S, Zeuschner D, Stehling M, Schöler HR, et al. (2010) *Smed-SmB*, a member of the *LSm* protein superfamily, is essential for chromatoid body organization and planarian stem cell proliferation. *Development* 137: 1055-1065.
70. Molina MD, Neto A, Maeso I, Gómez-Skarmeta JL, Saló E, et al. (2011) *Noggin* and *noggin*-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians. *Curr Biol* 21: 300-305.
71. Umesono Y, Watanabe K, Agata K (1997) A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev Growth Differ* 39: 723-727.
72. Pearson BJ, Eisenhoffer GT, Gurley KA, Rink JC, Miller DE, et al. (2009) Formaldehyde-based whole-mount in situ hybridization method for planarians. *Dev Dyn* 238: 443-450
73. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676-682.
74. Cardona A, Fernández-Rodríguez J, Solana J, Romero R (2005) An in situ hybridization protocol for planarian embryos: monitoring myosin heavy chain gene expression. *Dev Genes Evol* 215: 482-488.
75. März M, Seebeck F, Bartscherer K (2013) A *Pitx* transcription factor controls the establishment and maintenance of the serotonergic lineage in planarians. *Development* 140: 4499-4509.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

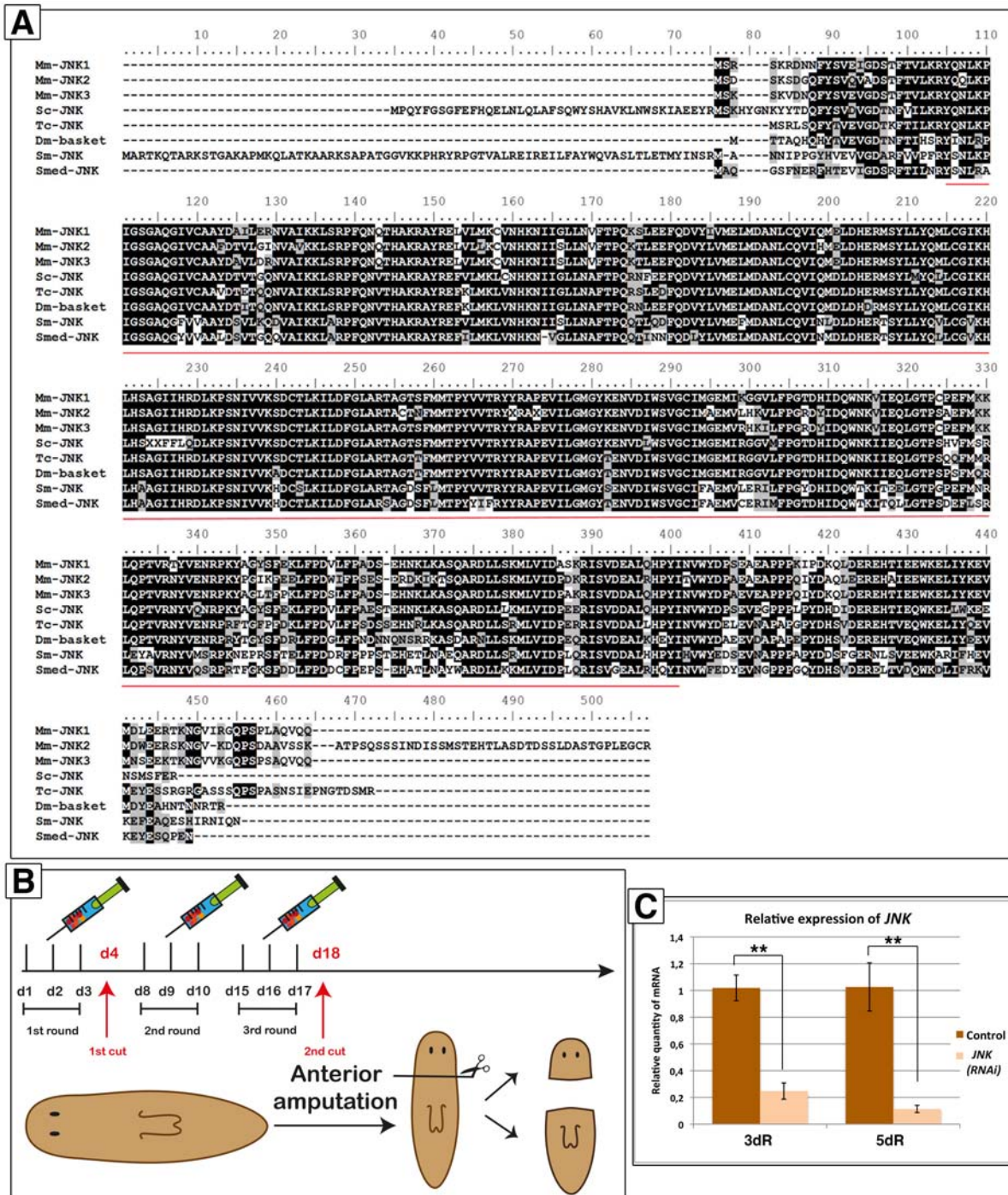


Figure S1. (A) Alignment of Smed-JNK protein

JNK protein sequences of species from the main phylogenetic groups were used. The alignment was processed using MAFFT version 6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>). (The submission ID in NCBI of *Smed-JNK* corresponding to the complete mRNA coding sequence is 1620068). Abbreviations: Dm, *Drosophila melanogaster*; Mm, *Mus musculus*; Sc, *Saccoglossus kowalevskii*; Sm, *Schistosoma mansoni*; Smed, *Schmidtea mediterranea*; Tc, *Tribolium castaneum*. **(B)** Cartoon illustrating the experimental design of *JNK* interference during anterior regeneration. Animals were starved and injected with the RNAi for three weeks to achieve reliable gene interference. Two anterior amputations were performed, one after the first round of RNAi injections and another after the final round of injections. Animals were subsequently allowed

to regenerate and then fixed at different time points. **(C)** Graph showing the relative expression of *JNK* in regenerating animals as determined by qRT-PCR. *JNK* expression levels in *JNK(RNAi)* animals were significantly reduced as compared with controls, validating the gene interference approach. Values represent the means of three biological replicates. Error bars represent standard error of the mean. Data were analyzed by Student's t-test. ** $P < 0.01$. dR, days of regeneration.

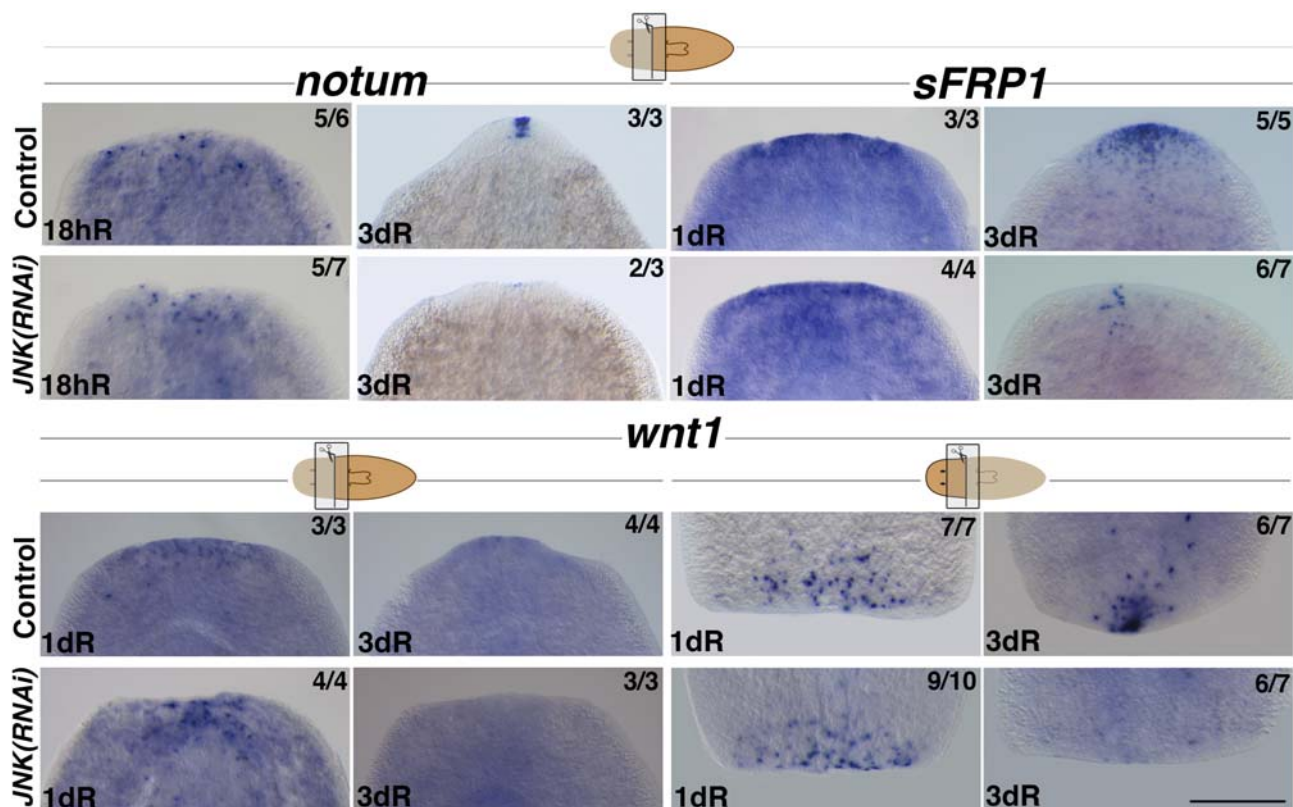


Figure S2. Initial identity specification during regeneration is independent of JNK

WISH analysis of the expression of the polarity genes *notum*, *sFRP1* and *wnt1* in the wound region in regenerating trunks and heads after anterior amputation. (Top, anterior). Scale bars: 200 μm . hR, hours of regeneration, dR, days of regeneration.

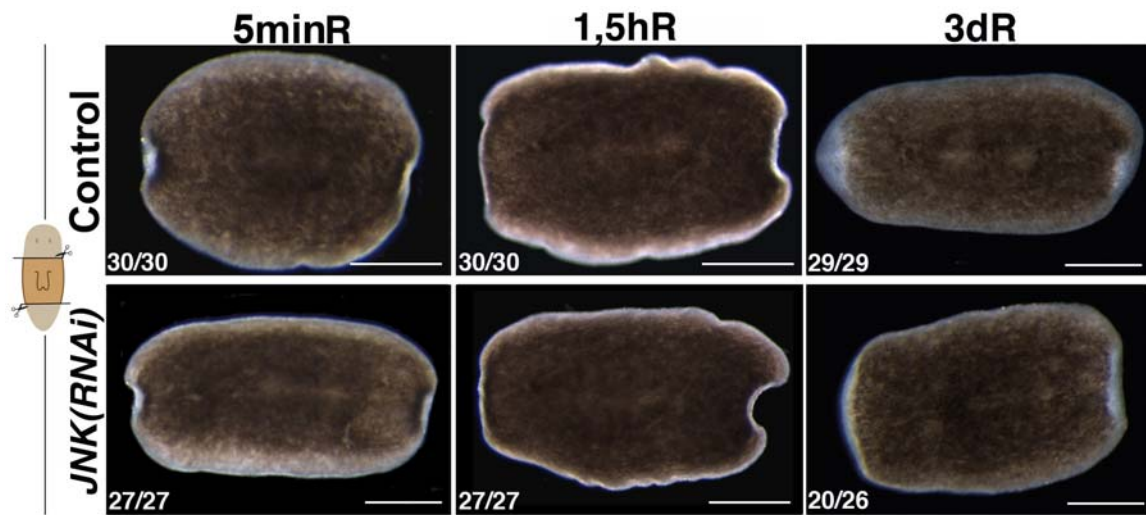


Figure S3. Wound closure in planarians is independent of JNK activity

Stereomicroscopic view of live animals showing normal wound closure even after *JNK(RNA)*. The wound is closed by muscle contraction 5 minutes after amputation. However, after 3 days of regeneration, the shape and size of the blastema in *JNK(RNAi)* animals differed to that of controls. All images correspond to regenerating trunk fragments after a bipolar amputation. (Left, anterior). Scale bar: 300 μ m. minR, minutes of regeneration; hR, hours of regeneration; dR, days of regeneration.

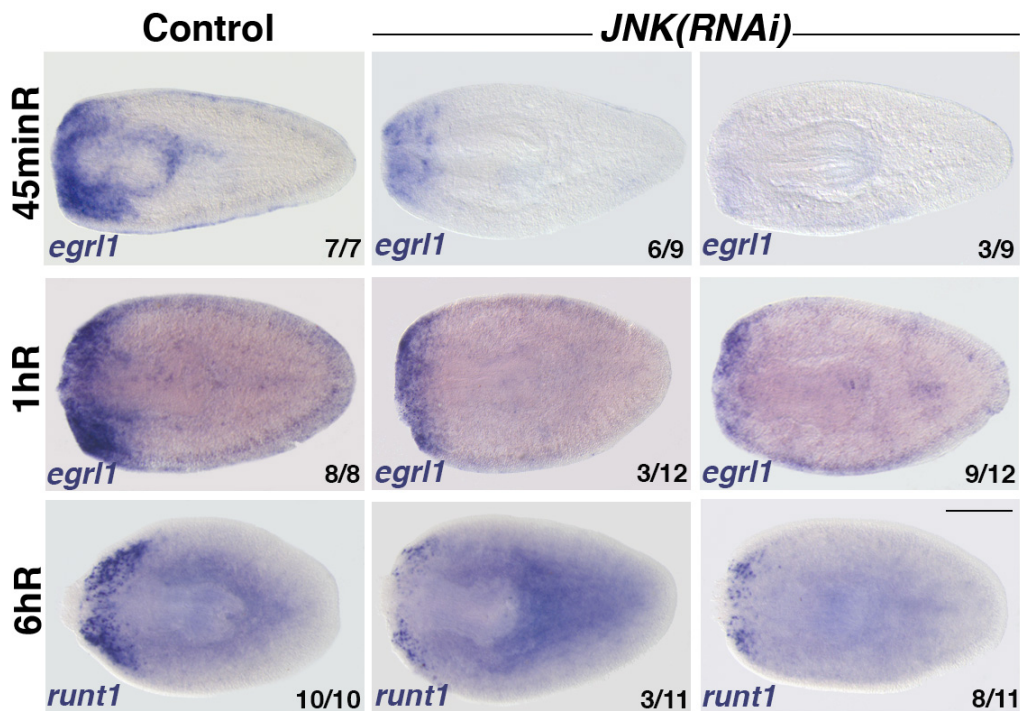


Figure S4. Expression of early wound-induced genes is reduced in *JNK(RNAi)* animals

WISH analysis of *egr1* and *runt1* expression in trunk fragments after anterior amputation. Representative animals of milder *JNK(RNAi)* phenotypes have been placed before than stronger phenotypes. Scoring of the different phenotypes is shown. (Left, anterior). Scale bars: 200 μ m. minR, minutes of regeneration; hR, hours of regeneration.

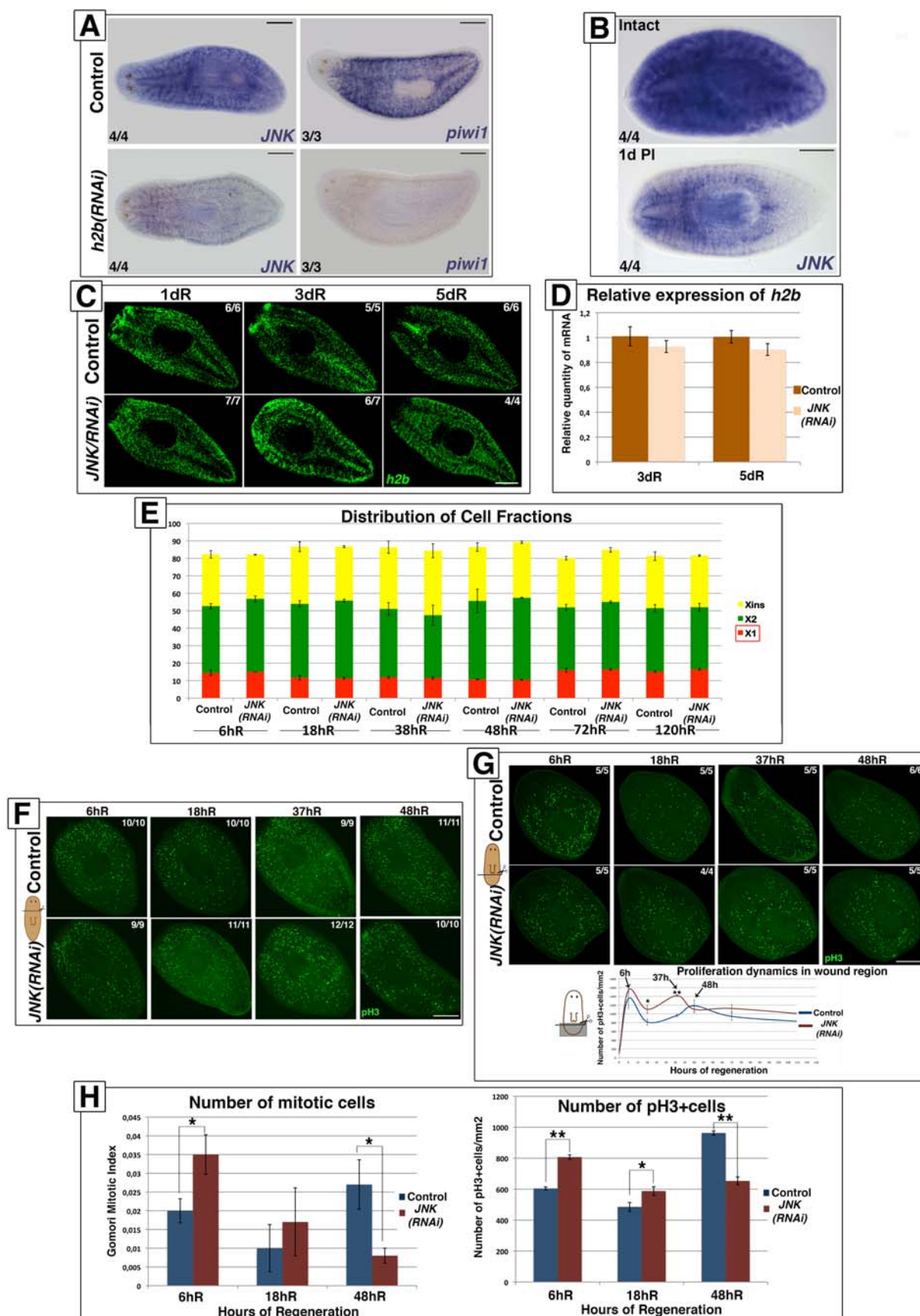


Figure S5. JNK controls cell cycle dynamics in neoblasts but does not maintain cell viability

(A) WISH analysis of the expression of *JNK* and *piwi1* in control animals and after ablation of neoblasts by *h2b* RNAi. (Left, anterior). (B) Expression of *JNK* in untreated animals and in those fixed 1 day after a 96-Gy irradiation. (Left, anterior). (C) Anti-ph3 immunostaining showing the dynamics of the mitotic response in regenerating trunk fragments after anterior amputation. (Top left, anterior). (D) Anti-ph3 immunostaining

showing the dynamics of the mitotic response in regenerating trunk fragments after posterior amputation and a graph showing the number of mitotic (pH3+) cells in the wound region of regenerating trunk fragments after posterior amputation. At least four biological replicates were used per time point. (Top left, anterior). **(E)** Quantification of the number of mitotic cells using a modified Gomori technique and quantification of the number of pH3+ cells in the wound region of regenerating trunk fragments at the same time points after anterior amputation. Gomori Mitotic Index represents the number of mitotic figures observed in 100 cells. **(F)** Whole-mount fluorescent *in situ* hybridization (FISH) showing the expression of *h2b*, a neoblast-related gene, in regenerating trunk fragments after anterior amputation. (Top left, anterior). **(G)** Graph showing the relative expression of *h2b*, as determined by qRT-PCR, in regenerating trunk fragments. Values represent the means of three biological replicates. **(H)** Fluorescence-associated cell sorting (FACS) analysis showing the proportion of distinct cell populations at different time points during regeneration. Values represent the means of at least two biological replicates. The pH3 and *h2b* images correspond to confocal z-projections. Error bars represent the standard error of the mean. Data were analyzed by Student's t-test. *P<0.05; **P<0.01; differences are considered significant at P<0.05. Scale bars: 300 μ m. hR, hours of regeneration; dR, days of regeneration; dPI, days post-irradiation.

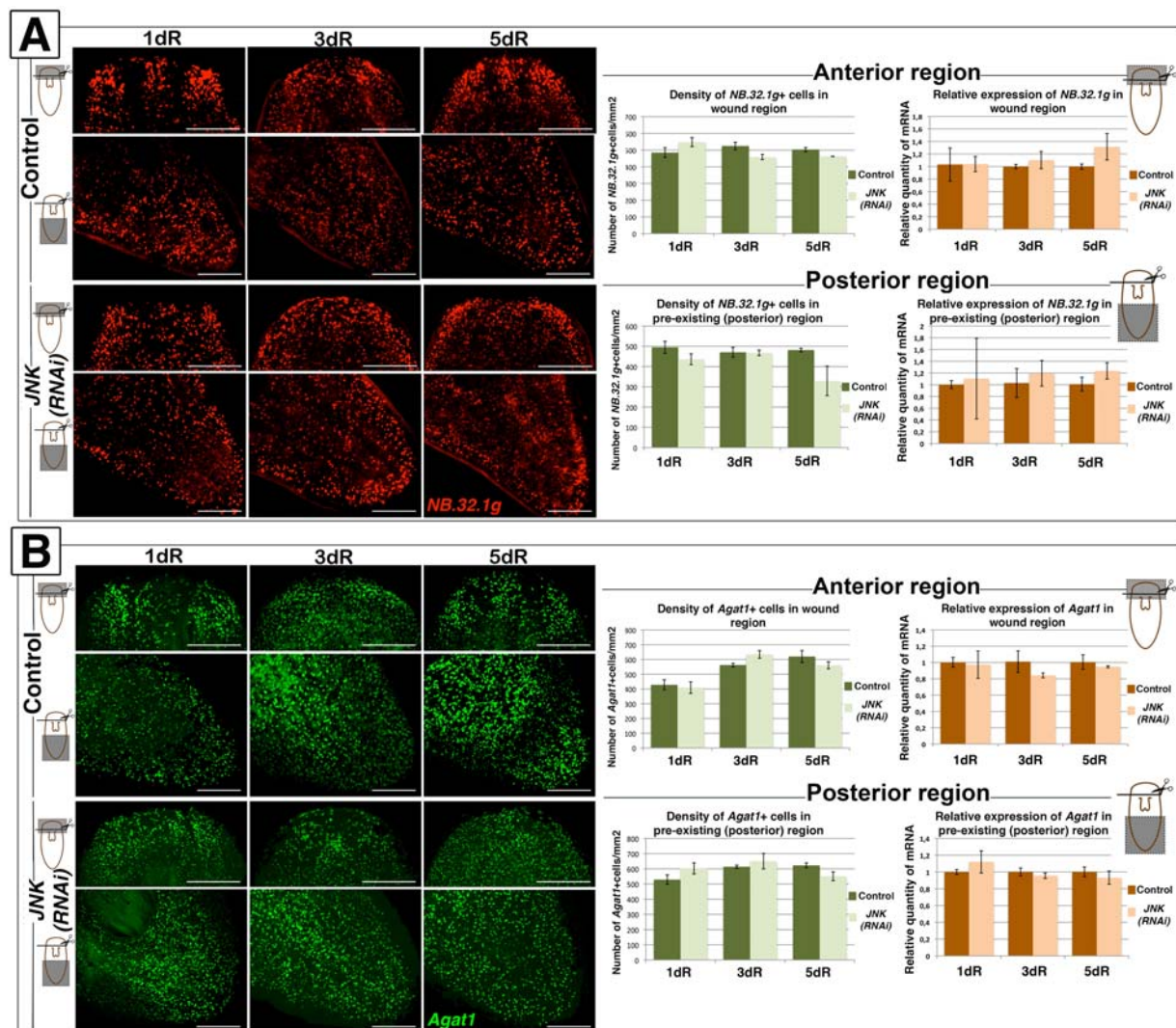


Figure S6. The numbers of early and late neoblast progeny cells are maintained after JNK RNAi in both regenerating and pre-existing regions
(A) FISH showing the expression of *NB.32.1g*, a marker of early post-mitotic descendants of neoblasts, in regenerating trunk fragments after anterior amputation. Images of the wound and the post-pharyngeal (pre-

existing) region are shown. The green histogram depicts the quantification of *NB.32.1g*+ cells after FISH. At least four biological replicates were used per time point. The orange histogram depicts the relative expression of *NB.32.1g* as determined by qRT-PCR. Values represent the means of three biological replicates. Analysis from wound and post-pharyngeal (pre-existing) regions are shown. (Top/top left, anterior). **(B)** FISH showing the expression of *Agat-1*, a marker of late post-mitotic descendants of neoblasts, in regenerating trunk fragments after anterior amputation. Images of the wound and post-pharyngeal (pre-existing) region are shown. The green histogram depicts the quantification of *Agat-1*+ cells after FISH. At least five biological replicates were used per time point. The orange histogram depicts the relative expression of *Agat-1* as determined by qRT-PCR. Values represent the means of three biological replicates. Analysis from wound and post-pharyngeal (pre-existing) regions are shown. (Top/top left, anterior). All images correspond to confocal z-projections. Error bars represent the standard error of the mean. Data were analyzed by Student's t-test. Differences are considered significant at $P < 0.05$. Scale bars: 200 μm . dR, days of regeneration.

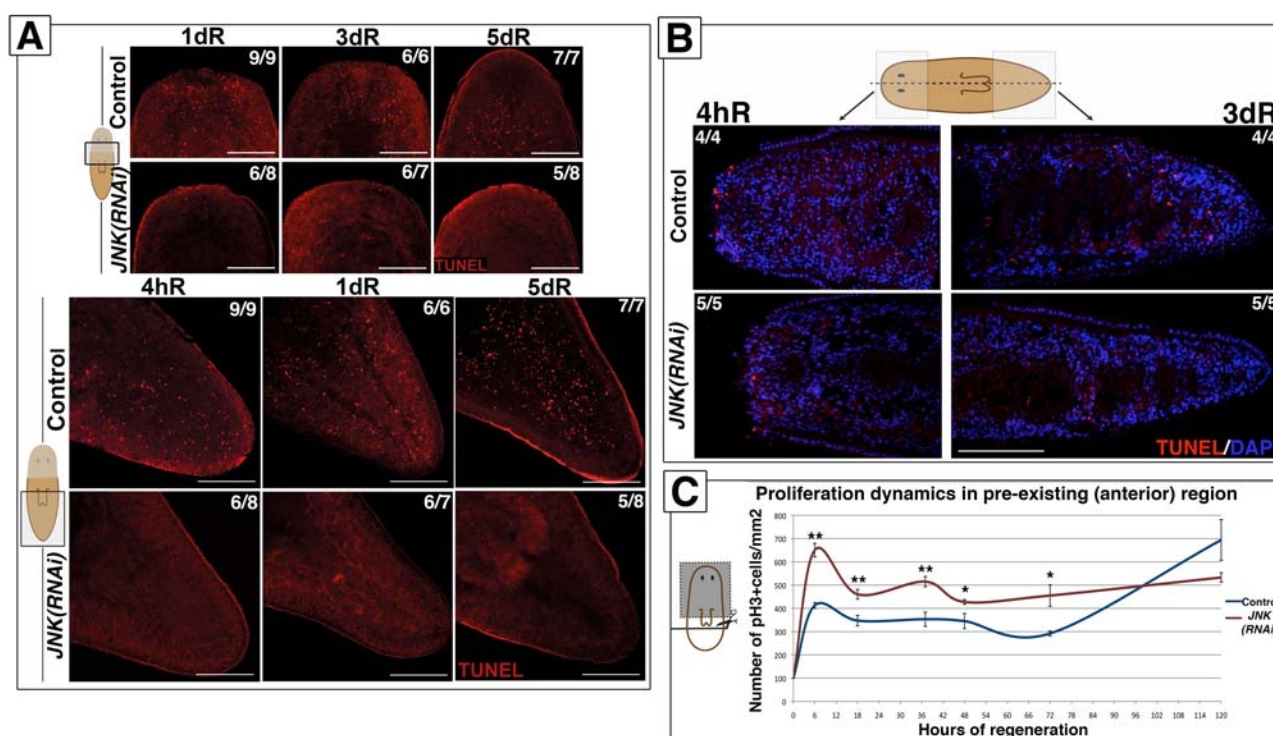


Figure S7. JNK plays a general pro-apoptotic role and coordinates the restoration of body proportion after any kind of amputation

(A) Whole-mount TUNEL staining showing apoptotic cell death in regenerating trunk fragments after anterior amputation. Images of the wound and post-pharyngeal (pre-existing) region are shown. (Top/top left, anterior). **(B)** TUNEL staining in longitudinal tissue sections showing apoptotic cell death in regenerating trunk fragments after anterior amputation. Images of the wound region 4 hours after amputation and of the post-pharyngeal (pre-existing) region 3 days after amputation are shown. (Left, anterior). **(C)** Graph showing the quantity of mitotic cells (pH3+) in anterior (pre-existing) regions of regenerating trunks after posterior amputation. At least four biological replicates were used per time point. All images correspond to confocal z-projections. Error bars represent the standard error of the mean. Data were analyzed by Student's t-test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; Differences are considered significant at $P < 0.05$. Scale bars: 200 μm . dR, days of regeneration.

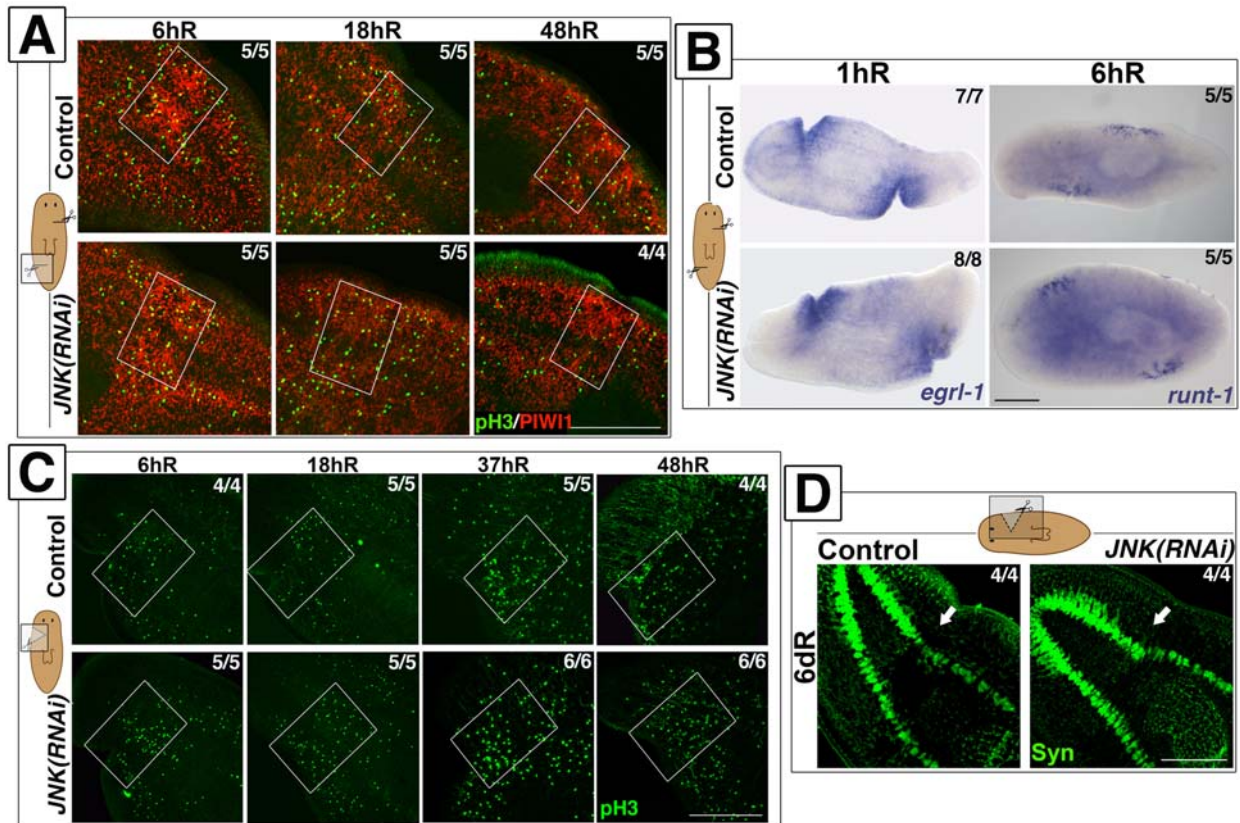


Figure S8. JNK is specifically required for *de novo* formation of new tissue after injury

(A) Anti-pH3 and anti-PIWI-1 immunostaining showing the dynamics of the mitotic response after a simple incision without loss of tissue. (Top left, anterior). **(B)** Analysis WISH of the genes expressed in response to incision. (Left, anterior). **(C)** Anti-pH3 immunostaining showing the dynamics of the mitotic response after a small lateral amputation. (Top left, anterior). **(D)** Anti-synapsin immunostaining demonstrating the regeneration of a previously amputated portion of ventral nerve cord (VNC). (Top left, anterior). The pH3/PIWI1, pH3 and Syn images correspond to confocal z-projections. Scale bars: 200 μ m (A), 300 μ m (B), 200 μ m (C), 200 μ m (D). hR, hours of regeneration; dR, days of regeneration.

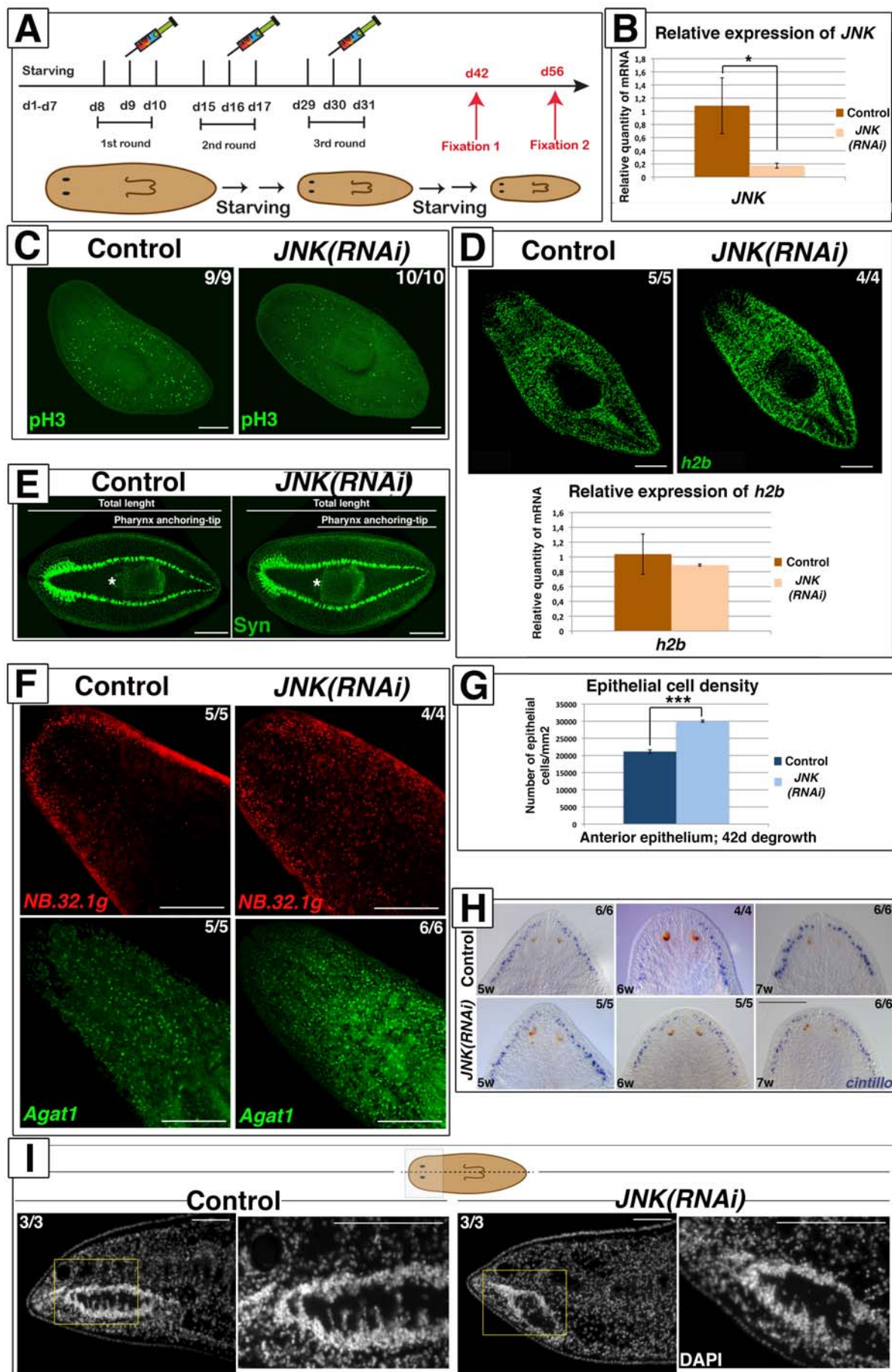


Figure S9. Role of JNK during homeostatic degrowth

(A) Cartoon illustrating the experimental design of the analysis of JNK function during degrowth. Animals were starved and injected with RNAi for three weeks to achieve reliable gene interference and were

Resultados

subsequently fixed after 42 or 56 days of starvation. **(B)** Graph showing the relative expression of *JNK* as determined by qRT-PCR in degrowing animals. *JNK* expression levels in *JNK (RNAi)* animals were significantly reduced, validating the gene interference approach. Values represent the means of three biological replicates. **(C)** Anti-pH3 immunostaining showing mitotic activity after 42 days of starvation. (Top left, anterior). **(D)** FISH showing the expression of *h2b* in animals starved for 42 days and graph showing the relative expression of *h2b* as determined by qRT-PCR in degrowing animals. Values represent the means of three biological replicates. (Top left, anterior). **(E)** Immunostaining with anti-synapsin to visualize the central nervous system and the pharynx of degrowing animals. The relative length of the posterior region was calculated by measuring the distance from the pharynx-anchoring to the tail tip and dividing this by the whole-body length. The white asterisk indicates the anchoring of the pharynx. (Left, anterior). **(F)** FISH showing the expression of *NB.32.1g* and *Agat-1*, markers of post-mitotic descendants of neoblasts, in degrowing animals. (Top left, anterior). **(G)** Graph illustrating the quantification of the number of epithelial cells/mm² in the anterior regions of animals starved for 42 days. Eight biological replicates were used. (Top left, anterior). **(H)** WISH analysis of the anterior chemoreceptors (*cintillo*+) during starvation. (Top, anterior). **(I)** DAPI-stained tissue sections showing the brain of animals starved for 42 days. Corresponding images at increased magnification are shown aside. (Left, anterior). All images except for *cintillo* correspond to confocal z-projections. Error bars represent standard error of the mean. Data were analyzed by Student's t-test. *P<0.05; ***P<0.001; Differences are considered significant at P<0.05. Scale bars: 200 μm (C-E), 300 μm (F), 200 μm (G), 300 μm (I), 100 μm (J). d, days of starvation; w, weeks of starvation.

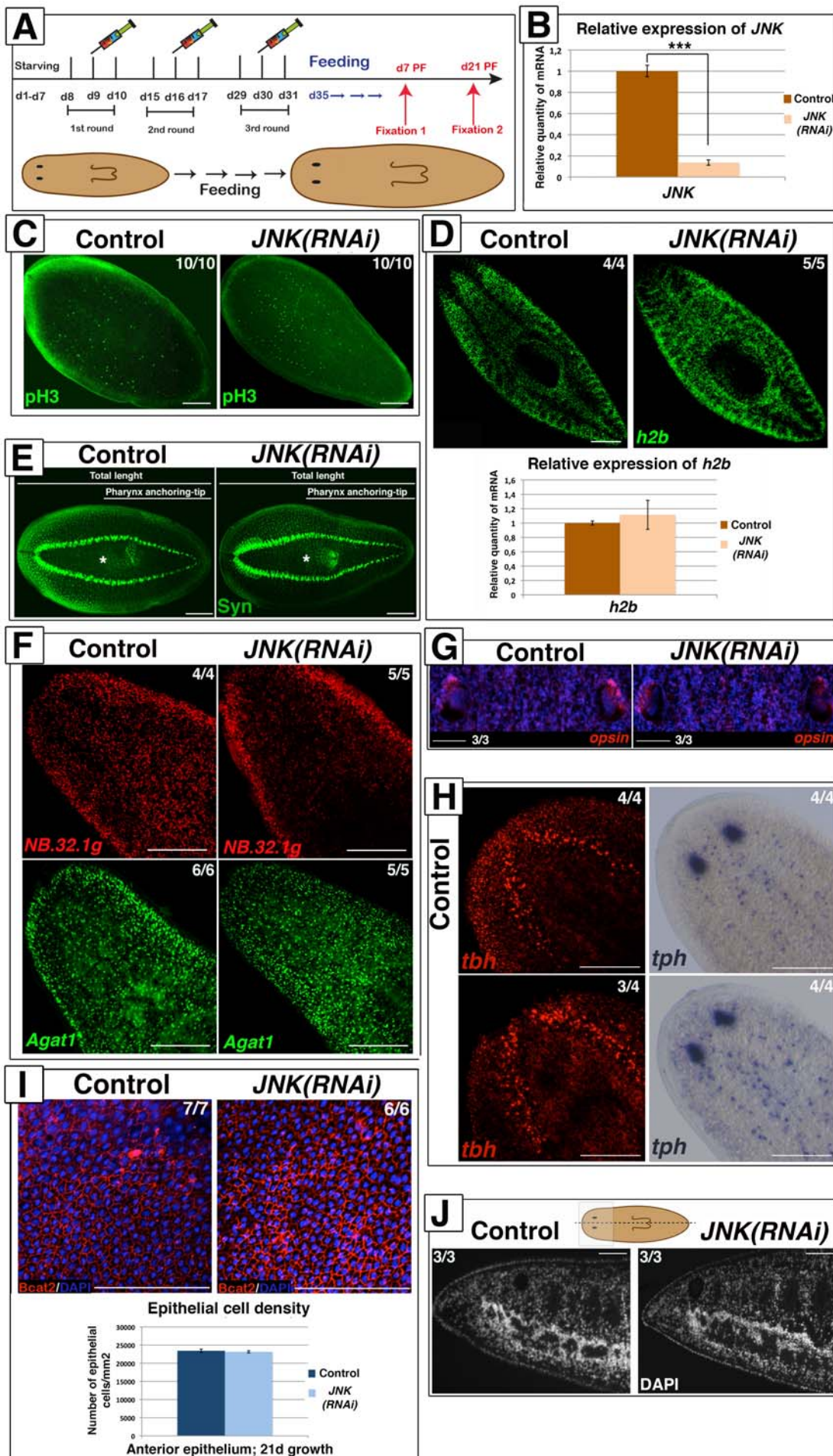


Figure S10. Role of JNK in homeostatic growth

(A) Cartoon illustrating the experimental design of the analysis of JNK function during growth. Animals were starved and injected with the RNAi for three weeks to achieve reliable gene interference. They were subsequently fed once every two days and were then fixed 7 or 21 days after the first feed. **(B)** Graph showing the relative expression of *JNK* in growing animals as determined by qRT-PCR. *JNK* expression levels in *JNK(RNAi)* animals were significantly reduced as compared with controls, validating the gene interference approach. Values represent the mean of three biological replicates. **(C)** Anti-pH3 immunostaining showing mitotic activity after 7 days of feeding. **(D)** FISH showing the expression of *h2b* in animals fed for 7 days and graph showing the relative expression of *h2b* as determined by qRT-PCR in growing animals. Values represent means of three biological replicates. (Top left, anterior). **(E)** Immunostaining with anti-synapsin to visualize the central nervous system and the pharynx of growing animals. The relative length of the posterior region was calculated by measuring the distance from the anchoring of the pharynx to the tail tip and dividing this by the whole-body length. White asterisk indicates the anchoring of the pharynx. (Left, anterior). **(F)** FISH showing the expression of *NB.32.1g* and *Agat-1*, markers of post-mitotic descendants of neoblasts, in growing animals. **(G)** FISH analysis of photoreceptor cells (*opsin+*) counterstained with DAPI (Top, anterior). **(H)** FISH analysis of octopaminergic (*tph+*) neurons and WISH analysis of serotonergic (*tph+*) neurons in the brains of animals fed for 21 days. (Top left, anterior). **(I)** Staining of the epithelia with DAPI and anti- β -catenin-2 antibody (Bcat2) and graph illustrating the quantification of the number of epithelial cells/mm² in anterior regions from animals fed for 21 days. Six biological replicates were used. (Top left, anterior). **(J)** DAPI staining in tissue sections from the brains of animals fed for 21 days. All the images except for *cintillo* and *tph* correspond to confocal z-projections. Error bars represent the standard error of the mean. Data were analyzed by Student's t-test. ***P<0.001; Differences are considered significant at P<0.05. Scale bars: 200 μ m (C-E), 300 μ m (F), 200 μ m (G), 50 μ m (H), 300 μ m (I), 50 μ m (J), 100 μ m (K). d, days of feeding.

DISCUSIÓN

Esta tesis analiza dos grandes bloques de procesos que ocurren durante la regeneración y el recambio tisular de la planaria: i) la aportación de información posicional por parte de la señalización de la vía Wnt no canónica durante la formación del sistema nervioso y durante la polarización y posicionamiento apical de los cuerpos basales ciliares y ii) la coordinación de la respuesta regenerativa temprana y del “remodeling” por parte de la vía JNK.

La búsqueda de elementos efectores del sistema Wnt5/Ror y de la vía PCP fue la que nos llevó, en un principio, a analizar la función de la JNK. Pero esto es lo apasionante de la investigación, no siempre encuentras lo que esperas, y a veces, lo inesperado acaba siendo incluso más interesante que lo esperado. Existen numerosas evidencias que indican que la vía Wnt no canónica/PCP actúa a través de la activación de la JNK y de “small GTPases” como la RhoA/Rho kinase (ROCK) y que esto se traduce en cambios de expresión génica y activación de moléculas reguladoras del citoesqueleto (Boutros et al., 1998; Oishi et al., 2003; Yamanaka et al., 2002). En *Drosophila*, aunque la implicación de los ligandos Wnts aún genera mucha controversia, se ha demostrado que Dishevelled activa a la JNK y la señalización de la PCP (Boutros et al., 1998). En vertebrados, Wnt5a activa a la JNK y es necesaria para la regulación de la migración celular en los movimientos de “Convergent-Extension” (Yamanaka et al., 2002), para la migración neuronal (Vivancos et al., 2009) y también para orientar la división celular y dirigir el crecimiento de las extremidades (Gros et al., 2010). Así mismo, se ha demostrado que la activación de la JNK por parte de Wnt5 se realiza a través del receptor Ror2 (Oishi et al., 2003). Sin embargo, la interferencia de la JNK en planarias no nos ha aportado evidencias de su implicación en la transducción de la señalización de la vía Wnt no canónica. Esto se debe, seguramente, a su naturaleza pleiotrópica, ya que esta quinasa a parte de actuar como efector de la vía Wnt no canónica, está encargada de regular procesos celulares básicos cuya alteración se manifestará antes durante la regeneración, enmascarando posibles funciones secundarias. En Almuedo-Castillo et al., 2014, demostramos que la JNK es necesaria para activar la transcripción de los genes de la herida (“wound-related genes”), la muerte celular por apoptosis y para controlar la progresión del ciclo celular de los neoblastos. En animales *JNK(RNAi)*, estos procesos no tienen lugar y la respuesta regenerativa está inhibida. Por lo tanto, esto imposibilita la

observación de posibles implicaciones de la JNK en procesos más tardíos y dependientes de la respuesta regenerativa, como puede ser el “patterning” del sistema nervioso o del sistema ciliar.

En el mismo intento de identificar elementos “down-stream” de la vía PCP, también analizamos el papel de otra quinasa, RhoA/ROCK, necesaria para la biología de todas las células ya que organiza la remodelación del esqueleto celular de actina. Identificamos un único homólogo de RhoA en el genoma de *S.mediterranea*, y su inhibición durante la regeneración generaba un fenotipo similar a la inhibición de un gen necesario para el mantenimiento de los neoblastos, es decir, regresión del blastema anterior, indentación del blastema posterior y “curling” (Figura 53). La expresión de *RhoA* desaparece en el parénquima de animales irradiados, por lo que está expresada en neoblastos y en su progenie, a parte de en tejidos diferenciados como el cerebro (Figura 53).

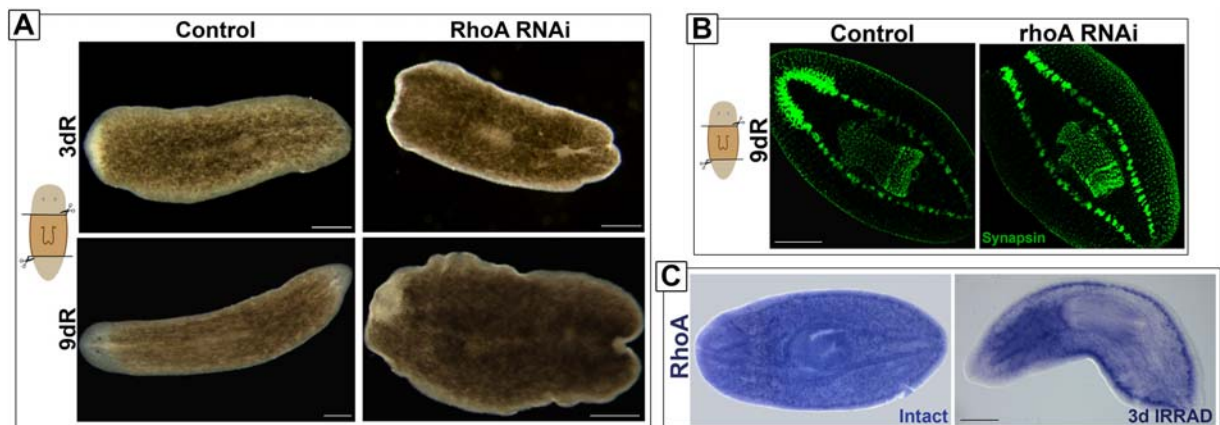


Figura 53: Análisis funcional de RhoA/ROCK durante la regeneración de planarias. (A) Imágenes de animales *RhoA(RNAi)* *in vivo* mostrando que no regeneran los blastemas y que a los 9dR experimentan efectos relacionados con la muerte del animal por problemas en el mantenimiento de los neoblastos. **(B)** El análisis del sistema nervioso por inmunohistoquímica con anti-Synapsin revela que los animales *RhoA(RNAi)* no regeneran ningún tejido nervioso nuevo. **(C)** WISH mostrando que la expresión de *RhoA* en el parénquima desaparece tras la irradiación. Anterior, izquierda en (A) y (C) y arriba/izquierda en (B). dR, días de regeneración. d IRRAD, días tras la irradiación. Barras de escala, 300µM.

Ya que la remodelación de los filamentos de actina es necesaria durante la división celular, pensamos que la incapacidad de regenerar de las planarias *RhoA(RNAi)* se debe a que sus neoblastos no son capaces de dividirse. Forsthoefel y colaboradores proponen que RhoA es necesaria para la ramificación del digestivo durante la regeneración, aunque en mi opinión, sería necesaria para la regeneración y formación de todos los tejidos.

Al igual que en el caso de la JNK, la imposibilidad de realizar inhibiciones condicionadas a una secuencia temporal o específicas de tejido, nos impide relacionar estas quinastas con la señalización de la vía Wnt no canónica durante la regeneración de planarias.

En los siguientes apartados, intentaré contextualizar nuestros resultados dentro del campo de la regeneración y el desarrollo embrionario de otros organismos, así como discutirlos en base a resultados relacionados publicados en otros laboratorios y proponer posibles escenarios alternativos.

1. Segregación funcional de los parálogos de Dishevelled en planaria

Dishevelled es una proteína altamente conservada con un papel clave en la activación diferencial de las distintas cascadas de señalización de la vía Wnt (Wallingford, 2005).

El análisis funcional de los dos parálogos de Dishevelled, Dvl-1 y Dvl-2 en Almuedo-Castillo et al., 2011, pone de manifiesto su especialización funcional. Mientras que Dvl-1 parece estar involucrado exclusivamente en garantizar la conexión neuronal, Dvl-2 estaría involucrado en la señalización a través de la β -catenin y formaría parte del complejo transductor de la PCP. Estas observaciones experimentales han sido confirmadas por el trabajo de Dillman y colaboradores, en el que realizan un estudio interespecífico de la arquitectura de Dishevelled, incluyendo *S.mediterranea*, e identifican motivos conservados en distintos parálogos asociados a funciones específicas. Por ejemplo, sólo Dvl-2 contiene las secuencias NLS y NES necesarias para la señalización dependiente de β -catenin y el aminoácido tyrosine473, esencial para la señalización de la PCP. Estos dominios están ausentes en Dvl-1, con lo que confirman nuestras observaciones de que este parálogo no activaría la vía β -catenin dependiente ni la PCP (Dillman et al., 2013).

Dentro de un contexto evolutivo, nuestras observaciones experimentales han servido para confirmar la especialización funcional que experimentan las duplicaciones internas de Dishevelled en distintas especies de invertebrados (Dillman et al., 2013). Además, es una evidencia más que apoya la conservación de los mecanismos de señalización en planarias.

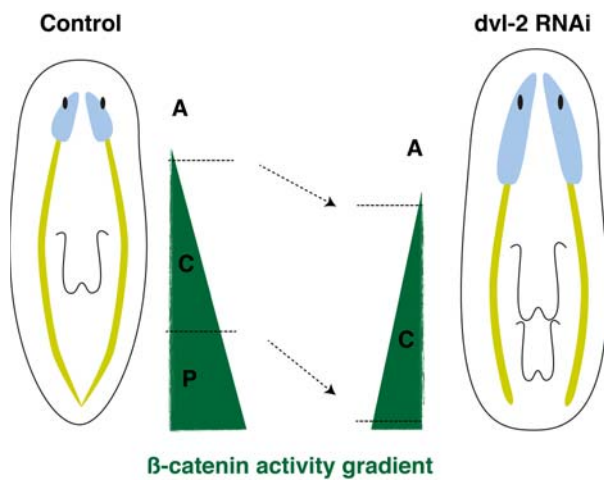


Figura 54: Dvl-2 señala a través de β -catenin. Esquema proponiendo que la reducción en el supuesto gradiente de actividad de β -catenin puede explicar el fenotipo de las planarias *dvl-2(RNAi)*.

El análisis de la progresión del fenotipo de las planarias *dvl-2(RNAi)* mostrado en Almuedo-Castillo et al., 2011 revela un aspecto interesante relacionado con la existencia de un gradiente de actividad de la β -catenin. El fenotipo de las planarias *dvl-2(RNAi)* progresa de manera que las regiones de identidad anterior y central parecen desplazarse hacia posterior, ya que el cerebro se expande y aparecen nuevas faringes ectópicas mientras que la región de identidad posterior queda bastante reducida, ya que los cordones nerviosos no convergen en posterior, o acaba

adquiriendo identidad anterior tras largos periodos de interferencia. Esto parece sugerir que la interferencia de *dvl-2* genera bajas dosis de inhibición de β -catenin y que el fenotipo progresa respondiendo a cambios graduales de un gradiente de actividad de ésta (Figura 54).

Para descartar que estos defectos relacionados con una función no canónica de Dvl-2, pensamos que al inhibir *dvl-2* junto con APC generaríamos sobre-activación de la actividad de β -catenin por la inhibición de APC (Iglesias et al., 2011) y que entonces sólo observaríamos los defectos de las planarias *dvl-2(RNAi)* relacionados con funciones no canónicas. Ya que la función canónica de Dvl-2 depende del secuestro del complejo de destrucción de la β -catenin, la sobre-activación de ésta producida al interferir APC no podría ser rescatada al hacer RNAi de *dvl-2* conjuntamente. Sin embargo, las planarias *APC/dvl-2(RNAi)* recuperan la capacidad de regenerar un cerebro que no poseían las planarias *APC(RNAi)* (Figura 55). Para asegurarnos de que los valores de β -catenin nuclear aumentan antes de inhibir *dvl-2*, repetimos el mismo experimento pero interfiriendo *dvl-2* más tarde, una vez que la interferencia de *APC* ha sido efectiva. Siguiendo este segundo diseño experimental, observamos que la diferenciación del cerebro, aunque más reducida, también se produce tras el RNAi de *dvl-2* en un fondo *APC(RNAi)*, pero que la formación ectópica de las faringes posteriores y la incapacidad de los cordones nerviosos de converger en posterior sí que no se observa en los animales *dvl-2/APC RNAi* (Figura 55). Es interesante que también se produce la expansión de los “brain primordia-like” que se forman por defecto en post-blastemas anteriores en animales

APC(RNAi). En definitiva, parece estar habiendo un rescate parcial de la sobre-activación de la actividad de la β -catenin al inhibir *dvl-2* en un fondo *APC(RNAi)*, ya que se recupera parcialmente la diferenciación del cerebro y por lo tanto la identidad anterior del blastema. Esto refleja la complejidad de las interacciones moleculares entre los elementos y la dificultad de analizar y sacar conclusiones sobre este tipo de relaciones epistáticas durante la regeneración *in vivo* de todo un organismo.

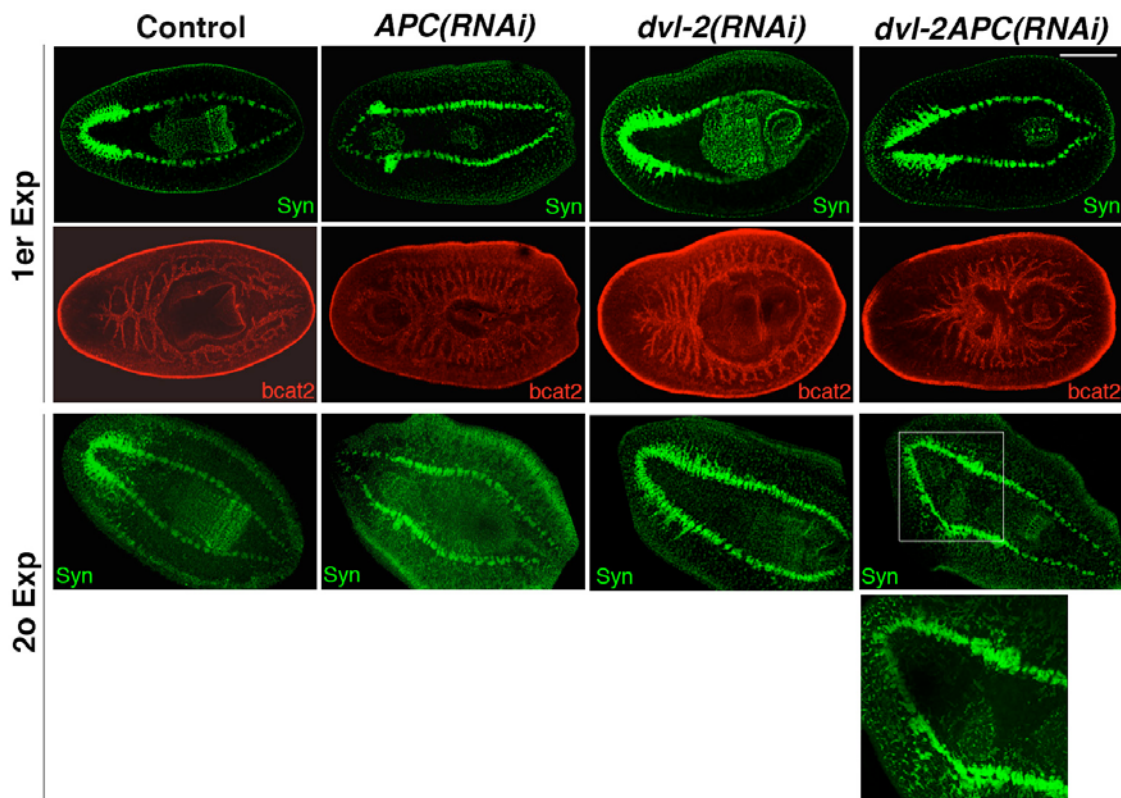


Figura 55: Experimentos de doble RNAi de *APC/dvl-2*. Análisis del sistema nervioso por inmunohistoquímica con anti-synapsin y del sistema digestivo con anti- β catenin-2. Se muestran los resultados obtenidos siguiendo los dos diseños experimentales; en el 1er experimento, *APC* y *dvl-2* son interferidos a la vez mientras que en el 2o experimento, el RNAi de *APC* se realiza durante la primera semana y el RNAi de *dvl-2* una semana más tarde. En todos los experimentos de combinaciones de RNAi con distintos genes, la cantidad de dsRNA en los animales controles y en los RNAi sencillos se normaliza inyectando la misma cantidad de *GFP(RNAi)* para igualar la cantidad de dsRNA inyectada en los animales RNAi dobles. Los animales corresponden a troncos regenerantes de 14 días. Anterior, izquierda. Syn, Synapsin; *bcat2*, β -catenin-2. Barras de escala, 200 μ M.

Asumiendo estas limitaciones, estos experimentos parecen sugerir que la formación ectópica de faringes posteriores y la incapacidad de los cordones nerviosos de converger en posterior sí que son defectos asociados a una función de Dvl-2 dependiente de la β -catenin. Sin embargo, la expansión de tejidos cerebrales, que también se observa en animales *wnt11.6(RNAi)*, parece que no depende de la actividad de la β -catenin y puede ser una función de Wnt11.6/Dvl-2 en restringir la diferenciación/migración de los precursores de cerebro a lo largo del eje AP.

2. La vía PCP en planarias

La “Planar Cell Polarity” o polaridad de las células a lo largo de un plano es una propiedad fundamental de las células en todos los tejidos, no sólo el epitelio. La polarización de las células es esencial para la morfogénesis de un tejido u organismo, así como es la base de la coordinación de los movimientos migratorios celulares durante la embriogénesis.

Como ya he introducido, existen múltiples componentes de la vía PCP y la identificación de nuevos componentes es continua (Gray et al., 2011; Weber et al., 2012). Todos los componentes no participan en todos los procesos, sino que varían dependiendo del tejido y el organismo, ya que muchas características de la vía PCP son específicas de contexto (Goodrich y Strutt, 2011). En planarias, hemos visto que Dvl-2, Vang1/2 y Diversin, todos elementos de la “PCP core network”, están involucrados en la polarización y el posicionamiento apical de los cuerpos basales ciliares. Sin embargo, la interferencia de *vang1/2* y *diversin*, componentes específicos de la PCP, no revela un papel de estos genes en otros procesos relacionados con la vía como la neurogénesis o la migración neuronal (Tissir y Goffinet, 2010). Las planarias *vang1/2(RNAi)* y *div(RNAi)* no presentan ningún defecto aparente durante la regeneración del sistema nervioso, lo que sugiere que i) estos componentes presentan redundancia funcional con otros componentes de la vía o incluso con otros parálogos no identificados, o que ii) el sistema Wnt5/Ror/Dvl1/2 estaría dirigiendo la migración neuronal de manera independiente de la vía de la PCP en planarias.

Aunque los mecanismos moleculares que aportan direccionalidad al proceso de la PCP permanecen aún por elucidar, se conoce que los ligandos Wnt5 y Wnt11 coordinan movimientos migratorios celulares en vertebrados (Goodrich, 2008). Recientemente, tras más de una década de búsqueda, Wu y colaboradores proponen que Wg y Wnt4 pueden estar aportando direccionalidad durante la orientación celular de la PCP en *Drosophila*, ya que generan un gradiente de actividad del receptor Frizzled modulando su capacidad de interactuar con Vang (Wu et al., 2013).

Sin embargo, nosotros mostramos que la interferencia de *evi-Wntless*, la proteína necesaria para la secreción de todos los ligandos Wnts (Adell et al., 2009), no afecta a la polarización ni al posicionamiento de los cuerpos basales ciliares. Así mismo, planarias RNAi de *wnt5* y otros putativos ligandos wnts no canónicos, *wnt11.6* y *wnt11.1/2*, tampoco muestran defectos evidentes (Figura 56).

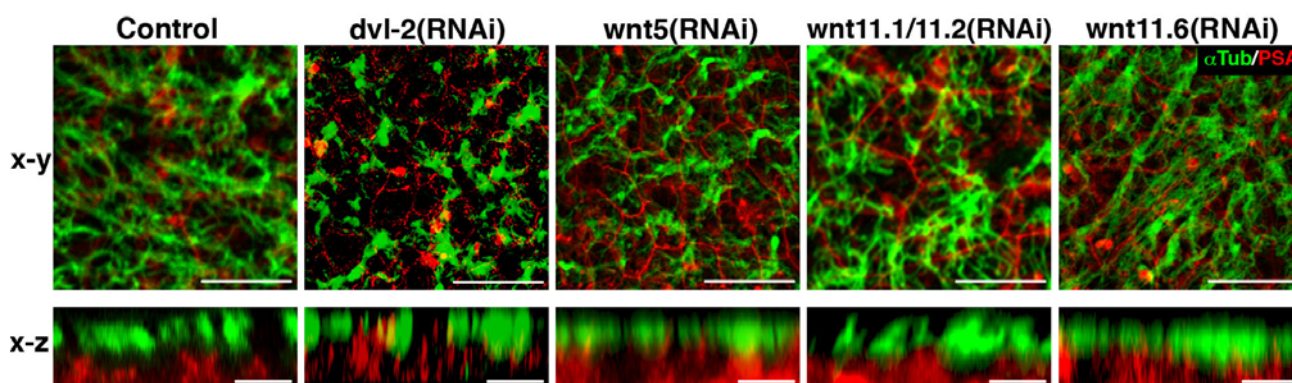


Figura 56: Los ligandos Wnts “no canónicos” no parecen funcionar durante la polarización ni el posicionamiento apical de los cilios en planarias. Análisis del sistema ciliar desde dos planos diferentes, (x-y) y (x-z) con anti- α Tubulina para observar los cilios y la lectina PSA que marca la membrana celular de las células epiteliales. Las imágenes corresponden a regiones de la zona prefaríngea de troncos regenerantes de 20-25 días. Anterior, izquierda/arriba. α Tub, α Tubulina; PSA, Lectina *Pisum sativum* agglutinin. Barras de escala, 10 μ M.

Por lo tanto, no hemos identificado ningún ligando Wnt involucrado en la vía PCP en planarias, o al menos en el posicionamiento de los cilios. El análisis de la vía Ft/Ds, que se ha descrito que actúa paralelamente a la PCP y que podría estar aportando a su vez direccionalidad al proceso de polarización (Lawrence y Casal, 2013), podría revelar nuevos datos sobre el proceso de polarización y el mecanismo molecular de la PCP en planarias.

La relevancia de nuestro estudio proviene también de la posición filogenética de la planaria, ya que aunque existían muchos datos sobre el funcionamiento de la PCP en vertebrados y en el superphylum de Ecdysozoa, sobretudo en *Drosophila*, nuestros resultados aportan evidencias sobre la funcionalidad de la vía PCP por primera vez en un organismo del otro gran superphylum, el de los lophotrocozoa, sugiriendo que la vía PCP es una carácter ancestral de los bilateria.

3. La ciliogénesis en planarias

Los cilios son estructuras celulares implicadas en muchas cascadas de señalización molecular. Los cilios se emplean para la locomoción en organismos unicelulares y pluricelulares y además, el batido de los cilios de las células de tejidos epiteliales es necesario para generar el movimiento e intercambio de fluidos en el interior del organismo (Wallingford, 2010; Wallingford y Mitchell, 2011). El interés por el estudio de la ciliogénesis ha aumentado a partir del descubrimiento de que el “primary cilia”, un orgánulo microtubular que poseen las células de vertebrados, juega un papel muy importante en la transducción de señales durante el desarrollo. Además, cada vez hay más datos que asocian defectos en la formación, posicionamiento y funcionamiento de este “primary cilia” y otros cilios con la aparición de cáncer y una gran variedad de enfermedades en humanos, conocidas como ciliopatías (Baker y Beales, 2009; Goetz y Anderson, 2010). La primera evidencia de la relevancia de los cilios en la señalización fue a partir de la observación de que la vía Hh en ratón requería estas estructuras para su regulación (Danwei Huangfu et al., 2003). Así mismo, se ha descrito que la formación, posicionamiento y polarización del batido de los cilios depende de la vía PCP en epitelios multiciliados de vertebrados (Park et al., 2008; Mitchell et al., 2009; Wallingford y Mitchell, 2011) y se ha propuesto que de manera recíproca, los cilios o proteínas ciliares serían a su vez necesarios para la señalización de la PCP y la distribución asimétrica de sus componentes (Wallingford y Mitchell, 2011). Todos estos datos, por lo tanto, sugieren que el cilio representa un nexo físico de unión para las distintas cascadas de señalización involucradas en el desarrollo embrionario (Goetz y Anderson, 2010).

Las planarias se mueven a partir de la contracción muscular y por deslizamiento a través de su epitelio multiciliado ventral (Rompolas et al., 2009). Los resultados publicados en Almuedo-Castillo et al., 2011, demuestran que la vía PCP también sería esencial para el funcionamiento de los cilios en planaria, ya que los defectos en su posicionamiento en las planarias *dvl-2*, *vang-1/2* y *diversin(RNAi)* hacen que dejen de moverse por deslizamiento y lo hagan exclusivamente por contracción muscular. Otros laboratorios también han

publicado datos que apoyan la conservación del proceso de ciliogénesis y que aportan datos sobre la evolución de la relación entre el cilio y la vía Hh. Por ejemplo, homólogos de las “intraflagellar transport proteins” (IFT) IFT52, IFT88, IFT172 y kif3a/b son también necesarios para el ensamblaje del cilio en planarias (Rink et al., 2009; Rompolas et al., 2009). Así mismo, los “outer arm dynein motors” y las proteínas mecanosensoriales ciliares (LC1) son necesarios para el movimiento sincrónico de los cilios (Rompolas et al., 2010). El RNAi de homólogos de proteínas reguladoras de Hh en otros organismos, como *fused*, *kif27* e *iguana*, impiden la ciliogénesis pero no parecen comprometer la señalización de Hh en planarias, como tampoco lo hace la interferencia de los genes que codifican para proteínas estructurales del cilio. Esto sugiere que la función de estas proteínas en la ciliogénesis sería una función ancestral de los bilateria y que la coopción de la regulación de Hh por parte de la estructura ciliar y por lo tanto de estas proteínas, sería una innovación de vertebrados, ya que tampoco se ha observado en *Drosophila* (Glazer et al., 2009; Rink et al., 2009).

4. Conservación funcional de la señalización Wnt5/Ror en restringir la migración neuronal

Wnt5 tiene una función muy conservada en dirigir la migración celular, ya sea a través del control de cambios morfológicos de la célula durante los movimientos de “convergent-extension” o a través del control de la polaridad y de la orientación neuronal durante la neurogénesis (Ciani y Salinas, 2005; Kikuchi et al., 2011; Montcouquiol et al., 2006).

A parte de los receptores Frizzled canónicos, se han descrito dos receptores específicos de Wnt5 que participan en distintos procesos, Ryk/Derailed y Ror (Angers y Moon, 2009; Niehrs, 2012). Ambos son receptores tirosina-quinasa y transducen la señalización de Wnt5 para aportar polaridad a las células, el aspecto fundamental en la migración neuronal y axonal dirigida (Clark et al., 2012). A diferencia de Ryk, que no forma complejos con otros receptores, la unión de Wnt5 a Ror induce la formación del complejo

receptor de un heterodímero de Ror con Frizzled. A parte de esto, la cascadas de señalización desencadenadas por ambos receptores comparten muchas características, lo que lleva a sugerir que pueden actuar de forma dependiente y que el hecho de que un receptor u otro transduzcan la señalización de Wnt5 parece depender simplemente del contexto (Clark et al., 2012). Nosotros mostramos, sin embargo, que en planarias el único receptor que podemos asignarle a Wnt5, es Ror, ya que el RNAi de *Ror* es el único que claramente copia el fenotipo de las planarias *wnt5(RNAi)*. Los receptores Fz en planaria han sido identificados (Gurley et al., 2008), pero la interferencia de ningún Fz parece estar asociada a defectos durante la regeneración o la homeóstasis de planaria (Sureda et al., resultados no publicados). Esto puede deberse a que muchos de ellos actúan de manera redundante y cualquier Fz podría rescatar la falta específica de otro. Existen dos receptores Fz que se expresan en el CNS de manera muy similar a *Ror*, pero la inhibición conjunta de estos dos Fzs tampoco causa defectos de desconexión lateral del cerebro regenerante asociados a Wnt5/Ror (Figura 57). Por lo tanto, no hemos identificado ningún Fz candidato a formar parte del complejo receptor junto con Ror en la transducción de Wnt5. De la misma manera, la interferencia de *Derailed*, expresado en el CNS de planarias, no reproduce el fenotipo de *wnt5(RNAi)*, ya que el cerebro regenera correctamente conectado a los cordones nerviosos preexistentes y los axones visuales proyectan cruzando la línea media y formando el quiasma óptico. Además, la penetrancia del fenotipo de *Ror(RNAi)* no es mayor al interferir *Ror* junto con *Derailed* (Figura 58).

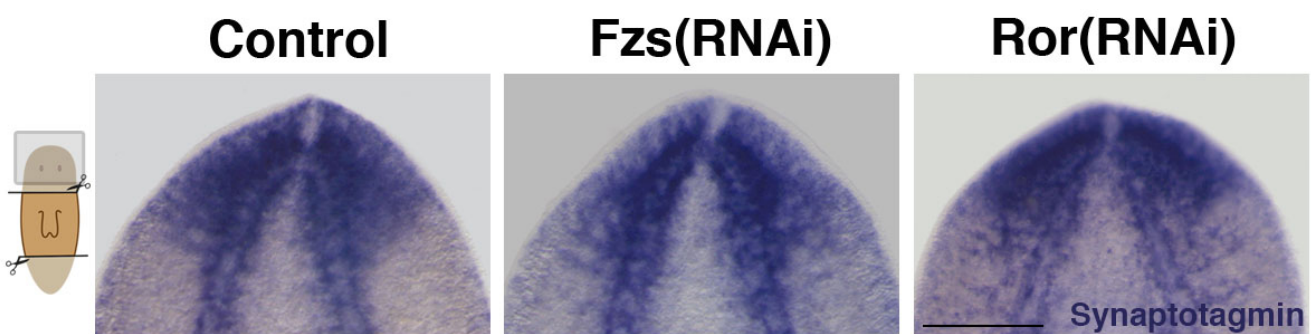


Figura 57: Los Fzs expresados de manera similar a *Ror* en planaria no parecen actuar formando un complejo receptor de Wnt5. (A) Análisis de la expresión de Synaptotagmin en el sistema nervioso que muestra que la inhibición de los Fzs expresados en el cerebro no reproducen el fenotipo de desconexión del cerebro regenerante observado en *Ror(RNAi)*. Anterior, arriba. Los animales son regenerantes de 9 días. Barras de escala, 200 μ M.

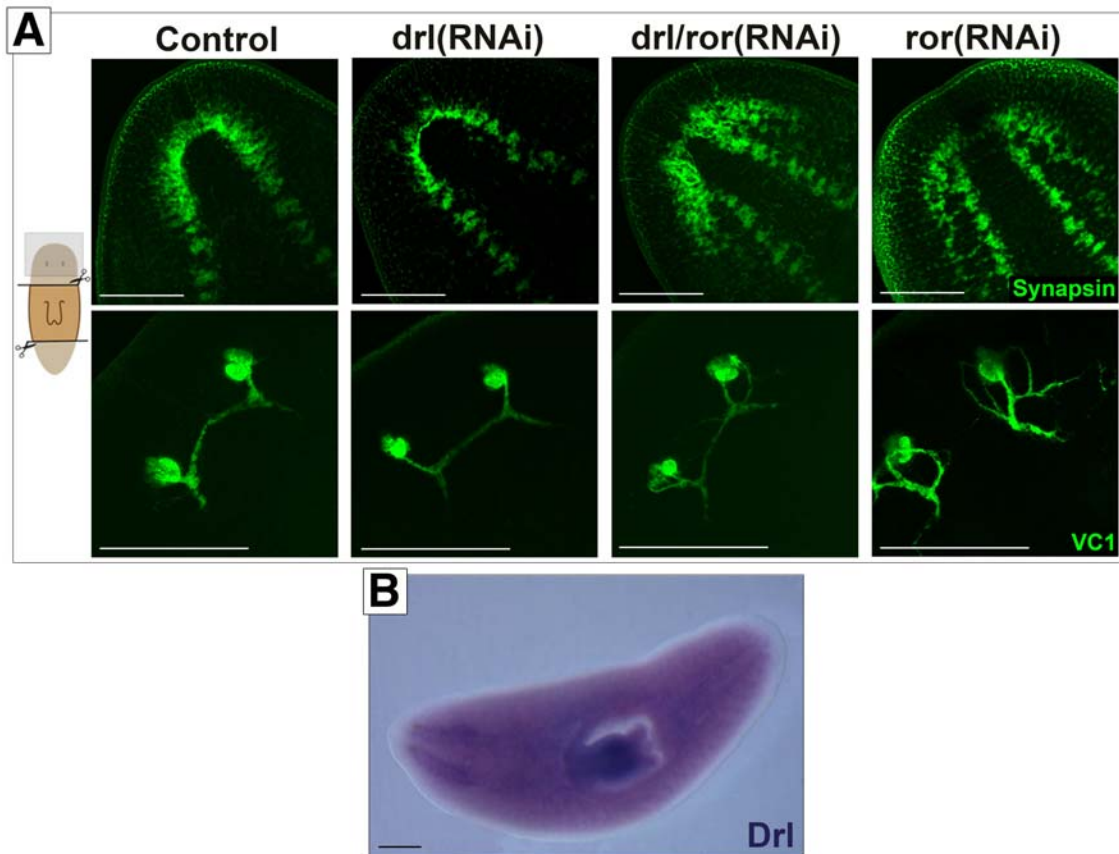


Figura 58: Wnt5 no actúa a través de Derailed durante el posicionamiento de los tejidos nerviosos en planaria. (A) Análisis de la regeneración del sistema nervioso con anti-Synapsin y del sistema visual con anti-arrestin (VC1) que muestran que el RNAi de *Derailed* no reproduce el fenotipo de los animales *wnt5* y *Ror(RNAi)* y que la penetrancia del fenotipo *Ror(RNAi)* no aumenta al inhibirlo junto con *Derailed*. **(B)** WISH mostrando la expresión de *Derailed* en el CNS de la planaria. Anterior, arriba/izquierda en (A) e izquierda en (B). Los animales en (A) son regenerantes de 13 días. Drl, Derailed. Barras de escala, 300 μ M.

Aún así, aunque no se pueden relacionar fácilmente con Wnt5, estas planarias *Derailed(RNAi)* sí que presentan algunos defectos en la regeneración del cerebro, ya que la densidad del cerebro es menor y los axones que forman el quiasma óptico no proyectan exactamente siguiendo la curvatura del dominio más interno del cerebro, tal y como lo hacen en animales controles (Figura 58). En definitiva, aunque no podemos descartar que Wnt5 actúe a través de Derailed para regular otros procesos, estas observaciones preliminares sugieren que Derailed y Ror no desencadenan cascadas de señalización similares en planarias.

Una cuestión que permanece sin resolver, es si Wnt5 y Slit están posicionando el sistema nervioso controlando exclusivamente la migración de las neuronas o precursores neuronales o también, como ocurre en el resto de organismos, guiando la dirección de crecimiento de los axones (Kikuchi et al., 2011; Killeen y Sybingco, 2008; Mulligan y Cheyette, 2012). El desconocimiento sobre cómo se produce la primera fase de

regeneración del cerebro es una de las causas que nos impiden decantarnos por una opción u otra. Como ya he introducido en el apartado de regeneración del sistema nervioso, se ha propuesto que los primordios del cerebro regeneran independientemente de los cordones preexistentes y estos después proyectan para conectarlos (Cebrià et al., 2002c). Si esto ocurriera así, la función de Wnt5 y Slit sería probablemente la de restringir la migración de los precursores neuronales que formarían los primordios cerebrales y los defectos en la direccionalidad de las proyecciones de los axones de los cordones nerviosos no estarían relacionados con una función de Wnt5 y Slit en el guiaje de los axones, sino que serían consecuencia del mal posicionamiento de estos primordios cerebrales. En mi opinión, sin embargo, no está claro que los primordios cerebrales regeneren físicamente separados de los cordones nerviosos preexistentes, ya que nunca se observa una separación física cuando se analiza la regeneración del cerebro con marcadores de poblaciones neuronales comunes a los cordones y el cerebro (Fraguas et al., 2012). Además, antes de hipotetizar sobre la existencia de un mecanismo alternativo que posiciona estos primordios paralelamente a los cordones preexistentes, me parece más lógico pensar que son los propios cordones los que determinan la posición de estos primordios ya sea a través de la proyección axonal o no, sin necesidad de implicar otras sustancias secretables que viajen más allá de estos cordones.

Además, los defectos en la proyección de los axones visuales observados en las planarias *wnt5* y *Ror(RNAi)* parecen estar sugiriendo un papel de Wnt5/Ror en el guiaje de estos axones visuales. Es cierto que se ha propuesto que los axones visuales proyectan en base a la posición del cerebro, con lo cual, el hecho de que los axones no crucen la línea media en los animales *wnt5* y *Ror(RNAi)* regenerantes puede deberse simplemente a que carecen de la base del cerebro para crecer. Sin embargo, mostramos que las planarias RNAi de *wnt5* y *Ror* no amputadas que conservan el cerebro preexistente posicionado correctamente, también proyectan aberrantemente hacia los laterales. Por lo tanto, estas observaciones apuntan a que como ocurre en los demás organismos, Wnt5/Ror guían el camino de la regeneración de los tejidos nerviosos restringiendo la migración neuronal y el crecimiento de los axones, ya que estos dos procesos parecen ser inseparables en un contexto de desarrollo continuo y activo como el de la planaria.

5. La línea media: elongación y “patterning” ML del blastema

Durante la regeneración, el blastema debe establecer de forma dinámica su patrón de identidad a la vez que crece. Esto requiere una coordinación exhaustiva entre el crecimiento y los mecanismos que dan identidad y posicionan a los tejidos. La línea media debe jugar un papel esencial como organizador en estos procesos y en su integración. El establecimiento y mantenimiento de la línea media como organizador ha sido clave durante la evolución de la bilateralidad y la formación de sistemas complejos, como el CNS, que este diseño corporal bilateral permite (Meinhardt, 2004).

Como ya he introducido anteriormente en el apartado de regeneración de los polos, se han descrito un grupo de genes homeobox y homeodomain que son necesarios para la regeneración y el crecimiento de los blastemas y todos ellos se expresan en los polos de la línea media dorsal de la planaria o del blastema regenerante (Blassberg et al., 2013; Chen et al., 2013; Felix et al., 2010; Hayashi et al., 2011; März et al., 2013; Roberts-Galbraith y Newmark, 2013; Scimone et al., 2014). Como también he introducido en el apartado de establecimiento del eje DV, los genes del sistema *bmp/admp*, responsables de establecer el eje DV, se expresan en la línea media dorsal y ventral respectivamente y su interferencia genera problemas en la formación de los blastemas, que regeneran indentados y también inhiben la regeneración lateral (Gaviño y Reddien, 2011; Molina et al., 2007; Reddien et al., 2007; Tesis doctoral de M^a Dolores Molina Jiménez, 2011). Slit por su parte, se encarga de establecer el patrón ML de los tejidos regenerantes y también se expresa en la línea media dorsal y ventral (Cebrià y Newmark, 2007). Su interferencia, sin embargo, no afecta al crecimiento de los blastemas anterior y posterior ni tampoco laterales, ya que los blastemas regeneran aunque mal patroneados. Por lo tanto, la expresión de estos distintos grupos de genes sería necesaria para procesos diferentes aunque todos relacionados con la línea media: i) la expresión de los genes homeobox/homeodomain en la línea media anterior y/o posterior sería necesaria para dirigir el crecimiento de los blastemas, ii) la expresión del sistema Bmp/Admp seguramente se

requiere para la integración de los distintos ejes DV, AP y ML y iii) la expresión de Slit serviría como un eje de simetría para establecer y mantener la polaridad ML del blastema. *wnt5* se expresa de manera complementaria a *slit* en la región ventral, pero no se expresa de manera definida en la línea media dorsal, donde sí que se expresan *slit* y los genes relacionados con el crecimiento del blastema. Esto parece sugerir que es Slit el que se encarga de posicionar las estructuras respecto a la línea media, mientras que Wnt5 limitaría la extensión de la línea media posiblemente a través de la restricción del dominio de expresión de *slit*. Este razonamiento nos lleva a proponer que Wnt5 tiene dos funciones diferentes relacionadas con sus diferentes dominios de expresión. Primero hay algunas células que expresan *wnt5* en regiones centrales de la planaria, cerca de las que coexpresan *Ror* y *slit*. En estas regiones estará limitando el dominio de expresión de *slit*, no sólo en ventral, sino también en la línea media dorsal, y por lo tanto también será importante para el posicionamiento de la línea media. Segundo, *wnt5* se expresa en los laterales de la región ventral, donde estaría repeliendo la migración neuronal hacia los laterales, de manera coordinada pero independiente a su control en el establecimiento del dominio de expresión de *slit*.

wnt5, por su parte, está expresado en el borde DV, que como ya he introducido anteriormente se ha propuesto como un organizador durante la regeneración de planarias. Sin embargo, no observamos ninguna característica fenotípica en los animales *wnt5(RNAi)* que parezca estar relacionada con una función de Wnt5 en esta supuesta región organizadora DV, ya que la interferencia de este gen no impide la regeneración AP ni lateral. En este contexto, es muy interesante el paralelismo de los dominios de expresión que presentan el sistema Wnt5/Slit con el Bmp/Admp; ambos se expresan en tres dominios diferenciados: i) línea media dorsal (*slit* y *bmp*), ii) línea media ventral (*slit* y *admp*) y iii) en el borde DV (*wnt5* y *admp*). Aunque no hay evidencias de que estos dos sistemas interactúen funcionalmente, esta convergencia de expresión sugiere una relación entre el establecimiento de los ejes DV y ML e indica que estos dominios, línea media y borde DV de la planaria, tienen una función importante como sistema de coordenadas de información posicional.

La formación y mantenimiento de los límites de expresión (“expression boundaries”) es clave durante el desarrollo embrionario (Dahmann et al., 2011; Lander, 2013). Es obvio que también será un requisito principal durante la regeneración y los cambios homeostáticos de la planaria. Los patrones de expresión de *wnt5* y *slit* indican que estos

ligandos funcionan restringiendo la migración neuronal y el posicionamiento del cerebro hacia las zonas donde se expresan y muy probablemente, donde actúan. Por lo tanto, su funcionamiento dependerá de la robustez en el establecimiento de sus límites de expresión. Gurley y colaboradores ya proponen que Wnt5 y Slit pueden estar inhibiéndose mutuamente, ya que muestran que el RNAi de *wnt5* y *slit* genera la expansión de la expresión de *slit* y *wnt5* respectivamente (Gurley et al., 2010). Sin embargo, ya que sólo analizan la expresión en animales regenerantes que ya presentan los tejidos nerviosos desplazados debido a la interferencia de *wnt5* o *slit*, cabía la posibilidad de que la expansión de sus patrones de expresión fuera una consecuencia de la expansión física del sistema nervioso. Muchas de nuestras observaciones sirven para confirmar esta mutua regulación entre Wnt5 y Slit. Primero, vemos que los patrones de expresión de *wnt5* y *slit* también se expanden en animales RNAi amputados lateralmente o no amputados, que aunque forman tejidos nerviosos ectópicos desplazados medio-lateralmente, conservan los tejidos nerviosos preexistentes en la misma posición. También vemos que la generación de fuentes ectópicas de Wnt5 generan el desplazamiento del dominio de expresión de *slit* huyendo de esta nueva fuente. Por último, *Ror*, el receptor funcional de Wnt5, coexpresa perfectamente con *slit* en la línea media ventral y dorsal, indicando que debe de haber alguna interacción entre los dos sistemas, que estará asegurando su coordinación y probablemente, el mantenimiento de sus límites de expresión. A diferencia de lo propuesto por Gurley y colaboradores, observamos que en un fondo *slit(RNAi)*, la expresión de *wnt5* no aumenta o se mantiene, como la expresión de *slit* en un fondo *wnt5(RNAi)*, sino que disminuye, a la vez que las pocas células expresando *wnt5* también se localizan fuera del patrón de expresión lateral típico de *wnt5*. Por lo tanto, aunque nuestros resultados están de acuerdo con una mutua regulación, no apuntan a que esta sea una doble inhibición, sino que Wnt5 estaría restringiendo la localización de las células que expresan *slit* mientras que Slit podría estar igualmente restringiendo la localización de las células que expresan *wnt5*, pero probablemente, a la vez activa la transcripción de *wnt5*. Para confirmar estas regulaciones a nivel transcripcional, realizaremos análisis cuantitativos de expresión por Real-Time PCR. Así mismo, estos análisis nos ayudarán a responder si Wnt5 inhibe la expresión de *slit* a nivel global o si por el contrario, lo que hace es restringir la posición de las células que expresan *slit*.

En mi opinión, el escenario más plausible que explicaría la inesperada coexpresión de *Ror* y *slit*, junto con el tipo de regulación transcripcional que parecen presentar *wnt5* y *slit*, sería que un sistema parecido al de “local self-enhancement y long-range inhibitor” propuesto por Gierer y Meinhardt estaría operando en planarias para restringir el patrón de expresión de *slit*, y por lo tanto, establecer la línea media (Meinhardt, 2000; 2004). Por lo tanto, *Wnt5* a través de *Ror* estaría activando a un inhibidor de *Slit*, que se expresa en las mismas células que *Slit* pero que difundiría más lejos y lentamente, de manera que se generaría el límite de expresión de *slit* cuando la cantidad del inhibidor supera a la de *Slit*. La innovación en planarias, que puede ser difícil de explicar, sería que *Slit*, el activador, estaría induciendo la expresión de su inhibidor de manera indirecta a través de la activación de *wnt5* (Figura 59).

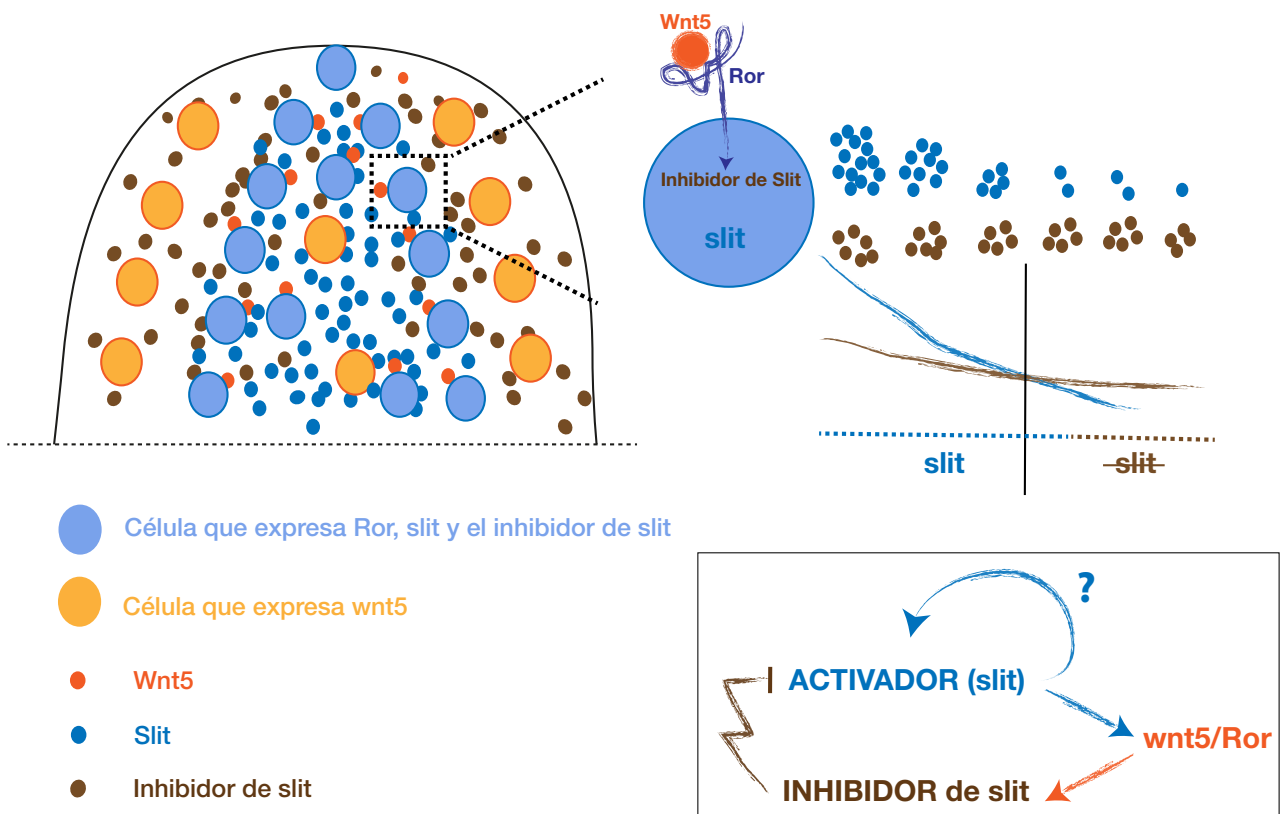


Figura 59: Modelo propuesto para el establecimiento del límite de expresión de *slit* en la línea media. Adaptación del sistema de regulación propuesto por Gierer y Meinhardt de “local self-enhancement and long-range inhibitor” (Gierer y Meinhardt, 1972). Para simplificar, sólo la zona anterior ventral de la planaria está representada, aunque se podría aplicar a cualquier dominio expresión de *slit*. A la derecha se muestra una amplificación esquematizando el mecanismo molecular a nivel celular. En el recuadro, se muestran las regulaciones transcripcionales propuestas.

Por ahora, este modelo es muy especulativo y aún quedan muchas preguntas por resolver; por ejemplo, tendríamos que ser capaces de identificar la supuesta molécula inhibidora de *Slit* activada por *Wnt5/Ror*, que sería posible realizando un análisis de

expresión diferencial en un fondo *wnt5/Ror(RNAi)* y filtrando aquellas moléculas secretables cuya expresión esté disminuida. Además faltaría por responder si tal y como está propuesto en el sistema de Gierer y Meinhardt, el activador (Slit) está activando a la vez su propia expresión, para lo que deberíamos diseñar un anticuerpo contra Slit o identificar al receptor funcional de este, para poder visualizar si el receptor o la proteína Slit también se localizan en las células que expresan *slit*. Por último, la identificación del receptor de Slit también nos ayudaría a resolver si Slit, a su vez, también está restringiendo el posicionamiento de las células que expresan *wnt5* o si por el contrario, el hecho de que la expresión de *wnt5* se expanda fuera de sus dominios en un fondo *slit (RNAi)* es una consecuencia de la pérdida de la línea media.

Es importante destacar que Wnt5 está restringiendo el dominio de expresión de *slit* y en consecuencia, también de la línea media. Por lo tanto, no podemos descartar que la inhibición de *wnt5* tenga consecuencias en la polaridad global del eje ML dependientes de la expansión del dominio de expresión de *slit*.

En definitiva, soy muy consciente de la complejidad de este sistema de regulación y de las muchas incógnitas que plantea, pero aún así me parece que responde al tipo de sistema regulatorio robusto e integrador que requiere la generación de estos límites de expresión y la coordinación funcional entre Wnt5 y Slit.

6. La vía JNK coordina la respuesta regenerativa

Las primeras horas de regeneración comprenden una serie de procesos que deben activarse de manera controlada e inmediata. La inducción de la proliferación de los neoblastos para reemplazar los tejidos perdidos o dañados debe coordinarse con la inducción de muerte celular para eliminar células no necesarias y con la adquisición de la identidad y proporción de estos tejidos regenerantes. Antes de una hora tras el cierre de la herida, empiezan a expresarse los genes asociados a la herida y un poco más tarde lo harán los genes involucrados en el establecimiento de la identidad. La expresión de estos y otros genes aportará la información necesaria para la respuesta de los neoblastos, ya sea la de activar su proliferación o la información posicional para su correcta diferenciación. A día de hoy, continúa siendo un misterio cómo ocurre esta respuesta durante la cicatrización de la herida; se desconocen, por ejemplo, las señales “up-stream” que activan todos estos procesos, si son procesos controlados de manera independiente o si dependen unos de otros, así como cuáles son los mecanismos que realmente generan asimetrías posicionales, ya que durante las primeras horas, la cadena de expresión génica parece ser la misma en cualquier blastema, independientemente de los tejidos que tengan que regenerarse.

En Almuedo-Castillo et al., 2014, mostramos que la activación de la JNK es clave para responder correctamente a la amputación, ya que induce la expresión génica (ocurre entre 30 minutos y 6 horas post-amputación, p.a.) y la muerte celular por apoptosis (1-4 horas p.a.) a la vez que controla la respuesta proliferativa de los neoblastos asociados a la herida (3-6 horas p.a.). El fenotipo producido tras el RNAi de la *JNK* es el primero en el que se observan la inhibición de la respuesta apoptótica en la herida y el descontrol de la dinámica temporal de la respuesta proliferativa. La interferencia de la *JNK* inhibe la regeneración, pero su pleiotropía nos impide afirmar si existe un proceso específico que sería el principal motor de la regeneración y además, si existe una dependencia entre ellos. La JNK tiene funciones pro-apoptótica y de control o “check-point” durante la progresión del ciclo celular muy conservadas evolutivamente. Podría ser que la JNK

controle de manera independiente estos procesos en planarias, o que por al contrario, la inhibición de la apoptosis en los animales *JNK(RNAi)* cause el descontrol de la proliferación de los neoblastos y la incapacidad de diferenciación de éstos. Para decantarnos por un escenario u otro deberíamos ser capaces de analizar las consecuencias de inhibir la apoptosis sin interferir la JNK. Sin embargo, ni nosotros ni otros grupos hemos sido capaces de inhibir la respuesta apoptótica inicial tratando con inhibidores químicos (drogas) empleados para ello en otros organismos. Otra estrategia sería inhibir la función de la JNK una vez ya se ha producido la respuesta apoptótica para ver si el control temporal de la proliferación sigue estando afectado. Esta inhibición temporalmente dirigida sería posible administrando drogas específicas contra la JNK. Una vez más, no hemos podido realizar con éxito el tratamiento con estas drogas, ya que aunque inhibían la regeneración, lo hacían por que inhibían la proliferación y el mantenimiento de los neoblastos y por lo tanto, no copiaban el fenotipo observado al inhibir la *JNK* por RNAi. Esto se debe a que ninguna de estas drogas son realmente específicas para la JNK. Por ejemplo, la SP600125 inhibe a concentraciones similares tanto a otras MAPKs como a Ser/Thr kinases como la Aurora A, FLT3, MELK o TRKA, todas ellas con funciones muy conservadas en la biología de las células madre. Esta es la causa de las contradicciones entre nuestro estudio y el publicado por Tasaki y colaboradores, en el que analizan el papel de la JNK exclusivamente a través de la administración de esta droga, la SP600125. De acuerdo con nuestros resultados empleando SP600125, ellos proponen que la JNK es necesaria para la entrada en mitosis de los neoblastos (Tasaki et al., 2011b), mientras que nosotros observamos que la JNK no es necesaria para la entrada en mitosis *per se*, sino para que esta ocurra de manera controlada en el tiempo. Para justificar la especificidad de la droga SP600125, muestran que el tratamiento con otra droga contra las MAPKs MEK1 y MEK2, U0126, no inhibe la entrada en mitosis. Sin embargo, está comprobado que esta droga parece actuar de manera más específica y que no interfiere con las MAPKs y Ser/Thr kinases con las que si lo hace la SP600125 (Duncia et al., 1998). Por lo tanto, esto pone en evidencia la importancia de comprobar exhaustivamente la especificidad de las drogas antes de adjudicar una función a una proteína en concreto.

Así mismo, tampoco podemos discernir si es la ausencia de muerte celular o el descontrol del ciclo celular la causa principal de la incapacidad de diferenciación en los animales *JNK(RNAi)*. Cada vez existen más evidencias en diferentes organismos con capacidad

regenerativa que indican la importancia de la muerte celular en el desencadenamiento de la regeneración y el “remodeling” (Bergmann y Steller, 2010; Vitz et al., 2014). Sin embargo, estas evidencias apuntan a que la señalización por parte de las células apoptóticas estaría induciendo la proliferación de las células madre, mientras que no hay ningún dato que indique que esté induciendo directamente la diferenciación celular. Por lo tanto, teniendo en cuenta que hemos comprobado que en planarias la proliferación de los neoblastos ocurre aún en ausencia de muerte celular por apoptosis, no podemos afirmar que sea la ausencia de muerte celular la causa principal de la incapacidad de regenerar observada en las planarias *JNK(RNAi)*.

En definitiva, el hecho de estudiar una vía tan compleja y pleiotrópica como la JNK durante la regeneración *in vivo* de todo un organismo, nos impide establecer a ciencia cierta interacciones y una jerarquía funcional y temporal entre todos los procesos celulares que controla. Aún así, debido a la conservación funcional de la JNK en la inducción de la expresión génica, apoptosis y en el control de la progresión del ciclo celular en respuestas a estímulos de estrés, nos inclinamos a pensar que en planarias, igualmente, la JNK podría estar regulando todos estos procesos de forma independiente aunque coordinada, para garantizar la correcta integración funcional que requiere la respuesta regenerativa.

7. La vía JNK durante el cierre de la herida o “wound closure”

El primer evento en la cicatrización de la herida es el cierre de ésta para proteger los tejidos internos y evitar su contacto con el exterior. Como ya he introducido en el apartado de cicatrización de la herida, este proceso ocurre especialmente rápido en planarias, ya que la herida se cierra minutos tras la amputación por contracción muscular y antes de una hora, el epitelio preexistente ya ha recubierto la herida. El tratamiento de planarias

amputadas con MgCl inhibe la contracción muscular (Schürmann y Peter, 1998) y el tratamiento con Cytochalasin B impide el recubrimiento epitelial y la consecuente relajación de la musculatura de la zona de la herida (Pascolini et al., 1984) (Figura 60).

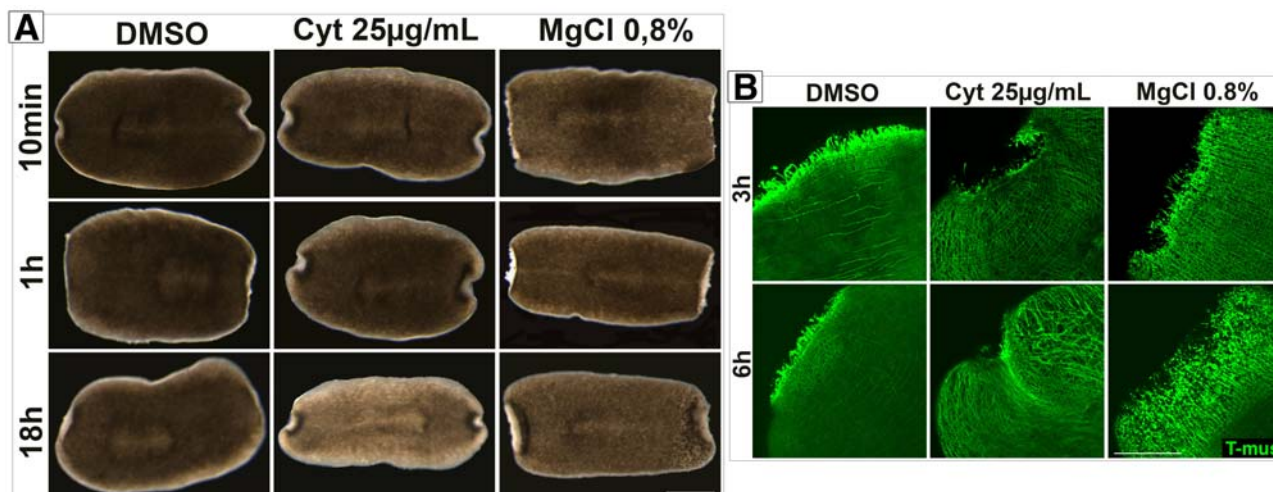


Figura 60: Inhibición del cierre de la herida por tratamientos con Cytochalasin B y MgCl. (A) Imágenes de animales *in vivo* donde se observa la inhibición de la relajación muscular de la zona de la herida por el tratamiento con cytochalasin B y la inhibición de la contracción muscular al tratar las planarias con MgCl. **(B)** Análisis de la musculatura por inmunohistoquímica con T-MUS, anticuerpo que reconoce a la “Myosin-heavy Chain” (MHC) de las células musculares. Es posible observar la contracción de las fibras musculares en las planarias tratadas con cytochalasin B aún 6 horas tras la amputación y la disgregación de las fibras musculares de la zona de la herida de las planarias tratadas con MgCl. Anterior, izquierda en (A) y arriba/izquierda en (B). min, minutos tras la amputación; h, horas tras la amputación; DMSO, solución control con la misma concentración de DMSO en el que están disueltos los compuestos químicos; Cyt, cytochalasin B. Barras de escala, 300 µM (A) y 200µM (B).

El estudio de la regeneración del disco de ala de *Drosophila* ha identificado a la JNK como un elemento clave tanto en el cierre de la herida como en la respuesta regenerativa asociada. La vía JNK se activa en los bordes de la herida y después en la zona regenerante. Además, mutantes de los componentes de su cascada de señalización no cierran apropiadamente la herida por que no son capaces de reorganizar el epitelio (Bosch et al., 2005; Ramet et al., 2002; Repiso et al., 2011). Sin embargo, nosotros observamos que en planarias, aunque la JNK coordina la respuesta regenerativa temprana, el cierre de la herida parece ser un proceso independiente de la JNK. p38 forma parte del grupo de las SAPKs junto con la JNK y actúa de manera redundante con esta en muchos procesos en respuesta a estímulos de estrés, como podría ser la amputación (Huang et al., 2009; Munshi y Ramesh, 2013). Por lo tanto, una posibilidad sería que p38 esté rescatando la falta de función de la JNK y por eso no vemos ningún defecto en el cierre de la herida. Sin embargo, la doble interferencia de *p38* y *JNK* durante largos periodos tampoco afecta al cierre de la herida de planaria; ni a la contracción

muscular ni a la posterior relajación de la musculatura de la zona de la herida asociada al recubrimiento epitelial (Figura 61), defectos que sí son evidentes a simple vista tras el tratamiento con MgCl y Cytochalasin B (Figura 60). Por lo tanto, podemos concluir que el cierre de la herida parece ser un proceso independiente de la regulación por parte de JNK y p38.

En vertebrados, también se ha descrito que tanto la JNK como RhoA y otros componentes de la vía PCP están implicados en remodelar la morfogénesis celular para permitir entre otros eventos, la migración celular requerida para el cierre y la cicatrización de la herida (Bass et al., 2011; Caddy et al., 2010; Shi et al., 2012). Al igual que en el caso de la JNK, ya hemos mostrado que la interferencia de ninguno de estos componentes afecta al cierre de la herida en planarias.

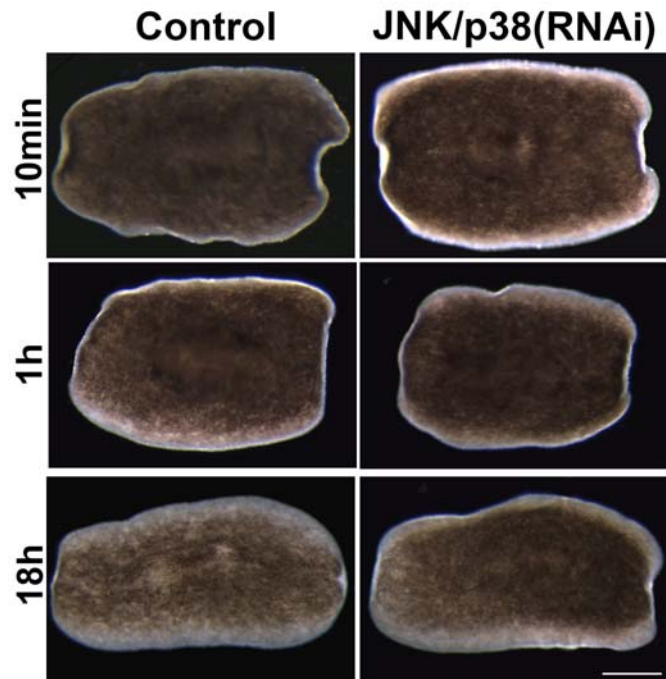


Figura 61: El cierre de la herida en planaria es un proceso independiente de las SAPKs JNK y p38. Imágenes *in vivo* que muestran una dinámica normal del cierre de la herida en las planarias *p38/JNK(RNAi)*. Anterior, izquierda. min, minutos tras la amputación; h, horas tras la amputación. Barras de escala, 200 μ M.

La explicación a que al contrario que en otros organismos, no encontremos ninguna proteína o cascada de señalización responsable del cierre de la herida puede ser que la naturaleza molecular de este proceso es diferente en planarias. Tanto en *Drosophila* como en vertebrados se ha descrito que es un proceso complejo que requiere horas tras la amputación. Así mismo, son necesarios la coordinación de la migración de celular y cambios celulares a gran escala, como la proyección de fibras de actina por parte de las células epiteliales (Bergantiños et al., 2010) o el reclutamiento de fibroblastos hacia al herida (Shaw y Martin, 2009). Por el contrario, en planarias, el cierre ocurre de manera inmediata, en cuestión de minutos, por lo que parece ser un proceso mecánico que no depende de migración celular o de regulación génica.

8. La vía JNK y la especialización de los neoblastos: El modelo de “Specialized neoblasts”

Al menos una subpoblación de neoblastos, los “clonogenic Neoblasts” o “cNeoblasts” tienen la particularidad de que son pluripotentes y son capaces de diferenciarse a cualquier tipo celular de la cepa asexual (Wagner et al., 2011). Sin embargo, que sean capaces no quiere decir que en una situación normal lo hagan o que todos ellos sean pluripotentes. Es decir, que pueden existir distintas subpoblaciones de neoblastos especializados a un linaje celular en particular, tal y como ocurre en otros sistemas de células madre (Biressi y Rando, 2010) y durante la regeneración en otros organismos como *Xenopus*, axolotl y Zebrafish (Tanaka y Reddien, 2011). En el apartado de neoblastos, ya he introducido que Reddien defiende este modelo de “Specialized neoblasts” (Reddien, 2013) y se basa en varias observaciones: i) tras el aislamiento de una subpoblación enriquecida en neoblastos por citometría de flujo (células denominadas X1, con el genoma duplicado en fases S/G2 de su ciclo celular) se observa que estas células presentan heterogeneidad en su expresión génica (Hayashi et al., 2010; Moritz et al., 2012; Pearson y Sánchez-Alvarado, 2010; Shibata et al., 2012) y ii) algunos genes específicos de los ojos y de los protonefridios comienzan a expresarse en neoblastos (estas células expresan estos genes junto con el marcador de neoblastos *piwi-1* y *h2b*, son reconocidas por BrdU y son sensibles a la irradiación) (Lapan y Reddien, 2012; Scimone et al., 2011). Esto también es cierto para el gen selector de neuronas serotoninérgicas *pitx* (Currie y Pearson, 2013; März et al., 2013). Así mismo, Reddien propone que la herida o la falta de tejido puede estar impulsando la especialización de los neoblastos basándose en que *runt-1* se expresa en neoblastos específicamente tras una herida y que tras la amputación, Runt-1 será necesario para la regeneración de los ojos y la expresión de otros genes.

Nuestra observación de que la JNK es necesaria para la atenuación de la progresión del ciclo celular encajaría con este modelo. La maquinaria de control del ciclo celular no

simplemente es requerida para conducir el ciclo celular y chequear el daño celular antes de la entrada en mitosis, sino también es un sistema de regulación dinámico que integra la división celular con su diferenciación para asegurar el éxito en la ejecución de los distintos programas (Ishidate et al., 2014; Kaldis y Richardson, 2011; Lim and Kaldis; 2013). Tras la amputación en planarias, los neoblastos comienzan a dividirse y por lo tanto a diferenciarse de manera temporalmente controlada y sincronizada. Exclusivamente tras heridas que requieren la diferenciación de nuevos tejidos, la mayor cantidad de los neoblastos entran en mitosis alrededor de 48 horas tras la amputación. Esta coordinación temporal es necesaria no sólo para un comienzo sincrónico de la diferenciación, sino probablemente también para proporcionar el tiempo necesario para que estos neoblastos sintetizen las proteínas, expresen los receptores necesarios y en definitiva, activen todos los mecanismos moleculares que necesitan para embarcarse en determinados programas de diferenciación una vez abandonan su estado proliferativo (especialización de los neoblastos). Debido a que la JNK atenúa la transición entre las fases G2 y M, al inhibir la *JNK*, la progresión del ciclo celular se ve acelerada. Alteraciones en la progresión del ciclo celular se han visto relacionadas con defectos en la diferenciación de células nerviosas y epiteliales (Ali et al., 2011; Zanet et al., 2010). Por lo tanto, esta alteración en la progresión temporal del ciclo de los neoblastos podría ser la causa de la incapacidad de diferenciación de nuevos tejidos que vemos en las planarias *JNK(RNAi)*, ya que estos neoblastos no habrían tenido tiempo suficiente para especializarse. Sin embargo, y una vez más, debido a la naturaleza pleiotrópica de la JNK no podemos afirmar que esta sea la causa principal de la ausencia de diferenciación, ya que las planarias *JNK(RNAi)* también presentan expresión reducida de los genes asociados a la herida y tienen inhibida la respuesta apoptótica inducida en la herida. Un ensayo experimental para confirmar si la aceleración del ciclo celular inhibe la diferenciación, sería producir esta aceleración sin inhibir la JNK. Para ello, habría que identificar y poner a punto el tratamiento con un inhibidor químico de alguna molécula “check-point” durante la transición entre G2 y M.

Un problema que nos plantea nuestro estudio es que el número de células que expresan los genes propuestos como de progenie postmitótica de los neoblastos (*NB.32.g1* y *Agat* entre otros) no varía en comparación con los animales control. De acuerdo con que los animales *JNK(RNAi)* presentan una diferenciación celular muy reducida, esperaríamos ver una disminución en el número de esa supuesta progenie de los neoblastos. Esto tiene dos

explicaciones posibles: i) ninguna conclusión concreta puede extraerse del análisis de expresión de estos genes, ya que no tenemos ninguna información funcional sobre ellos y desconocemos si su expresión define un determinado linaje celular o, si por el contrario, se expresan en todos los neoblastos postmitóticos, y ii) nuestros experimentos durante el decrecimiento nos indican que las células que expresan estos genes mueren por apoptosis, ya que la reducción en el número de estas células que ocurre normalmente durante el decrecimiento, no se observa cuando inhibimos la apoptosis dependiente de JNK. Por lo tanto, la reducción esperada relacionada con los defectos en la diferenciación en los animales *JNK(RNAi)* podría verse enmascarada por el aumento de estas células de progeñe debido a la ausencia de apoptosis.

Finalmente, otra cuestión que nos permite abordar nuestros experimentos de incorporación de CldU es la existencia o no de una subpoblación de neoblastos arrestados en G2, propuesta Saló y Baguñà para explicar la rápida respuesta mitótica observada en planarias (3-6 horas tras la amputación) (Baguñà, 1974; Saló y Baguñà, 1984). Más tarde, Sánchez-Alvarado y Newmark muestran que todos los neoblastos pasan por la fase S del ciclo e incorporan el BrdU al cabo de 2-3 días tras la inyección continuada del análogo del DNA, con lo que concluyen que todos los neoblastos están continuamente dividiéndose y que no existiría una subpoblación de éstos arrestada en G2. Además, combinando el marcaje de entrada en mitosis (pH3) tras la incorporación del BrdU (durante fase S), estiman que la duración de la fase G2 sería de unas 5-6 horas, con lo que no sería necesaria una subpoblación de neoblastos arrestados en G2 para explicar la rápida inducción de la respuesta mitótica (Newmark y Sánchez-Alvarado, 2000). Nuestros resultados de incorporación de CldU muestran que bajo nuestras condiciones experimentales (Figura 62), todas los neoblastos que entran en mitosis a las 6 horas tras la amputación ya habían pasado por la fase S del ciclo, ya que todas las células positivas para pH3, lo son también para CldU. Por lo tanto, estos neoblastos que producen el pico mitótico a las 6 horas no habrían estado arrestados en la fase G2 de su ciclo celular. Sin embargo, ni nuestro ensayo experimental ni los realizados por Sánchez-Alvarado y Newmark descartan la existencia de una subpoblación de neoblastos arrestados en G2, ya que se ha demostrado que tanto el daño producido por la inyección o la alimentación inducirían la entrada en mitosis de los neoblastos (Wagner et al., 2011; Wenemoser y Reddien, 2010). Por lo tanto, si existieran neoblastos arrestados en G2, no los detectaríamos a las 6 horas tras la amputación, ya que, en nuestro caso, habrían entrado

en mitosis previamente, tras la inyección del CldU (10 horas antes del corte) (Figura 62). Además, teniendo en cuenta que el primer pico mitótico comienza ya a las 3 horas tras la amputación (Wenemoser y Reddien, 2010), es muy probable que estos neoblastos arrestados en la fase G2, sean los primeros en entrar en mitosis y no serían igualmente detectados a las 6 horas tras el corte.

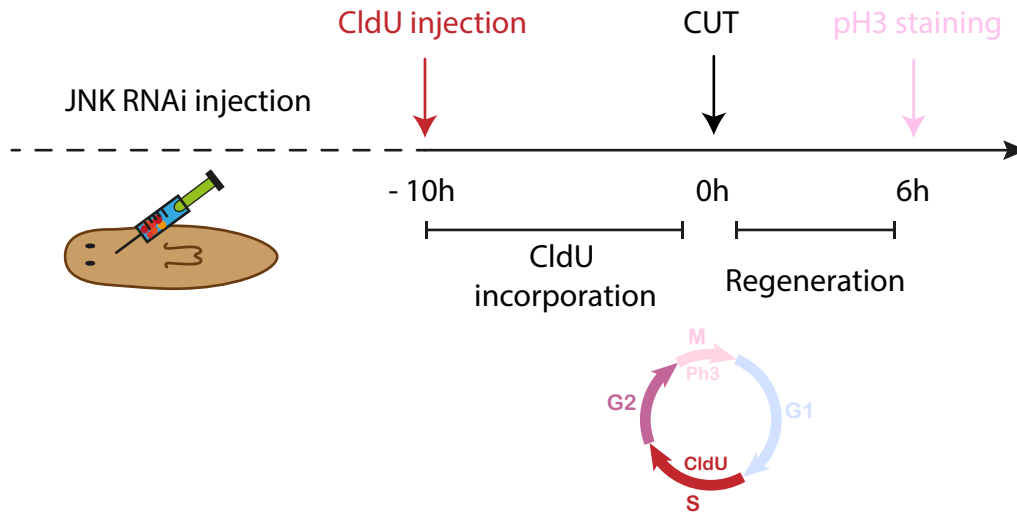


Figura 62: Esquema del ensayo experimental de incorporación de CldU y marcaje con pH3 realizado en Almuedo-Castillo et al., 2014.

Resumiendo, lo que nuestro estudio sugeriría es la necesidad de una progresión temporal controlada del ciclo celular para la correcta especialización de los neoblastos y su diferenciación durante la regeneración.

9. La vía JNK durante el “remodeling”

La vía JNK es necesaria para mantener la proporcionalidad de la planaria, ya que también coordina el recambio tisular que tiene lugar en tejidos preexistentes tras la amputación y durante el decrecimiento tras periodos de ayuno. Este requerimiento está íntimamente ligado a la función pro-apoptótica de la JNK, ya que durante el crecimiento, cuando la muerte celular por apoptosis no es necesaria, la inhibición de la *JNK* no afecta a las proporciones finales del animal.

Debido a la inhibición tan drástica de la apoptosis en las planarias *JNK(RNAi)*, nos sorprendió que estas planarias no fueran más grandes o mostraran sobre-crecimientos. Esto puede explicarse por dos observaciones: i) aunque el tamaño final de las planarias *JNK(RNAi)* es similar al de las planarias control tras periodos de ayuno, observamos que se produce un aumento de la densidad celular en todas las estructuras analizadas, debido a la ausencia de muerte celular y ii) la expresión de *DAP*, un regulador positivo de la autofagia en planarias (González-Estévez et al., 2007) se ve incrementada cuando la apoptosis dependiente de JNK está inhibida durante el decrecimiento y la regeneración (Figura 63A y C). Durante el crecimiento, ya que animales control y *JNK(RNAi)* presentan niveles mínimos de apoptosis similares, no se observan cambios apreciables en la intensidad de la expresión de *DAP* (Figura 63B). Como ya he introducido, la autofagia es necesaria durante la homeóstasis tisular como mecanismo de protección celular o mecanismo alternativo de muerte celular. Por lo tanto, la autofagia puede estar induciéndose para rescatar los niveles de muerte celular necesarios para generar la energía de abastecimiento de ciertos procesos como el de la proliferación de los neoblastos, que no se ve afectado en los animales *JNK(RNAi)*. De hecho, la autofagia se sobre-activa cuando la apoptosis está inhibida no sólo tras la interferencia de la *JNK*, sino también durante el crecimiento normal de la planaria (Figura 63). Esto sugiere que la apoptosis y la autofagia también son dos procesos dependientes y mutuamente regulados en planaria (Chaabane et al., 2013; González-Estévez y Saló, 2010).

Sin embargo, aunque la autofagia pueda estar rescatando parcialmente la inhibición de la apoptosis en los animales *JNK(RNAi)*, esto no es suficiente para rescatar la

proporcionalidad del organismo. Puede ser que los niveles de muerte celular rescatados por el incremento de la autofagia no sean suficientes o que el mecanismo de la apoptosis sea necesario no sólo para generar muerte celular, sino también como mecanismo de señalización celular necesario para coordinar el “remodeling”. Por otro lado, la falta de métodos alternativos de detección de muerte celular, como puede ser la detección de Caspasa-3 activada, nos impiden discernir si la autofagia se está activando como mecanismo de supervivencia celular o de muerte celular.

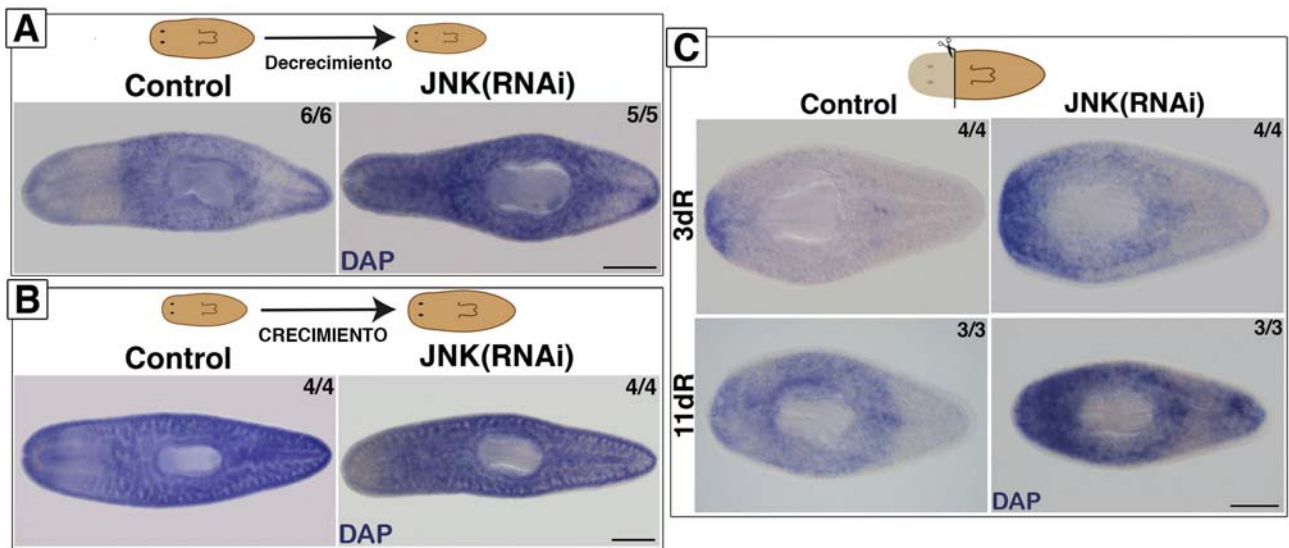


Figura 63: Sobre-activación de la autofagia asociada a la inhibición de la muerte celular por apoptosis. Análisis de expresión de *DAP* durante (A) el decrecimiento, (B) el crecimiento y (C) la regeneración. Anterior, izquierda. Barras de escala, 300 μM.

Aunque la JNK juega un papel esencial durante el “remodeling”, las planarias *JNK(RNAi)* son capaces de crecer y decrecer en respuesta a la ingesta de alimentos o el ayuno, respectivamente. Esto pone en evidencia la existencia de otras vías adicionales encargadas de dirigir estos procesos de crecimiento y decrecimiento en la planaria. Claras candidatas son las vías TOR e Hippo, vías mutuamente reguladas e interdependientes con una función altamente conservada en la regulación del tamaño celular y de los órganos (Dutta y Baehrecke, 2008; Strassburger et al., 2012; Tumaneng et al., 2012). De hecho, al contrario que la JNK, se ha demostrado que componentes de estas vías controlan la proliferación de los neoblastos durante los cambios homeostáticos de crecimiento o decrecimiento y su inhibición sí está relacionada con defectos en el tamaño del organismo y con la formación de sobre-crecimientos (González-Estévez et al., 2012b).

En definitiva, aunque la integración y la comunicación entre la JNK y todas estas vías debe ser necesaria, las vías Hippo y TOR, entre otras, están regulando la proliferación y el crecimiento en planarias, mientras que la apoptosis inducida por la JNK es necesaria para mantener la proporcionalidad del animal y para remodelar los órganos, ya que su inhibición durante el decrecimiento genera la acumulación ectópica de células que se traduce en defectos conformacionales de los órganos.

10. La JNK como un mecanismo de respuesta al estrés a gran escala

La respuesta ante una incisión es muy similar a la respuesta temprana tras una amputación; en ambos casos se produce la activación génica (1-6 horas tras la herida), un pico apoptótico temprano muy localizado en la herida (4 horas tras la herida), así como la inducción del primer pico proliferativo (6 horas tras la herida). Las respuestas más tardías como el segundo pico proliferativo (Wenemoser y Reddien, 2010) y el incremento de la apoptosis necesario para el “remodeling” de los tejidos preexistentes ocurren exclusivamente cuando se ha producido la pérdida de tejidos y estos deben ser regenerados *de novo*.

Sorprendentemente, aunque la respuesta temprana parece ser la misma si ha habido o no falta de tejido, la inhibición de la *JNK* sólo afecta a esta respuesta regenerativa inicial tras una amputación. La *JNK* conserva su función pro-apoptótica en planarias, pero tras una incisión, las respuestas proliferativa y apoptótica no se ven afectadas en los animales *JNK(RNAi)*. Esta observación indica que debe haber mecanismos alternativos independientes de la *JNK* que se activan para hacer frente a la cicatrización de una incisión capaces de inducir la muerte celular por apoptosis.

Otra situación de estrés diferente sería la recuperación tras la irradiación parcial o subletal del animal. La irradiación a bajas dosis provoca la eliminación de una gran parte de la población de neoblastos que más tarde se recuperará (Salvetti et al., 2009; Wagner et al.,

2011). Debido a la eliminación de los neoblastos, la actividad mitótica es prácticamente nula 7 días tras la irradiación parcial (7dPI), pero aumenta considerablemente a los 14dPI ya que la población de los neoblastos ha sido restituida (Figura 64A). La dinámica de esta recuperación es muy similar en animales *JNK(RNAi)*, lo que indica que es independiente de la actividad de la JNK (Figura 64A). A los 3dPI también se produce un aumento de la muerte celular por apoptosis para después volver a niveles basales de muerte celular una vez el animal se ha recuperado (Figura 64B). En los animales *JNK(RNAi)*, la cantidad inicial de muerte celular (0dPI) es mucho menor debido a que la JNK si es necesaria para inducir la apoptosis durante el proceso de decrecimiento y el protocolo de RNAi de la *JNK* previo a la irradiación parcial supone 5 semanas de administración del RNAi en ayunas (Figura 64B). Sin embargo, la dinámica de inducción de la apoptosis en respuesta a la irradiación parcial, ocurre de manera similar en estos animales *JNK(RNAi)* (Figura 64B).

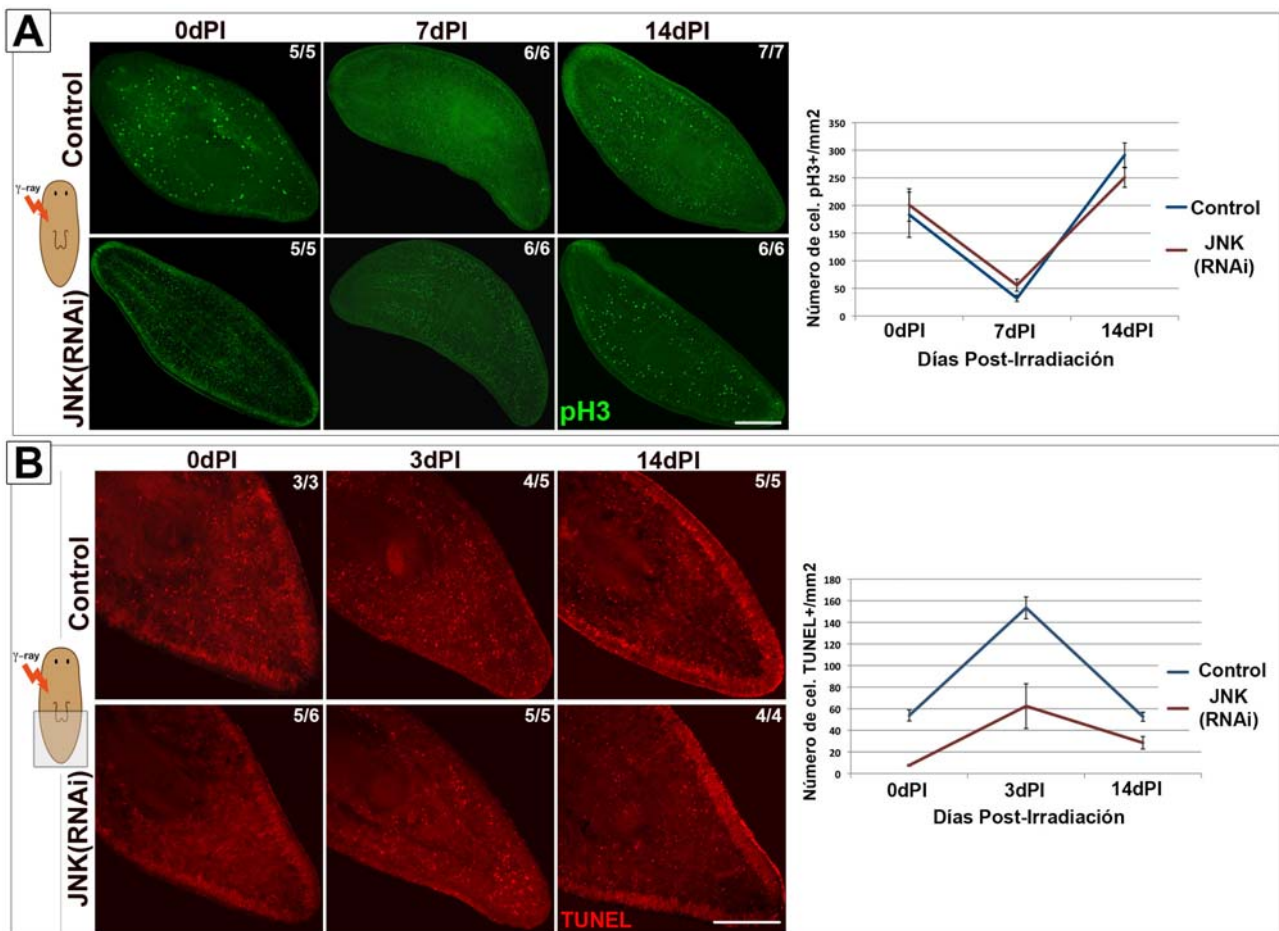


Figura 64: La recuperación tras la irradiación parcial o subletal es independiente de la vía JNK. (A) Análisis de la actividad mitótica de los neoblastos tras la irradiación parcial por inmunohistoquímica con anti-pH3, marcador de entrada en mitosis. La gráfica muestra la densidad del número de células pH3+ (mitóticas) por mm². **(B)** Análisis de la apoptosis tras la irradiación parcial con TUNEL. La gráfica muestra la densidad del número de células TUNEL+ (apoptóticas) por mm². Anterior, arriba/izquierda. Barras de escala, 300 μ M (A) y 200 μ M (B).

Por lo tanto, esto supone otro contexto diferente en el que mecanismos alternativos desencadenan la activación de la maquinaria de apoptosis independientemente de la vía JNK.

El papel de la JNK como atenuador de la transición entre las fases G2 y M del ciclo celular de los neoblastos también sólo se evidencia cuando tejidos nuevos han de ser regenerados. Durante el recambio celular homeostático, cuando la proliferación y la diferenciación ocurren de manera más paulatina y regulada, la tasa proliferativa de los neoblastos no se ve afectada tras el RNAi de la *JNK*. Por lo tanto, esta atenuación entre las fases G2/M dependiente de la JNK es requerida exclusivamente cuando la proliferación de los neoblastos es masiva y debe de estar perfectamente coordinada con su diferenciación a múltiples linajes celulares. Estas observaciones destacan la variedad en la naturaleza molecular de las respuestas inducidas en distintos tipos de situaciones, como son la reparación tras el daño o la eliminación parcial de los neoblastos, el recambio celular homeostático durante el crecimiento o decrecimiento, o la regeneración de tejidos. La implicación funcional de Follistatin exclusivamente cuando una cantidad significativa de tejido ha sido eliminada, apoya nuestras observaciones (Gaviño et al., 2013).

En definitiva, la JNK se activaría específicamente como mecanismo en respuesta al estrés a gran escala en planarias, que serían situaciones en las que se requiere una coordinación exhaustiva entre la proliferación y la diferenciación de nuevos linajes celulares tras la amputación, así como una integración de la inducción de la muerte celular con el mantenimiento de la proporcionalidad de los tejidos preexistentes durante el decrecimiento y la regeneración.

CONCLUSIONES

Las conclusiones principales de esta tesis son:

1. Existe segregación funcional entre los dos parálogos de Dishevelled en planarias, estando Dvl-1 involucrado exclusivamente en garantizar la conexión neuronal mientras que Dvl-2 lo está en la señalización a través de la β -catenin y formando parte del complejo transductor de la PCP.
2. Dvl-2 y otros componentes del complejo de la PCP, como VanGogh y Diversin, controlan la polarización y el posicionamiento de los cuerpos basales ciliares a través de la remodelación del esqueleto de actina.
3. La funcionalidad de la vía Wnt no canónica/PCP está conservada en planarias y por lo tanto demuestra su existencia en un organismo del superphylum de los lophotrocozoa.
4. Wnt5 restringe la migración neuronal para posicionar el sistema nervioso a través de Dishevelled y de su receptor Ror.
5. Wnt5 y Slit forman un sistema en el que mutuamente regulan el establecimiento de sus límites de expresión para así definir un corredor para la regeneración y mantenimiento del sistema nervioso.
6. La JNK induce la expresión génica y la muerte celular a la vez que controla la entrada en mitosis de los neoblastos. La coordinación de estos procesos por parte de la JNK durante la respuesta regenerativa temprana es necesaria para que se produzca la regeneración de nuevos tejidos.
7. La JNK es un mecanismo de respuesta al estrés a gran escala, cuya activación durante la regeneración se requiere exclusivamente para responder a situaciones en las que ha habido falta de tejido.

8. La inducción de la muerte celular apoptótica por parte de la JNK es necesaria para recuperar y mantener tanto las proporciones del organismo como la conformación de los órganos preexistentes tras la amputación o durante el decrecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboobaker, A. A.** (2011). Planarian stem cells: a simple paradigm for regeneration. *Trends Cell Biol* **21**, 304–311.
- Abraham, W., Dragunow, M., y Tate, W.P.** (1991) The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. *Mol Neurobiol* **5**, 297-314.
- Abril, J. F., Cebrià, F., Rodríguez-Esteban, G., Horn, T., Fraguas, S., Calvo, B., Bartscherer, K. y Saló, E.** (2010). Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea*. *BMC Genomics* **11**, 731.
- Adell, T., Cebrià, F. y Saló, E.** (2010). Gradients in planarian regeneration and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000505.
- Adell, T., Saló, E., Boutros, M. y Bartscherer, K.** (2009). Smed-Evi/Wntless is required for β -catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration. *Development*, **136**, 905-910.
- Agata, K., Tanaka, T., Kobayashi, C., Kato, K. y Saitoh, Y.** (2003). Intercalary regeneration in planarians. *Dev Dyn* **226**, 308–316.
- Ali, F., Hindley, C., McDowell, G., Deibler, R., Jones, A., Kirschner, M., Guillemot, F. y Philpott, A.** (2011). Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* **138**, 4267–4277.
- Amura, C. R., Marek, L., Winn, R. A. y Heasley, L. E.** (2005). Inhibited Neurogenesis in JNK1-Deficient Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol* **25**, 10791–10802.
- Anderson, K.V. y Nüsslein-Volhard, C.** (1984). Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* **311**, 223-227.
- Angers, S. y Moon, R.T.** (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 468-477.
- Axelrod, J. D.** (2009). Progress y challenges in understanding planar cell polarity signaling. *Semin Cell Dev Biol* **20**, 964–971.
- Baguña, J.** (2012). The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. *Int J Dev Biol* **56**, 19–37.
- Baguña, J.** (1974). Dramatic mitotic response in planarians after feeding, and a hypothesis for the control mechanism. *J Exp Zool* **190**, 117–122.
- Baguña, J.** (1976). Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. II. Mitotic studies during regeneration, and a possible mechanism of blastema formation. *J Exp Zool* **195**, 65–80.
- Baguña, J. y Ballester, R.** (1978). The nervous system in planarians: Peripheral and gastrodermal plexuses, pharynx innervation, and the relationship between central nervous system structure and the acoelomate organization. *J. Morphol* **155**, 237-252.

- Baguña, J. y Romero, R.** (1981). Quantitative analysis of cells types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia* **84**, 181-194.
- Baguña, J., Saló, E. y Auladell, C.** (1989). Regeneration and pattern formation in planarians III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development* **107**, 77-86.
- Baguña, J., Saló, E., Romero, R., García-Fernández, J., Bueno, D., Muñoz-Marmola, M., Bayascas-Ramírez, J.R., y Casali, A.** (1994). Regeneration and pattern formation in planarians: cells, molecules and genes. *Zool. Sci* **11**, 781-795.
- Baguña, J., Romero, R., Saló, E., Collet, J., Auladell, C., Ribas, M., Riutort, M., García-Fernández, J., Burgaya, F. y Bueno, D.** (1990). Growth, degrowth, and regeneration as developmental phenomena in adult freshwater planarians. In *Experimental Embriology in Aquatic Plant and Animal Organisms*. NATO-ASI Series (Ed. H.J. Marthy). *Plenum. Press., New York* 129-162.
- Baker, K. y Beales, P. L.** (2009). Making sense of cilia in disease: The human ciliopathies. *Am. J. Med. Genet.* **151C**, 281–295.
- Bardeen, C. R. y Baetjer, F. H.** (1904). The inhibitive action of the roentgen rays on regeneration in planarians. *J Exp Zool* **1**, 191–195.
- Bass, M.D., Williamson, R.C., Nunan, R.D., Humphries, J.D., Byron, A., Morgan, M.R., Martin, P. y Humphries, M.J.** (2011). A syndecan-4 hair trigger initiates wound healing through caveolin and RhoG-regulated integrin endocytosis. *Dev Cell* **21**, 681-693.
- Beane, W. S., Morokuma, J., Adams, D. S. y Levin, M.** (2011). A Chemical Genetics Approach Reveals H,K-ATPase-Mediated Membrane Voltage Is Required for Planarian Head Regeneration. *Chemistry & Biology* **18**, 77–89.
- Beane, W. S., Morokuma, J., Lemire, J. M. y Levin, M.** (2013). Bioelectric signaling regulates head and organ size during planarian regeneration. *Development* **140**, 313–322.
- Bergantiños, C., Corominas, M. y Serras, F.** (2010). Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. *Development* **137**, 1169–1179.
- Bergmann, A. y Steller, H.** (2010). Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Science Signaling* **3**, re8.
- Biressi, S. y Rando, T. A.** (2010). Seminars in Cell & Developmental Biology. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 845–854.
- Blassberg, R. A., Felix, D. A., Tejada-Romero, B. y Aboobaker, A. A.** (2013). PBX/extradenticle is required to re-establish axial structures and polarity during planarian regeneration. *Development* **140**, 730–739.
- Blythe, M. J., Kao, D., Malla, S., Rowsell, J., Wilson, R., Evans, D., Jowett, J., Hall, A., Lemay, V., Lam, S., et al.** (2010). A Dual Platform Approach to Transcript Discovery for the Planarian *Schmidtea Mediterranea* to Establish RNAseq for Stem Cell and Regeneration Biology. *PLoS ONE* **5**, e15617.

- Bonuccelli, L., Rossi, L., Lena, A., Scarcelli, V., Rainaldi, G., Evangelista, M., Iacopetti, P., Gremigni, V. y Salvetti, A.** (2010). An RbAp48-like gene regulates adult stem cells in planarians. *J Cell Sci* **123**, 690–698.
- Borovina, A., Superina, S., Voskas, D. y Ciruna, B.** (2010). Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia. *Nature Publishing Group* **12**, 407–412.
- Bosch, M., Serras, F., Martín-Blanco, E. y Baguñà, J.** (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* **280**, 73–86.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. y Mlodzik, M.** (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* **94**, 109–118.
- Bowen, I. D. y Ryder, T. A.** (1974). Cell autolysis and deletion in the planarian *Polycelis tenuis* Iijima. *Cell Tissue Res* **154**, 265–274.
- Brøndsted, H.V.** (1956). Experiments on the time-graded regeneration field in planarians. *Biol Medd Dan Vid Selsk* **23**, 1-39.
- Brøndsted, H.V.** (1969). In *Planarian Regeneration*. Edited by Kerkut GA. *Oxford: Pergamon Press*.
- Brown, M. D. y Sacks, D. B.** (2009). Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell Signal* **21**, 462–469.
- Buchanan, J. W.** (1936). Notes on an American cave flatworm, *Sphalloplana percaeca* (Packard). *Ecology* **17**, 194–211.
- Bueno, D., Baguñà, J. y Romero, R.** (1997). Cell-, tissue-, and position-specific monoclonal antibodies against the planarian *Dugesia* (*Girardia*) *tigrina*. *Histochem Cell Biol* **107**, 139–149.
- Caddy, J., Wilanowski, T., Darido, C., Dworkin, S., Ting, S. B., Zhao, Q., Rank, G., Auden, A., Srivastava, S., Papenfuss, T. A., et al.** (2010). Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway. *Dev Cell* **19**, 138–147.
- Cayuso, J. y Martí, E.** (2005). Morphogens in motion: Growth control of the neural tube. *Journal of Neurobiology* **64**, 376–387.
- Cebrià, F.** (2007). Regenerating the central nervous system: how easy for planarians! *Dev Genes Evol* **217**, 733–748.
- Cebrià, F.** (2008). Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: an immunocytochemical study. *Neurosci Res* **61**, 375–384.
- Cebrià, F. y Newmark, P. A.** (2005). Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. *Development* **132**, 3691–3703.
- Cebrià, F. y Newmark, P. A.** (2007). Morphogenesis defects are associated with abnormal nervous system regeneration following roboA RNAi in planarians. *Development* **134**, 833–837.

- Cebrià, F., Bueno, D., Reigada, S. y Romero, R.** (1999). Intercalary muscle cell renewal in planarian pharynx. *Dev Genes Evol* **209**, 249–253.
- Cebrià, F., Guo, T., Jopek, J. y Newmark, P. A.** (2007). Regeneration and maintenance of the planarian midline is regulated by a slit orthologue. *Dev Biol* **307**, 394–406.
- Cebrià, F., Kobayashi, C., Umesono, Y., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Itoh, M., Taira, M., Sánchez Alvarado, A., et al.** (2002a). FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature* **419**, 620–624.
- Cebrià, F., Kudome, T., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T. y Agata, K.** (2002b). The expression of neural-specific genes reveals the structural and molecular complexity of the planarian central nervous system. *Mech Dev* **116**, 199–204.
- Cebrià, F., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T. y Agata, K.** (2002c). Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev Growth Differ* **44**, 135–146.
- Cebrià, F., Vispo, M., Bueno, D., Carranza, S., Newmark, P. y Romero, R.** (1996). Myosin heavy chain gene in *Dugesia* (G.) *tigrina*: a tool for studying muscle regeneration in planarians. *Int J Dev Biol Suppl* **1**, 177S–178S.
- Cebrià, F., Vispo, M., Newmark, P. A., Bueno, D. y Romero, R.** (1997). Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian *Girardia tigrina*. *Dev Genes Evol* **207**, 306–316.
- Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J. y Łos, M. J.** (2013). Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **61**, 43–58.
- Chandebois, R.** (1979). The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian regeneration I. Blastema emergence. *Dev Growth Differ* **21**, 195–204.
- Chandebois, R.** (1980). The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian regeneration II. Distalization. *Dev Growth Differ* **22**, 693–704.
- Chandebois, R.** (1984). Intercalary regeneration and level interactions in the fresh-water planarian *Dugesia lugubris* I. The anteroposterior system. *Roux's Archives of Developmental Biology* **193**, 149–157.
- Chandebois, R.** (1985a). Intercalary regeneration and level interactions in the fresh-water planarian *Dugesia lugubris* II. Evidence for independent antero-posterior and medio-lateral self-regulating systems. *Roux's Archives of Developmental Biology* **194**, 390–396.
- Chandebois, R.** (1985b). Intercalary regeneration and level interactions in the fresh-water planarian *Dugesia lugubris* III. The peripheral localization of the antero-posterior self-regulating system and the lack of interactions between the dorsal and ventral faces. *Roux's Archives of Developmental Biology* **194**, 397–403.

- Chen, C.-C. G., Wang, I. E. y Reddien, P. W.** (2013). pbx is required for pole and eye regeneration in planarians. *Development* **140**, 719–729.
- Chen, F.** (2012). JNK-Induced Apoptosis, Compensatory Growth, and Cancer Stem Cells. *Cancer Research* **72**, 379–386.
- Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J.-C. y Galliot, B.** (2009). Apoptotic Cells Provide an Unexpected Source of Wnt3 Signaling to Drive Hydra Head Regeneration. *Dev Cell* **17**, 279–289.
- Child, C. M.** (1911). Experimental control of morphogenesis in the regulation of Planaria. *Biol Bull* **20**, 309–331.
- Child, C. M.** (1940). Social integration as a biological process. *The American Naturalist* **74**, 389–397.
- Ciani, L. y Salinas, P. C.** (2005). Signalling in neural development: WNTS in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* **6**, 351–362.
- Clark, C. E. J., Nourse, C. C. y Cooper, H. M.** (2012). The Tangled Web of Non-Canonical Wnt Signalling in Neural Migration. *Neurosignals* **20**, 202–220.
- Collins, J. J., Hou, X., Romanova, E. V., Lambrus, B. G., Miller, C. M., Saberi, A., Sweedler, J. V. y Newmark, P. A.** (2010). Genome-wide analyses reveal a role for Peptide hormones in planarian germline development. *PLoS Biol* **8**, e1000509.
- Coward S.** (1969). Regeneration in planarians: some unre-solved problems and questions. *J Biol Psychol* **11**, 15-19.
- Currie, K. W. y Pearson, B. J.** (2013). Transcription factors *lhx1/5-1* and *pitx* are required for the maintenance and regeneration of serotonergic neurons in planarians. *Development* **140**, 3577–3588.
- Dahmann, C., Oates, A.C. y Brand, M.** (2011). Boundary formation and maintenance in tissue development. *Nat Rev Genet* **12**, 43-55.
- Danwei Huangfu, Aimin Liu, Andrew S Rakeman, Murcia, N. S., Niswander, L. y Anderson, K. V.** (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nat Cell Biol* **426**, 83–87.
- Davis, R. J.** (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239–252.
- De Calisto, J., Araya, C., Marchant, L., Riaz, C. F. y Mayor, R.** (2005). Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development* **132**, 2587–2597.
- De Robertis, E. M.** (2008). Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell* **132**, 185–195.
- De Robertis, E. M.** (2009). Spemann's organizer and the self-regulation of embryonic fields. *Mech Dev* **126**, 925–941.

- Dillman, A. R., Minor, P. J. y Sternberg, P. W.** (2013). Origin and evolution of dishevelled. *G3 (Bethesda)* **3**, 251–262.
- Dubois F y Wolff E.** (1947). Sur une méthode d'irradiation localisé e permettant de mettre en évidence la migration des cellules de régénération chez les planaires. *Société Biol Strasbourg* **141**, 903–906.
- Duncia, J. V., Santella, J. B., Higley, C. A., Pitts, W. J., Wityak, J., Frieze, W. E., Rankin, F. W., Sun, J. H., Earl, R. A., Tabaka, A. C., et al.** (1998). MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **8**, 2839–2844.
- Dutta, S. y Baehrecke, E.H.** (2008) Warts is required for PI3K-regulated growth arrest, autophagy, and autophagic cell death in *Drosophila*. *Curr Biol* **18**, 1466-1475.
- Eisenhoffer, G. T., Kang, H. y Sánchez Alvarado, A.** (2008). Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell* **3**, 327–339.
- Fahmy, O.G. y Fahmy, M.** (1959). New mutants report. *Dros Inf Serv* **33**, 82-94
- Fan, Y. y Bergmann, A.** (2008). Apoptosis-induced compensatory proliferation. The Cell is dead. Long live the Cell! *Trends Cell Biol* **18**, 467–473.
- Felix, D. A. y Aboobaker, A. A.** (2010). The TALE class homeobox gene *Smed-prep* defines the anterior compartment for head regeneration. *PLoS Genet* **6**, 1–8.
- Fernández-Taboada, E., Moritz, S., Zeuschner, D., Stehling, M., Schöler, H. R., Saló, E. y Gentile, L.** (2010). *Smed-SmB*, a member of the *LSm* protein superfamily, is essential for chromatoid body organization and planarian stem cell proliferation. *Development* **137**, 1055–1065.
- Forsthoefel, D. J., James, N. P., Escobar, D. J., Stary, J. M., Vieira, A. P., Waters, F. A. y Newmark, P. A.** (2012). An RNAi screen reveals intestinal regulators of branching morphogenesis, differentiation, and stem cell proliferation in planarians. *Dev Cell* **23**, 691–704.
- Forsthoefel, D. J., Park, A. E. y Newmark, P. A.** (2011). Stem cell-based growth, regeneration, and remodeling of the planarian intestine. *Dev Biol* **1–15**.
- Fradkin, L. G., van Schie, M., Wouda, R. R., de Jong, A., Kamphorst, J. T., Radjkoemar-Bansraj, M. y Noordermeer, J. N.** (2004). The *Drosophila* *Wnt5* protein mediates selective axon fasciculation in the embryonic central nervous system. *Dev Biol* **272**, 362–375.
- Fraguas, S., Barberán, S. y Cebrià, F.** (2011). EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Dev Biol* **354**, 87–101.
- Fraguas, S., Barberán, S., Ibarra, B., Stöger, L. y Cebri, F.** (2012). Regeneration of neuronal cell types in *Schmidtea mediterranea*: an immunohistochemical and expression study. *Int J Dev Biol* **56**, 143–153.

- Friedländer, M., Adamidi, C., Han, T., Lebedeva, S., Isenbarger, T., Hirst, M., Marra, M., Nusbaum, C., Lee, W., Jenkin, J., et al.** (2009). High-resolution profiling and discovery of planarian small RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 11546-11551.
- Fuchs, Y. y Steller, H.** (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**, 742–758.
- Fusaoka, E., Inoue, T., Mineta, K., Agata, K. y Takeuchi, K.** (2006). Structure and function of primitive immunoglobulin superfamily neural cell adhesion molecules: a lesson from studies on planarian. *Genes Cells* **11**, 541–555.
- Galliot, B. y Chera, S.** (2010). The Hydra model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration. *Trends Cell Biol* **20**, 514–523.
- Galloni, M.** (2012). Global irradiation effects, stem cell genes and rare transcripts in the planarian transcriptome. *Int J Dev Biol* **56**, 103–116.
- Gao, B., Song, H., Bishop, K., Elliot, G., Garrett, L., English, M. A., Andre, P., Robinson, J., Sood, R., Minami, Y., et al.** (2011). Wnt Signaling Gradients Establish Planar Cell Polarity by Inducing Vangl2 Phosphorylation through Ror2. *Dev Cell* **20**, 163–176.
- Gao, C. y Chen, Y.-G.** (2010) Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* **22**, 717-727.
- Gao, B.** (2012). Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Curr Top Dev Biol* **101**, 263-295.
- García-Corrales, P. y Gamo, J.** (1988). Ultrastructural changes in the gastrodermal phagocytic cells of the planarian *Dugesia gonocephala* s.l. during food digestion (Plathelminthes). *Zoomorphology* **108**, 109–117.
- Gaviño, M. A. y Reddien, P. W.** (2011). A Bmp/Admp Regulatory Circuit Controls Maintenance and Regeneration of Dorsal-Ventral Polarity in Planarians. *Current Biology* **21**, 294–299.
- Gaviño, M. A., Wenemoser, D., Wang, I. E. y Reddien, P. W.** (2013). Tissue absence initiates regeneration through Follistatin-mediated inhibition of Activin signaling. *Elife* **2**, e00247.
- Glazer, A., Wilkinson, A., Backer, C. B., Lapan, S., Gutzman, J. H., Cheeseman, I. M. y Reddien, P. W.** (2009). The Zn Finger protein Iguana impacts Hedgehog signaling by promoting ciliogenesis. *Dev Biol* **337**, 148-156.
- Goberdhan, D.C. y Wilson, C.** (1998). JNK, cytoskeletal regulator and stress response kinase. A *Drosophila* perspective. *Bioessays* **20**, 1009-1019.
- Goetz, S. C. y Anderson, K. V.** (2010). The primary cilium: a signalling centreduring vertebrate development. *Nat Rev Genet* **11**, 331–344.
- González-Estévez, C. y Saló, E.** (2010). Autophagy and apoptosis in planarians. *Apoptosis* **15**, 279-292.

- González-Estévez, C., Felix, D. A., Aboobaker, A. A. y Saló, E.** (2007). Gtdap-1 promotes autophagy and is required for planarian remodeling during regeneration and starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 13373–13378.
- González-Estévez, C., Felix, D. A., Rodríguez-Esteban, G. y Aboobaker, A. A.** (2012a). Decreased neoblast progeny and increased cell death during starvation-induced planarian degrowth. *Int J Dev Biol* **56**, 83–91.
- González-Estévez, C., Felix, D. A., Smith, M. D., Paps, J., Morley, S. J., James, V., Sharp, T. V. y Aboobaker, A. A.** (2012b). SMG-1 and mTORC1 Act Antagonistically to Regulate Response to Injury and Growth in Planarians. *PLoS Genet* **8**, e1002619.
- González-Sastre, A., Molina, M. D. y Saló, E.** (2012). Inhibitory Smads and bone morphogenetic protein (BMP) modulate anterior photoreceptor cell number during planarian eye regeneration. *Int J Dev Biol* **56**, 155–163.
- Goodrich, L. V.** (2008). The Plane Facts of PCP in the CNS. *Neuron* **60**, 9–16.
- Goodrich, L. V. y Strutt, D.** (2011). Principles of planar polarity in animal development. *Development* **138**, 1877–1892.
- Gray, R. S., Roszko, I. y Solnica-Krezel, L.** (2011). Planar Cell Polarity: Coordinating Morphogenetic Cell Behaviors with Embryonic Polarity. *Dev Cell* **21**, 120–133.
- Gremigni, V. y Miceli, C.** (1980). Cytophotometric evidence for cell “transdifferentiation” in planarian regeneration. *Wilhelm Roux' Archives* **188**, 107–113.
- Gros, J., Hu, J. K.-H., Vinegoni, C., Feruglio, P. F., Weissleder, R. y Tabin, C. J.** (2010). WNT5A/JNK and FGF/MAPK Pathways Regulate the Cellular Events Shaping the Vertebrate Limb Bud. *Curr Biol* **20**, 1993-2002.
- Guder, C., Philipp, I., Lengfeld, T., Watanabe, H., Hobmayer, B. y Holstein, T. W.** (2006). The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* **25**, 7450–7460.
- Guo, T., Peters, A. H. F. M. y Newmark, P. A.** (2006). A bruno-like Gene Is Required for Stem Cell Maintenance in Planarians. *Dev Cell* **11**, 159–169.
- Gurley, K. A. y Sánchez Alvarado, A.** (2008). Stem cells in animal models of regeneration. *StemBook* 1–24.
- Gurley, K. A., Elliott, S. A., Simakov, O., Schmidt, H. A., Holstein, T. W. y Sánchez Alvarado, A.** (2010). Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Dev Biol* **347**, 24-39.
- Gurley, K. A., Rink, J. C. y Sánchez Alvarado, A.** (2008). Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science* **319**, 323–327.
- Haeusgen, W., Boehm, R., Zhao, Y., Herdegen, T. y Waetzig, V.** (2009). Specific activities of individual c-Jun N-terminal kinases in the brain. *NSC* **161**, 951–959.

- Handberg-Thorsager, M. y Saló, E.** (2007). The planarian nanos-like gene *Smednos* is expressed in germline and eye precursor cells during development and regeneration. *Dev Genes Evol* **217**, 403–411.
- Hay, D. y Ball, I.** (1979). Contributions to the Biology of freshwater planarians (Turbellaria) from the Victorian Alps, Australia. *Hydrobiologia* **62**, 137–164.
- Hayashi, T., Asami, M., Higuchi, S., Shibata, N. y Agata, K.** (2006). Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Dev Growth Differ* **48**, 371–380.
- Hayashi, T., Motoishi, M., Yazawa, S., Itomi, K., Tanegashima, C., Nishimura, O., Agata, K. y Tarui, H.** (2011). A LIM-homeobox gene is required for differentiation of Wnt-expressing cells at the posterior end of the planarian body. *Development* **138**, 3679–3688.
- Hayashi, T., Shibata, N., Okumura, R., Kudome, T., Nishimura, O., Tarui, H. y Agata, K.** (2010). Single-cell gene profiling of planarian stem cells using fluorescent activated cell sorting and its “index sorting” function for stem cell research. *Dev Growth Differ* **52**, 131–144.
- Hervé, J.-C. y Derangeon, M.** (2012). Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. *Cell Tissue Res* **352**, 21–31.
- Hirai, S. I., Feng Cui, D., Miyata, T., Ogawa, M., Kiyonari, H., Suda, Y., Aizawa, S., Banba, Y. y Ohno, S.** (2006). The c-Jun N-Terminal Kinase Activator Dual Leucine Zipper Kinase Regulates Axon Growth and Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex. *J Neurosci* **26**, 11992–12002.
- Hoshi, M., Kobayashi, K., Arioka, S., Hase, S. y Matsumoto, M.** (2003). Switch from Asexual to Sexual Reproduction in the Planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Integrative and Comparative Biology* **43**, 242–246.
- Huang, G., Shi, L. Z. y Chi, H.** (2009). Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine* **48**, 161–169.
- Huang, H. y He, X.** (2008). Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 119–125.
- Hyman, L. H.** (1951). North American Triclad Turbellaria. XII. Synopsis of the known species of fresh-water planarians of North America. *Transactions of the American Microscopical Society* **70**, 154–167.
- Iglesias, M., Almuedo-Castillo, M., Aboobaker, A. A. y Saló, E.** (2011). Developmental Biology. *Dev Biol* **358**, 68–78.
- Iglesias, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Saló, E. y Adell, T.** (2008). Silencing of *Smed-betacatenin1* generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* **135**, 1215–1221.
- Ingham, P. W.** (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* **15**, 3059–3087.
- Inoue, T., Hayashi, T., Takechi, K. y Agata, K.** (2007). Clathrin-mediated endocytic signals are required for the regeneration of, as well as homeostasis in, the planarian CNS. *Development* **134**, 1679–1689.

- Ishidate, T., Elewa, A., Kim, S., Mello, C.C. y Shirayama, M.** (2014). Divide and differentiate: CDK/ Cyclins and the art of development. *Cell Cycle* **13**, 1384-1391.
- Jessen, J.R., Topczewski, J., Bingham, S., Sepich, D.S., Marlow, F., Chandrasekhar, A. y Solnica-Krezel, L.** (2002). Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements. *Nat Cell Biol* **4**, 610-615.
- Jiang, H., Patel, P. H., Kohlmaier, A., Grenley, M. O., McEwen, D. G. y Edgar, B. A.** (2009). Cytokine/Jak/Stat Signaling Mediates Regeneration and Homeostasis in the Drosophila Midgut. *Cell* **137**, 1343–1355.
- Kaldis, P. y Richardson, H. E.** (2011). When cell cycle meets development. *Development* **139**, 225–230.
- Kato, K., Orii, H., Watanabe, K. y Agata, K.** (1999). The role of dorsoventral interaction in the onset of planarian regeneration. *Development* **126**, 1031–1040.
- Keller, R., Davidson, L. A. y Shook, D. R.** (2003). How we are shaped: The biomechanics of gastrulation. *Differentiation* **71**, 171–205.
- Kelly, M. y Chen, P.** (2007). Shaping the mammalian auditory sensory organ by the planar cell polarity pathway. *Int J Dev Biol* **51**, 535–547.
- Killeen, M. T. y Sybingco, S. S.** (2008). Netrin, Slit and Wnt receptors allow axons to choose the axis of migration. *Dev Biol* **323**, 143–151.
- Kim, J., Lee, J. E., Heynen-Genel, S., Suyama, E., Ono, K., Lee, K., Ideker, T., Aza-Blanc, P. y Gleeson, J. G.** (2010). Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature* **464**, 1048–1051.
- King, R. S. y Newmark, P. A.** (2012). Beyond the cell: The cell biology of regeneration. *J Cell Biol* **196**, 553–562.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A. y Matsumoto, S.** (2012). Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol (Oxf)* **204**, 17-33.
- Klein, T.J. y Mlodzik, M.** (2005). Planar cell polarization: an emerging model points in the right direction. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 155-76.
- Kobayashi, C., Saito, Y., Ogawa, K. y Agata, K.** (2007). Wnt signaling is required for antero-posterior patterning of the planarian brain. *Dev Biol* **306**, 714–724.
- Kobayashi, C., Watanabe, K. y Agata, K.** (1999). The process of pharynx regeneration in planarians. *Dev Biol* **211**, 27–38.
- Komiya, Y. y Habas, R.** (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**, 68-75.
- Kuan, C.Y., Yang, D.D., Samanta-Roy, D.R., Davis, R.J., Rakic, P. y Flavell, R.A.** (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**, 667–676.

- Kumar, S.** (2006). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* **14**, 32-43.
- Labbé, R. M., Irimia, M., Currie, K. W., Lin, A., Zhu, S. J., Brown, D. D. R., Ross, E. J., Voisin, V., Bader, G. D., Blencowe, B. J., et al.** (2012). A Comparative Transcriptomic Analysis Reveals Conserved Features of Stem Cell Pluripotency in Planarians and Mammals. *Stem Cells* **30**, 1734–1745.
- Lander, A. D.** (2013). How Cells Know Where They Are. *Science* **339**, 923–927.
- Lapan, S. W. y Reddien, P. W.** (2011). dlx and sp6-9 Control Optic Cup Regeneration in a Prototypic Eye. *PLoS Genet* **7**, e1002226.
- Lapan, S. W. y Reddien, P. W.** (2012). Transcriptome Analysis of the Planarian Eye Identifies ovo as a Specific Regulator of Eye Regeneration. *CellReports* **2**, 294-307.
- Lawrence, P. A. y Casal, J.** (2013). The mechanisms of planar cell polarity, growth and the Hippo pathway: some known unknowns. *Dev Biol* **377**, 1–8.
- Lee, P. N., Pang, K., Matus, D. Q. y Martindale, M. Q.** (2006). A WNT of things to come: evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 157–167.
- Lee, P., Kumburegama, S., Marlow, H., Martindale, M. y Wikramanayake, A.** (2007). Asymmetric developmental potential along the animal–vegetal axis in the anthozoan cnidarian, *Nematostella vectensis*, is mediated by Dishevelled. *Dev Biol* **310**, 169–186.
- Lender, T y Gabriel, A.** (1965). Neoblasts labelled with tritiated uridine migrate and construct the regeneration blastema in fresh-water planaria. *C R Hebdomadaires Seances l'Acad Sci* **260**, 4095-4097.
- Levine, B. y Deretic, V.** (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **7**, 767–777.
- Lin, A. Y. T. y Pearson, B. J.** (2014). Planarian yorkie/YAP functions to integrate adult stem cell proliferation, organ homeostasis and maintenance of axial patterning. *Development* **141**, 1197–1208.
- Lim S. y Kaldis P.** (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **140**, 3079-3093.
- Liu, S. Y., Selck, C., Friedrich, B., Lutz, R., Vila-Farré, M., Dahl, A., Brandl, H., Lakshmanaperumal, N., Henry, I. y Rink, J. C.** (2014). Reactivating head regrowth in a regeneration-deficient planarian species. *Nature* **500**, 81–84.
- Love, N. R., Chen, Y., Ishibashi, S., Kritsiligkou, P., Lea, R., Koh, Y., Gallop, J. L., Dorey, K. y Amaya, E.** (2013). Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat Cell Biol* **15**, 222-228.
- Lum, L.** (2004). The Hedgehog Response Network: Sensors, Switches, and Routers. *Science* **304**, 1755–1759.

- Mannini, L., Rossi, L., Deri, P., Gremigni, V., Salvetti, A., Saló, E. y Batistoni, R.** (2004). Djeyes absent (Djeya) controls prototypic planarian eye regeneration by cooperating with the transcription factor Djsix-1. *Dev Biol* **269**, 346–359.
- Marsal, M., Pineda, D. y Saló, E.** (2003). Gtwnt-5 a member of the wnt family expressed in a subpopulation of the nervous system of the planarian *Girardia tigrina*. *Gene Expression Patterns* **3**, 489–495.
- Martín-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. y Martínez-Arias, A.** (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 557–570.
- Martín-Durán, J. M. y Romero, R.** (2011). Evolutionary implications of morphogenesis and molecular patterning of the blind gut in the planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev Biol* **352**, 164–176.
- Martín-Durán, J. M., Monjo, F. y Romero, R.** (2012). Morphological and molecular development of the eyes during embryogenesis of the freshwater planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev Genes Evol* **222**, 45–54.
- März, M., Seebeck, F. y Bartscherer, K.** (2013). A Pitx transcription factor controls the establishment and maintenance of the serotonergic lineage in planarians. *Development* **140**, 4499–4509.
- McKanna, J. A.** (1968). Fine structure of the protonephridial system in planaria I. Flame Cells. *Zeitschrift für Zellforschung* **92**, 509–523.
- Mcneill, H.** (2010). Planar Cell Polarity: Keeping Hairs Straight Is Not So Simple. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003376–a003376.
- Meinhardt, H. y Gierer, A.** (2000). Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *Bioessays* **22**, 753–760.
- Meinhardt, H.** (2004). Different strategies for midline formation in bilaterians. *Nat Rev Neurosci* **5**, 502–510.
- Mikels, A. J. y Nusse, R.** (2006). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* **25**, 7461–7468.
- Miller, C. M. y Newmark, P. A.** (2012). An insulin-like peptide regulates size and adult stem cells in planarians. *Int J Dev Biol* **56**, 75–82.
- Mitchell, B., Stubbs, J. L., Huisman, F., Taborek, P., Yu, C. y Kintner, C.** (2009). The PCP Pathway Instructs the Planar Orientation of Ciliated Cells in the *Xenopus* Larval Skin. *Current Biology* **19**, 924–929.
- Molina, M. D., Neto, A., Maeso, I., Gómez-Skarmeta, J. L., Saló, E. y Cebrià, F.** (2011). Noggin and noggin-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians. *Curr Biol* **21**, 300–305.
- Molina, M. D., Saló, E. y Cebrià, F.** (2007). The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians. *Dev Biol* **311**, 79–94.

- Mollereau, B., Perez-Garijo, A., Bergmann, A., Miura, M., Gerlitz, O., Ryoo, H. D., Steller, H. y Morata, G.** (2012). Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification. *Cell Death Differ* **20**, 181–181.
- Montcouquiol, M., Sans, N., Huss, D., Kach, J., Dickman, J. D., Forge, A., Rachel, R. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Bogani, D., et al.** (2006). Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J Neurosci* **26**, 5265–5275.
- Morgan, L. V.** (1905). Incomplete anterior regeneration in the absence of the brain in *Leptoplana littoralis*. *Biol Bull* **9**, 187–193.
- Morgan, T.** (1904). AN ANALYSIS OF THE PHENOMENA OF ORGANIC “POLARITY..” *Science* **20**, 742–748.
- Morgan, T. H.** (1898). Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. *Dev Genes Evol* **7**, 364–397.
- Moritz, S., Stöckle, F., Ortmeier, C., Schmitz, H., Rodríguez-Esteban, G., Key, G. y Gentile, L.** (2012). Heterogeneity of planarian stem cells in the S/G2/M phase. *Int J Dev Biol* **56**, 117–125.
- Needham, A.E.** (1952). Regeneration and wound-healing. *London: Methuen & Co.*
- Newmark, P. A. y Sánchez Alvarado, A.** (2000). Bromodeoxyuridine Specifically Labels the Regenerative Stem Cells of Planarians. *Dev Biol* **220**, 142–153.
- Niehrs, C.** (2010). On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes. *Development* **137**, 845–857.
- Niehrs, C.** (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Publishing Group* **13**, 767–779.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Sano, S., Yoshimoto, K., Inden, M., Takata, K., Taniguchi, T., Shimohama, S., et al.** (2007a). Reconstruction of dopaminergic neural network and locomotion function in planarian regenerates. *Dev Neurobiol* **67**, 1059–1078.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Yoshimoto, K., Takeuchi, K., Taniguchi, T. y Agata, K.** (2007b). Identification and distribution of tryptophan hydroxylase (TPH)-positive neurons in the planarian *Dugesia japonica*. *Neurosci Res* **59**, 101–106.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Yoshimoto, K., Taniguchi, T. y Agata, K.** (2008a). Characterization of tyramine β -hydroxylase in planarian *Dugesia japonica*: Cloning and expression. *Neurochemistry International* **53**, 184–192.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Umesono, Y., Takeuchi, K., Takata, K., Taniguchi, T. y Agata, K.** (2008b). Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience* **153**, 1103–1114.
- Nogi, T. y Levin, M.** (2005). Characterization of innexin gene expression and functional roles of gap-junctional communication in planarian regeneration. *Dev Biol* **287**, 314–335.

- Oh, H. y Irvine, K. D.** (2010). Yorkie: the final destination of Hippo signaling. *Trends Cell Biol* **20**, 410–417.
- Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G. C., et al.** (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. 1–10.
- Okamoto, K., Takeuchi, K. y Agata, K.** (2005). Neural projections in planarian brain revealed by fluorescent dye tracing. *Zool Sci* **22**, 535–546.
- Oldham, S. y Hafen, E.** (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol* **13**, 79–85.
- Onal, P., Grün, D., Adamidi, C., Rybak, A., Solana, J., Mastrobuoni, G., Wang, Y., Rahn, H.-P., Chen, W., Kempa, S., et al.** (2012). Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *The EMBO Journal* **31**, 2755–2769.
- Orii, H. y Watanabe, K.** (2007). Bone morphogenetic protein is required for dorso-ventral patterning in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Growth Differ* **49**, 345–349.
- Oviedo, N. J. y Levin, M.** (2007). smedinx-11 is a planarian stem cell gap junction gene required for regeneration and homeostasis. *Development* **134**, 3121–3131.
- Oviedo, N. J., Morokuma, J., Walentek, P., Kema, I. P., Gu, M. B., Ahn, J.-M., Hwang, J. S., Gojobori, T. y Levin, M.** (2010). Long-range Neural and Gap Junction Protein-mediated Cues Control Polarity During Planarian Regeneration. *Dev Biol* **339**, 188-199.
- Oviedo, N.J., Pearson, B.J., Levin, M. y Sánchez Alvarado, A.** (2008). Planarian PTEN homologs regulate stem cells and regeneration through TOR signaling. *Dis Model Mech* **1**, 131-143.
- Pallas, P.S.** (1774) *Spicilegia zoologica : quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque commentariis illustrantur.* Berolini Prostant apud *Gottl.*
- Park, T. J., Mitchell, B. J., Abitua, P. B., Kintner, C. y Wallingford, J. B.** (2008). Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat Genet* **40**, 871–879.
- Pascolini, R., Tei, S., Vagnetti, D. y Bondi, C.** (1984). Epidermal cell migration during wound healing in *Dugesia lugubris*. Observations based on scanning electron microscopy and treatment with cytochalasin. *Cell Tissue Res* **236**, 345–349.
- Pearson, B. J. y Alvarado, A. S.** (2010). A planarian p53 homolog regulates proliferation and self-renewal in adult stem cell lineages. *Development* **137**, 213–221.
- Pearson, B., Eisenhoffer, G., Gurley, K., Rink, J., Miller, D. y Sánchez Alvarado, A.** (2009). Formaldehyde-based whole-mount in situ hybridization method for planarians. *Dev Dyn* **238**, 443–450.

- Peiris, T. H., Weckerle, F., Ozamoto, E., Ramirez, D., Davidian, D., Garcia-Ojeda, M. E. y Oviedo, N. J.** (2012). TOR signaling regulates planarian stem cells and controls localized and organismal growth. *J Cell Sci* **125**, 1657–1665.
- Pellettieri, J., Fitzgerald, P., Watanabe, S., Mancuso, J., Green, D. R. y Sánchez Alvarado, A.** (2009). Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev Biol* **338**, 76-85.
- Peréz-Garijo, A., Shlevkov, E. y Morata, G.** (2009). The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc. *Development* **136**, 1169–1177.
- Petersen, C. P. y Reddien, P. W.** (2008a). Smed-betacatenin-1 is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. *Science* **319**, 327–330.
- Petersen, C. P. y Reddien, P. W.** (2009a). A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 17061–17066.
- Petersen, C. P. y Reddien, P. W.** (2009b). Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* **139**, 1056–1068.
- Petersen, C. P. y Reddien, P. W.** (2011). Polarized notum activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration. *Science* **332**, 852–855.
- Pineda, D., Gonzalez, J., Callaerts, P., Ikeo, K., Gehring, W. J. y Salo, E.** (2000). Searching for the prototypic eye genetic network: *Sine oculis* is essential for eye regeneration in planarians. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4525–4529.
- Pineda, D., Rossi, L., Batistoni, R., Salvetti, A., Marsal, M., Gremigni, V., Falleni, A., Gonzalez-Linares, J., Deri, P. y Saló, E.** (2002). The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax6 independent. *Development* **129**, 1423–1434.
- Quesada-Hernández, E., Caneparo, L., Schneider, S., Winkler, S., Liebling, M., Fraser, S.E. y Heisenberg, C.P.** (2010). Stereotypical cell division orientation controls neural Rod midline formation in zebrafish. *Curr Biol* **20**, 1966-1972.
- Rämet, M., Lanot, R., Zachary, D. y Manfruelli, P.** (2002). JNK Signaling Pathway Is Required for Efficient Wound Healing in *Drosophila*. *Dev Biol* **241**, 145–156.
- Randolph, H.** (1891). Regeneration of the tail in *Lumbriculus*. *Zool Anzeiger* **14**, 154-156.
- Randolph, H.** (1892). The regeneration of the tail in *Lumbriculus*. *J Morphol* **7**, 317–344.
- Reddien, P. W.** (2011). Constitutive gene expression and the specification of tissue identity in adult planarian biology. *Trends in Genetics* **27**, 277–285.
- Reddien, P. W.** (2013). Specialized progenitors and regeneration. *Development* **140**, 951–957.
- Reddien, P. W. y Alvarado, A. S.** (2004). FUNDAMENTALS OF PLANARIAN REGENERATION. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 725–757.

- Reddien, P. W., Bermange, A. L., Kicza, A. M. y Sánchez Alvarado, A.** (2007). BMP signaling regulates the dorsal planarian midline and is needed for asymmetric regeneration. *Development* **134**, 4043–4051.
- Reddien, P. W., Bermange, A. L., Murfitt, K. J., Jennings, J. R. y Sánchez Alvarado, A.** (2005a). Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Dev Cell* **8**, 635–649.
- Reddien, P. W., Oviedo, N. J., Jennings, J. R., Jenkin, J. C. y Sánchez Alvarado, A.** (2005b). SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* **310**, 1327–1330.
- Repiso, A., Bergantiños, C., Corominas, M. y Serras, F.** (2011). Tissue repair and regeneration in *Drosophila* imaginal discs. *Dev Growth Differ* **53**, 177–185.
- Resch, A. M., Palakodeti, D., Lu, Y.-C., Horowitz, M. y Graveley, B. R.** (2012). Transcriptome Analysis Reveals Strain-Specific and Conserved Stemness Genes in *Schmidtea mediterranea*. *PLoS ONE* **7**, e34447.
- Reuter, M., Gustafsson, M.K., Sheiman, I.M., Terenina, N., Halton, D.W., Maule, A.G. y Shaw, C.** (1995). The nervous system of Tricladida. II. Neuroanatomy of *Dugesia tigrina* (Paludicola, Dugesiiidae): an immunocytochemical study. *Invert Neurosci* **1**, 133-143.
- Reversade, B. y De Robertis, E. M.** (2005). Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at opposite embryonic poles generates a self-regulating morphogenetic field. *Cell* **123**, 1147–1160.
- Riddiford, N. y Olson, P. D.** (2011). Wnt gene loss in flatworms. *Dev Genes Evol.* **221**, 187-197.
- Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A. y Hafen, E.** (1996). The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* **10**, 2759–2768.
- Rink, J. C.** (2012). Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev Genes Evol.* **223**, 67-84.
- Rink, J. C., Gurley, K. A., Elliott, S. A. y Sánchez Alvarado, A.** (2009). Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia. *Science* **326**, 1406–1410.
- Rink, J. C., Vu, H. T.-K. y Alvarado, A. S.** (2011). The maintenance and regeneration of the planarian excretory system are regulated by EGFR signaling. *Development* **138**, 3769–3780.
- Ríos-Barrera, L. D. y Riesgo-Escovar, J. R.** (2012). Regulating cell morphogenesis: The drosophila jun N-terminal kinase pathway. *Genesis* **51**, 147–162.
- Roberts-Galbraith, R. H. y Newmark, P. A.** (2013). Follistatin antagonizes Activin signaling and acts with Notum to direct planarian head regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **110**, 1363-1368.
- Rompolas, P., Patel-King, R. S. y King, S. M.** (2010). An outer arm Dynein conformational switch is required for metachronal synchrony of motile cilia in planaria. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3669–3679.

- Rompolas, P., SPatel-King, R. y King, S. M.** (2009). Chapter 4 - Schmidtea mediterranea: A Model System for Analysis of Motile Cilia. *Methods in Cell Biology* **93**, 81–98.
- Rouhana, L., Shibata, N. y Agata, K.** (2010). Different requirements for conserved post-transcriptional regulators in planarian regeneration and stem cell maintenance. *Dev Biol* **341**, 429-443.
- Rouhana, L., Vieira, A. P., Roberts-Galbraith, R. H. y Newmark, P. A.** (2012). PRMT5 and the role of symmetrical dimethylarginine in chromatoid bodies of planarian stem cells. *Development* **139**, 1083–1094.
- Ryoo, H. D., Gorenc, T. y Steller, H.** (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* **7**, 491–501.
- Sakai, F., Agata, K., Orii, H. y Watanabe, K.** (2000). Organization and regeneration ability of spontaneous supernumerary eyes in planarians -eye regeneration field and pathway selection by optic nerves. *Zool Sci* **17**, 375–381.
- Saló, E.** (2006). The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *BioEssays* **28**, 546–559.
- Saló, E. y Baguñà, J.** (1985). Proximal and distal transformation during intercalary regeneration in the planaria *Dugesia(S)mediterranea*. *Roux's Arch Dev Biol* **194**, 364-368.
- Saló, E. y Baguñà, J.** (1984). Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *J Embryol Exp Morphol* **83**, 63–80.
- Saló, E., Pineda, D., Marsal, M., Gonzalez, J., Gremigni, V. y Batistoni, R.** (2002). Genetic network of the eye in Platyhelminthes: expression and functional analysis of some players during planarian regeneration. *Gene* **287**, 67–74.
- Salvetti, A.** (2005). DjPum, a homologue of Drosophila Pumilio, is essential to planarian stem cell maintenance. *Development* **132**, 1863–1874.
- Salvetti, A., Rossi, L., Bonuccelli, L., Lena, A., Pugliesi, C., Rainaldi, G., Evangelista, M. y Gremigni, V.** (2009). Developmental Biology. *Dev Biol* **328**, 305–314.
- Salvetti, A., Rossi, L., Deri, P. y Batistoni, R.** (2000). An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians. *Dev Dyn* **218**, 603–614.
- Sandmann, T., Vogg, M. C., Owlarn, S., Boutros, M. y Bartscherer, K.** (2011). The head-regeneration transcriptome of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Genome Biology* **12**, R76.
- Sato, K., Shibata, N., Orii, H., Amikura, R., Sakurai, T., Agata, K., Kobayashi, S. y Watanabe, K.** (2006). Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of nanos-related gene in planarians. *Dev Growth Differ* **48**, 615–628.

- Sato, T., Torashima, T., Sugihara, K., Hirai, H., Asano, M. y Yoshioka, K.** (2008). The scaffold protein JSAP1 regulates proliferation and differentiation of cerebellar granule cell precursors by modulating JNK signaling. *Mol Cell Neurosci* **39**, 569-578.
- Sánchez Alvarado, A. y Newmark, P. A.** (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 5049–5054.
- Sánchez Alvarado, A., Newmark, P. A., Robb, S. M. y Juste, R.** (2002). The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development* **129**, 5659–5665.
- Schambony, A. y Wedlich, D.** (2007). Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* **12**, 779-92.
- Schilt, J.** (1970). Induction expérimentale d'excroissances par des greffes hétéropolaires chez la planarie *Dugesia lugubris* o. schmidt. *Ann. Embryol. Morph.* **3**, 93-106.
- Schürmann, W. y Peter, R.** (1998). Inhibition of regeneration in the planarian *Dugesia polychroa* (Schmidt) by treatment with magnesium chloride: a morphological study of wound closure. *Hydrobiologia* **383**, 111–116.
- Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P. J. G., Kikuchi, A., Higuchi, Y. y Bienz, M.** (2007). The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 484–492.
- Scimone, M. L., Lapan, S. W. y Reddien, P. W.** (2014). A forkhead Transcription Factor Is Wound-Induced at the Planarian Midline and Required for Anterior Pole Regeneration. *PLoS Genet* **10**, e1003999.
- Scimone, M. L., Meisel, J. y Reddien, P. W.** (2010). The Mi-2-like *Smed-CHD4* gene is required for stem cell differentiation in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Development*.
- Scimone, M. L., Srivastava, M., Bell, G. W. y Reddien, P. W.** (2011). A regulatory program for excretory system regeneration in planarians. *Development* **138**, 4387–4398.
- Sepich, D.S., Usmani, M., Pawlicki, S. y Solnica-Krezel, L.** (2011). Wnt/PCP signaling controls intracellular position of MTOCs during gastrulation convergence and extension movements. *Development* **138**, 543-552.
- Shaw, T. J. y Martin, P.** (2009). Wound repair at a glance. *J Cell Sci* **122**, 3209–3213.
- Shi, L., Chang, Y., Yang, Y., Zhang, Y., Yu, F.S. y Wu, X.** (2012). Activation of JNK signaling mediates connective tissue growth factor expression and scar formation in corneal wound healing. *PLoS One* **7**, e32128.
- Shibata, N., Hayashi, T., Fukumura, R., Fujii, J., Kudome-Takamatsu, T., Nishimura, O., Sano, S., Son, F., Suzuki, N., Araki, R., et al.** (2012). Comprehensive gene expression analyses in pluripotent stem cells of a planarian, *Dugesia japonica*. *Int J Dev Biol* **56**, 93–102.

- Shibata, N., Rouhana, L. y Agata, K.** (2010). Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Dev Growth Differ* **52**, 27–41.
- Shibata, N., Umesono, Y., Orii, H., Sakurai, T., Watanabe, K. y Agata, K.** (1999). Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Dev Biol* **206**, 73–87.
- Sikes, J. M. y Newmark, P. A.** (2014). nature12403. *Nature* **500**, 77–80.
- Smales, L. R. y Blankespoor, H. D.** (1978). The epidermis and sensory organs of *Dugesia tigrina* (Turbellaria: Tricladida). A scanning electron microscope study. *Cell Tissue Res* **193**, 35–40.
- Smith-Bolton, R. K., Worley, M. I., Kanda, H. y Hariharan, I. K.** (2009). Regenerative Growth in *Drosophila* Imaginal Discs Is Regulated by Wingless and Myc. *Dev Cell* **16**, 797–809.
- Solana, J., Kao, D., Mihaylova, Y., Jaber-Hijazi, F., Malla, S., Wilson, R. y Aboobaker, A.** (2012). Defining the molecular profile of planarian pluripotent stem cells using a combinatorial RNA-seq, RNA interference and irradiation approach. *Genome Biology* **13**, R19.
- Solana, J., Lasko, P. y Romero, R.** (2009). Spoltud-1 is a chromatoid body component required for planarian long-term stem cell self-renewal. *Dev Biol* **328**, 410–421.
- Steller, H.** (2008). Regulation of apoptosis in *Drosophila*. *Cell Death Differ* **15**, 1132–1138.
- Stéphan-Dubois.** (1965). Les néoblasts dans la régénération chez les planaires. *Amsterdam: North-Holland Publishing Company.*
- Straßburger, K., Tiebe, M., Pinna, F., Breuhahn, K. y Teleman, A.A.** (2012). Insulin/IGF signaling drives cell proliferation in part via Yorkie/YAP. *Dev Biol* **367**, 187-196.
- Sun, G. y Irvine, K. D.** (2011). Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. *Dev Biol* **350**, 139–151.
- Takahashi, K. y Yamanaka, S.** (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676.
- Tanaka, E. M. y Reddien, P. W.** (2011). The Cellular Basis for Animal Regeneration. *Dev Cell* **21**, 172–185.
- Tasaki, J., Shibata, N., Nishimura, O., Itomi, K., Tabata, Y., Son, F., Suzuki, N., Araki, R., Abe, M., Agata, K., et al.** (2011a). ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development* **138**, 2417–2427.
- Tasaki, J., Shibata, N., Sakurai, T., Agata, K. y Umesono, Y.** (2011b). Role of c-Jun N-terminal kinase activation in blastema formation during planarian regeneration. *Dev Growth Differ* **53**, 389–400.
- Thomson, T. y Lin, H.** (2009). The Biogenesis and Function of PIWI Proteins and piRNAs: Progress and Prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 355–376.
- Tissir, F. y Goffinet, A. M.** (2010). Planar cell polarity signaling in neural development. *Current Opinion in Neurobiology* **20**, 572–577.

- Tu, K. C., Pearson, B. J. y Alvarado, A. S.** (2012). Developmental Biology. *Dev Biol* **365**, 458–469.
- Tumaneng, K., Russell, R. C. y Guan, K.-L.** (2012). Organ Size Control by Hippo and TOR Pathways. *Current Biology* **22**, R368–R379.
- Umesono, Y., Tasaki, J., Nishimura, Y., Hroudá, M., Kawaguchi, E., Yazawa, S., Nishimura, O., Hosoda, K., Inoue, T. y Agata, K.** (2014). The molecular logic for planarian regeneration along the anterior–posterior axis. *Nature* **500**, 73–76.
- Umesono, Y., Watanabe, K. y Agata, K.** (1999). Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes. *Dev Genes Evol* **209**, 31–39.
- van Amerongen, R. y Nusse, R.** (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**, 3205–3214.
- Veeman, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Louie, S. H. y Moon, R. T.** (2003). Zebrafish Prickle, a Modulator of Noncanonical Wnt/Fz Signaling, Regulates Gastrulation Movements. *Current Biology* **13**, 680–685.
- Vivancos, V., Chen, P., Spassky, N., Qian, D., Dabdoub, A., Kelley, M., Studer, M. y Guthrie, S.** (2009). Wnt activity guides facial branchiomotor neuron migration, and involves the PCP pathway and JNK and ROCK kinases. *Neural Dev* **4**, 7.
- Vladar, E. K., Antic, D. y Axelrod, J. D.** (2009). Planar Cell Polarity Signaling: The Developing Cell's Compass. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a002964–a002964.
- Vriz, S., Reiter, S. y Galliot, B.** (2014). Cell death: a program to regenerate. *Curr Top Dev Biol* **108**, 121–151.
- Wagner, D. E., Ho, J. J. y Reddien, P. W.** (2012). Genetic Regulators of a Pluripotent Adult Stem Cell System in Planarians Identified by RNAi and Clonal Analysis. *Stem Cell* **10**, 299–311.
- Wagner, D. E., Wang, I. E. y Reddien, P. W.** (2011). Clonogenic Neoblasts Are Pluripotent Adult Stem Cells That Underlie Planarian Regeneration. *Science* **332**, 811–816.
- Wallingford, J. B.** (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* **132**, 4421–4436.
- Wallingford, J.B.** (2010). Planar cell polarity signaling, cilia and polarized ciliary beating. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 597–604.
- Wallingford, J. B. y Mitchell, B.** (2011). Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. *Genes Dev* **25**, 201–213.
- Wallingford, J. B., Fraser, S. E. y Harland, R. M.** (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell* **2**, 695–706.
- Wang, Y., Stary, J. M., Wilhelm, J. E. y Newmark, P. A.** (2010). A functional genomic screen in planarians identifies novel regulators of germ cell development. *Genes Dev* **24**, 2081–2092.

- Wang, Y., Zayas, R. M., Guo, T. y Newmark, P. A.** (2007). nanos function is essential for development and regeneration of planarian germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 5901–5906.
- Weber, U., Gault, W.J., Olguin, P., Serysheva, E. y Mlodzik, M.** (2012). Novel regulators of planar cell polarity: a genetic analysis in *Drosophila*. *Genetics* **191**, 145-162.
- Wenemoser, D. y Reddien, P. W.** (2010). Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev Biol* **344**, 979–991.
- Wenemoser, D., Lapan, S. W., Wilkinson, A. W., Bell, G. W. y Reddien, P. W.** (2012). A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes Dev* **26**, 988–1002.
- Wharton, K. A., Jr.** (2003). Runnin' with the Dvl: Proteins That Associate with Dsh/Dvl and Their Significance to Wnt Signal Transduction. *Dev Biol* **253**, 1–17.
- Witchley, J. N., Mayer, M., Wagner, D. E., Owen, J. H. y Reddien, P. W.** (2013). Muscle Cells Provide Instructions for Planarian Regeneration. *CellReports* **4**, 633–641.
- Wolff E.** (1961). Migrations et contacts cellulaires dans la régénération. *Exper Cell Res* **8**, 246-259.
- Woodruff, L.S. y Burnett, A.L.** (1965). The origin of the blastemal cells in *Dugesia tigrina*. *Exper Cell Res* **38**, 295-305.
- Wu, J., Jenny, A., Mirkovic, I. y Mlodzik, M.** (2008). Frizzled-Dishevelled signaling specificity outcome can be modulated by Diego in *Drosophila*. *Mech Dev* **125**, 30–42.
- Wu, J., Roman, A.-C., Carvajal-Gonzalez, J. M. y Mlodzik, M.** (2013). Wg and Wnt4 provide long-range directional input to planar cell polarity orientation in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **15**, 1045–1055.
- Yamanaka, H., Moriguchi, T., Masuyama, N., Kusakabe, M., Hanafusa, H., Takada, R., Takada, S. y Nishida, E.** (2002). JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *Nature Publishing Group* **3**, 69–75.
- Yazawa, S., Umesono, Y., Hayashi, T., Tarui, H. y Agata, K.** (2009). Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 22329–22334.
- Zakin, L. y De Robertis, E. M.** (2010). Extracellular regulation of BMP signaling. *Curr Biol* **20**, R89–92.
- Zanet, J., Freije, A., Ruiz, M., Coulon, V., Sanz, J.R., Chiesa, J. y Gandarillas, A.** (2010). A mitosis block links active cell cycle with human epidermal differentiation and results in endoreplication. *PLoS One* **5**, e15701.
- Zhang, D., Chan, J. D., Nogi, T. y Marchant, J. S.** (2011). Opposing Roles of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels in Neuronal Control of Regenerative Patterning. *J Neurosci* **31**, 15983–15995.

ANEXOS

Anexo 1

Artículo 4:

“Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by Wnt/ β -catenin pathway”

Marta Iglesias, **María Almuedo-Castillo**, A. Aziz Aboobaker y Emili Saló.

Developmental Biology, 358: 68-78

Índice de impacto (2012): 3,868

Resumen en castellano:

La regeneración temprana del cerebro de planarias es independiente de la polaridad del blastema mediada por la vía Wnt/ β -catenin

El análisis de la regeneración del eje Antero-Posterior (AP) durante la regeneración de planarias ha revelado que la vía Wnt/ β -catenin se requiere para especificar la identidad posterior y que la vía del receptor “FGF-like” *Nou-darake* parece estar restringiendo la diferenciación del cerebro a regiones anteriores. Sin embargo, se desconoce la naturaleza de la relación entre el establecimiento de la identidad AP y la correcta morfogénesis del cerebro. En este trabajo se muestra la caracterización funcional de las Axins de planarias (*Smed-axin-A* y *Smed-axin-B*), componentes del complejo de destrucción de la β -catenin y por lo tanto, reguladores negativos de esta. El silenciamiento de estos dos genes a través de la interferencia con dsRNA (RNAi) produce la pérdida de identidad anterior de las planarias regenerantes, generándose planarias con dos colas (“two-tailed”), un fenotipo ya descrito durante la inhibición de APC, otro componente del complejo de destrucción de la β -catenin. Además, observamos que aunque el crecimiento posterior del cerebro no tiene lugar, la formación de los primordios cerebrales no se inhibe a pesar de la identidad posterior del blastema regenerante en las planarias *axins-A/B(RNAi)* o *APC(RNAi)*. Estas observaciones sugieren que los mecanismos que determinan identidad anterior y los que inducen la diferenciación de células del cerebro son en cierta medida independientes. Finalmente, mostramos que la expansión posterior del cerebro observado en las planarias *ndk(RNAi)* se ve acentuado por el silenciamiento de APC, sugiriendo una relación indirecta entre los sistemas de señalización de Wnt/ β -catenin y de FGFR/Ndk durante el establecimiento de los límites de la diferenciación del cerebro.



Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by the Wnt/ β -catenin pathway

Marta Iglesias^{a,*}, Maria Almuedo-Castillo^a, A. Aziz Aboobaker^b, Emili Saló^{a,*}

^a Department of Genetics and Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Catalonia, Spain

^b Centre for Genetics and Genomics, Queen's Medical Centre, University of Nottingham, Nottingham, NG7 2UH, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received for publication 24 December 2010

Revised 9 June 2011

Accepted 8 July 2011

Available online 20 July 2011

Keywords:

Regeneration

Planarian

AP polarity

Brain

Wnt/ β -catenin signaling

Axin

ABSTRACT

Analysis of anteroposterior (AP) axis specification in regenerating planarian flatworms has shown that Wnt/ β -catenin signaling is required for posterior specification and that the FGF-like receptor molecule *nou-darake* (*ndk*) may be involved in restricting brain regeneration to anterior regions. The relationship between re-establishment of AP identity and correct morphogenesis of the brain is, however, still poorly understood. Here we report the characterization of two *axin* paralogs in the planarian *Schmidtea mediterranea*. Although Axins are well known negative regulators of Wnt/ β -catenin signaling, no role in AP specification has previously been reported for *axin* genes in planarians. We show that silencing of *Smed-axin* genes by RNA interference (RNAi) results in two-tailed planarians, a phenotype previously reported after silencing of *Smed-APC-1*, another β -catenin inhibitor. More strikingly, we show for the first time that while early brain formation at anterior wounds remains unaffected, subsequent development of the brain is blocked in the two-tailed planarians generated after silencing of *Smed-axin* genes and *Smed-APC-1*. These findings suggest that the mechanisms underlying early brain formation can be uncoupled from the specification of AP identity by the Wnt/ β -catenin pathway. Finally, the posterior expansion of the brain observed following *Smed-ndk* RNAi is enhanced by silencing *Smed-APC-1*, revealing an indirect relationship between the FGFR/*Ndk* and Wnt/ β -catenin signaling systems in establishing the posterior limits of brain differentiation.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The ability of adult animals to functionally restore missing structures varies in degree across the animal kingdom. One of the most striking examples of regenerative capacity is found in planarian flatworms, which are capable of regenerating a whole organism from a small piece of almost any part of their body. After amputation, planarian neoblasts (adult stem cells) proliferate to give rise to a mass of unpigmented tissue called the blastema, where the missing parts will differentiate. In addition, remodeling of pre-existing tissues (a phenomenon termed morphallaxis, Morgan, 1901) is required to integrate the new and old tissues thereby properly restoring the new body proportions (for reviews see Agata, 2003; Cebrià et al., 2002a; Newmark and Sanchez Alvarado, 2002; Reddien and Sanchez Alvarado, 2004; Saló, 2006; Sanchez Alvarado, 2006). Since TH Morgan's classical works at the beginning of the 20th century, many scientists have sought to understand how the anterior–posterior (AP) axis is re-established during planarian regeneration. After amputation of the head and tail of a planarian,

the remaining tissue is able to register which tissue is missing and activate mechanisms to re-establish axial polarity and differentiate head and tail structures at the anterior and posterior wounds respectively.

The canonical Wnt signaling pathway is an evolutionarily conserved mechanism generally used during metazoan development to promote posterior polarized features of the AP axis (Petersen and Reddien, 2009a). Its main function at the level of signal transduction is to regulate the stability of the transcriptional coactivator β -catenin, the key downstream effector. In the absence of Wnt ligand stimulation, cytoplasmic β -catenin is constitutively targeted for degradation by the action of a multiprotein destruction complex containing the scaffolding protein Axin, Adenomatous Polyposis Coli (APC), Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. Wnt ligand inactivation of the β -catenin destruction complex stabilizes β -catenin, which accumulates and translocates to the nucleus where, together with T-cell factor/Lymphoid enhancer factor proteins, it activates target gene transcription (Logan and Nusse, 2004). In planarians, it has been widely demonstrated that the Wnt/ β -catenin signaling pathway is required for posterior specification during regeneration and homeostasis (Adell et al., 2009; Gurley et al., 2008; Iglesias et al., 2008; Petersen and Reddien, 2008, 2009b, 2011). Whereas *Smed- β -catenin1* silencing by RNA interference (RNAi) induces a gradual anteriorization of regenerating planarians that ranges from two-

* Corresponding authors.

E-mail addresses: esalo@ub.edu (E. Saló), martigles@gmail.com (M. Iglesias).

headed to hypercephalized planarians (Iglesias et al., 2008), RNAi for *Smed-APC-1* results in planarians that regenerate a tail instead of a head (Gurley et al., 2008). Furthermore, loss of function of Wnt11-6 (formerly known as WntA [Gurley et al., 2010]) results in the expansion of the brain towards more posterior regions without further disturbing head-trunk identities (Adell et al., 2009; Kobayashi et al., 2007), a phenotypic trait also observed after silencing of the FGFR-related gene *nou-darake* (*ndk*) (Cebrià et al., 2002a; Felix and Aboobaker, 2010). The relationship between the re-establishment of AP identity and correct morphogenesis of the central nervous system, however, remains poorly understood.

Here we report the characterization of two *axin* paralogs from *Schmidtea mediterranea* (*Smed-axinA* and *Smed-axinB*). We show that while both *Smed-axin* genes are required for the re-establishment of AP polarity during planarian regeneration, their effect on blastema polarity does not influence early brain differentiation. However, *Smed-axinA/Smed-axinB* double RNAi (abbreviated as *Smed-axins* RNAi) does prevent the development of a fully formed brain. Remarkably, loss of function of another β -catenin inhibitor, *Smed-APC-1*, phenocopies *Smed-axins* RNAi. Furthermore, we provide evidence of an indirect relationship between the Wnt/ β -catenin and FGFR/*ndk* signaling systems in the control of the posterior limits of brain differentiation. These findings provide clear evidence of independent mechanisms controlling early brain differentiation and subsequent development and provide important insights into the relationship between the specification of AP identity and organogenesis during regeneration.

Material and methods

Organisms

The planarians used in these experiments belong to an asexual biotype of *S. mediterranea* collected from an artificial spring in Montjuic, Barcelona, Spain. The animals were maintained at 20 °C in a 1:1 (v/v) mixture of distilled water and tap water treated with AquaSafe (TetraAqua, Melle, Germany). Animals were fed with homogenized organic veal liver and starved for at least a week before the experiments. Planarians 2 to 6 mm in length were used for all experiments.

Isolation of *S. mediterranea* genes

The *S. mediterranea* genome is in the process of being sequenced and assembled (Washington University, St. Louis, USA). Fragments of *Smed-axinA* and *Smed-axinB* were identified from the *S. mediterranea* genomic contigs through a BLAST search with *axin* sequences from other species. The corresponding full-length transcripts were amplified by rapid amplification of cDNA ends (RACE) using the Invitrogen GeneRacer Kit (Invitrogen). The identity of *Smed-axinA* and *Smed-axinB* cDNAs was confirmed by sequencing (ABI Prism 3730 Applied Biosystems/Hitachi, Foster City, USA) and BLASTX analysis. *Smed-Gpas* (G protein α -subunit) was identified from the *S. mediterranea* genomic database using the *Dj-1791hh* homolog from *Dugesia japonica* (Cebrià et al., 2002b). Specific primers were designed to partially isolate the corresponding cDNA sequence.

RNAi analysis

Double-stranded RNAs (dsRNAs) were synthesized by *in vitro* transcription (Roche) as described previously (Boutros et al., 2004; Sanchez Alvarado and Newmark, 1999). dsRNA microinjections were performed as described elsewhere (Sanchez Alvarado and Newmark, 1999) following the standard protocol of a 32 nl injection of dsRNA on three consecutive days before amputation (one round of injection). Control animals were injected with water or a dsRNA corresponding

to the GFP sequence. For combinatorial RNAi experiments, the concentration of dsRNA for each target gene was maintained at the same dose as for single RNAi after mixing. For experiments involving low doses of *Smed- β -catenin1* and *Smed-APC-1* RNAi, animals were injected just one day before amputation. In double *Smed-ndk(-)/Smed-APC-1(-)* experiments, animals were injected with two consecutive rounds of *Smed-APC-1* dsRNAi with amputation just after the first round, followed by a third round of *Smed-ndk* RNAi injection. The respective *Smed-APC-1(-)* and *Smed-ndk(-)* controls were injected with GFP when appropriate to follow the same protocol of injection and amputation. The following pairs of specific primers were used to generate each dsRNA target gene:

dsRNA against *Smed-axinA*

5'-AGAGATGTCGATTGTCTCATGTG-3';

5'-TTGTGAATAAGGAGGCTATTGTGC-3'

dsRNA against *Smed-axinB*

5'-CGAGTAACTTTGATTGAGGAGTCAG-3';

5'-TAAGGAACAGGGTCATTTCTATATAG-3'

dsRNA against *Smed- β -catenin1*

5'-TCAGGGATTGCAGATTCTCATTCCG-3';

5'-GGCTAATGATCAATCCAGTCC-3'

dsRNA against *Smed-APC-1*

5'-TCTACGGGATCTGCTGCTAC-3';

5'-CTATCATAGTCATCAGGATACG-3'

Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from a pool of three head or trunk fragments of RNAi-treated planarians using TRIzol® reagent (Invitrogen). RNA samples were DNase-treated using DNase I (Roche), and cDNA was synthesized using a First-Strand Synthesis System kit from Invitrogen. Real-time PCR was performed using SYBR Green (Applied Biosystems) in an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Three samples for each condition were run in parallel. Data were normalized to the expression of the internal control UDP. Statistical analyses were performed with SPSS software. The following sets of specific primers were used:

Smed-axinA mRNA

5'-GTCGGCGAAATAGGAGTG-3'; 5'-CTGAGGCCTGACTTTTACC-3'

Smed-axinB mRNA

5'-ATATTACGCTTGGGCAATTC-3'; 5'-ACTACTCCACAGTCGAATTC-3'

Smed- β -catenin1 mRNA

5'-ATTCTGTGCAATTTGACTTGC-3'; 5'-CTAAATCCACTCGA-TAGTCC-3'

Smed-udp mRNA was detected with primers described previously (Molina et al., 2011).

Irradiation

Intact planarians were γ -irradiated at 10 krad as described previously (Handberg-Thorsager and Saló, 2007) and fixed for *in situ* hybridization at 3 and 7 days post-irradiation.

Whole-mount *in situ* hybridization

Planarians were fixed and then processed in an *In situ* Pro hybridization robot (Abimed/Intavis) as previously described (Molina et al., 2007; Umesono et al., 1997). Hybridizations were carried out at 56 °C for 16 h. The following digoxigenin-labeled riboprobes were synthesized using an *in vitro* transcription kit (Roche): *Smed-axinA*, *Smed-axinB* and *Smed-Gpas* (novel); *Smed-otxA* and *Smed-otxB*

(Almuedo-Castillo et al., 2011); *Smed-otp* (kindly provided by M. Handberg-Thorsager); *Smed-FzA* (kindly provided by M. Sureda-Gómez); *Smed-Wnt11-6* (Adell et al., 2009); *Smed-HoxD* and *Smed- β -catenin1* (Iglesias et al., 2008); *Smed-septin* (Zayas et al., 2005); *Smed-eye53* (Collins et al., 2010); *Smed-sFRP-1* (Gurley et al., 2008; Petersen and Reddien, 2008); *Smedwi-2* (Reddien et al., 2005); and *cintillo* (Oviedo et al., 2003). Samples were observed through Leica MZ16F and Zeiss Stemi SV6 stereomicroscopes and a Zeiss Axiophot microscope; images were captured with a Nikon Coolpix E995 or Leica DFC300FX camera.

Whole-mount immunostaining

Immunostaining was carried out essentially as described previously (Cebrià and Newmark, 2005; Sanchez Alvarado and Newmark, 1999). The following antibodies were used: anti-synapsin (anti-SYNORF1, Developmental Studies Hybridoma Bank) at a 1:50 dilution and anti-*Smed- β -catenin2* (Chai et al., 2010) at 1:1000. Highly cross-absorbed Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG or Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibodies (Molecular Probes) were used at dilutions of 1:400 and 1:1000, respectively. Confocal laser scanning microscopy was performed with a Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg) adapted for an inverted microscope (Leitz DMIRB).

Results and discussion

Graded expression of *Smed-axins* in differentiated cells and neoblasts

Two *axin* genes were identified and full-length transcripts isolated from the planarian *S. mediterranea* genome sequences (available in NCBI). The predicted *Smed-axin* proteins contain the two main conserved domains that characterize axins: the RGS (Regulator of G protein signaling) domain near the NH2 terminus and the C-terminal DIX (Dishevelled/Axin homologous) domain, which is necessary for homodimerization (Fig. S1) (Zeng et al., 1997). Phylogenetic analyses of axin homologs from different species showed that the two planarian axins arise from a lineage-specific duplication. We therefore named them *Smed-axinA* and *Smed-axinB* to avoid confusion with the already described vertebrate orthologous genes *axin1* and *axin2* (also *axil/conductin*) (Fig. 1A).

In situ hybridization experiments revealed similar expression patterns for the *Smed-axins*. In adult animals, both transcripts were detected in the central nervous system, the pharynx, and in both differentiated cells and neoblasts in the parenchyma (Figs. 1B and S2). Notably, when *in situs* were developed for a shorter time, a posterior to anterior gradient of expression was observed for both genes. Both *Smed-axins* were expressed in the anterior and posterior blastemas early during bipolar regeneration (trunk fragments regenerating a new head and tail), but the timing differed according to the paralog

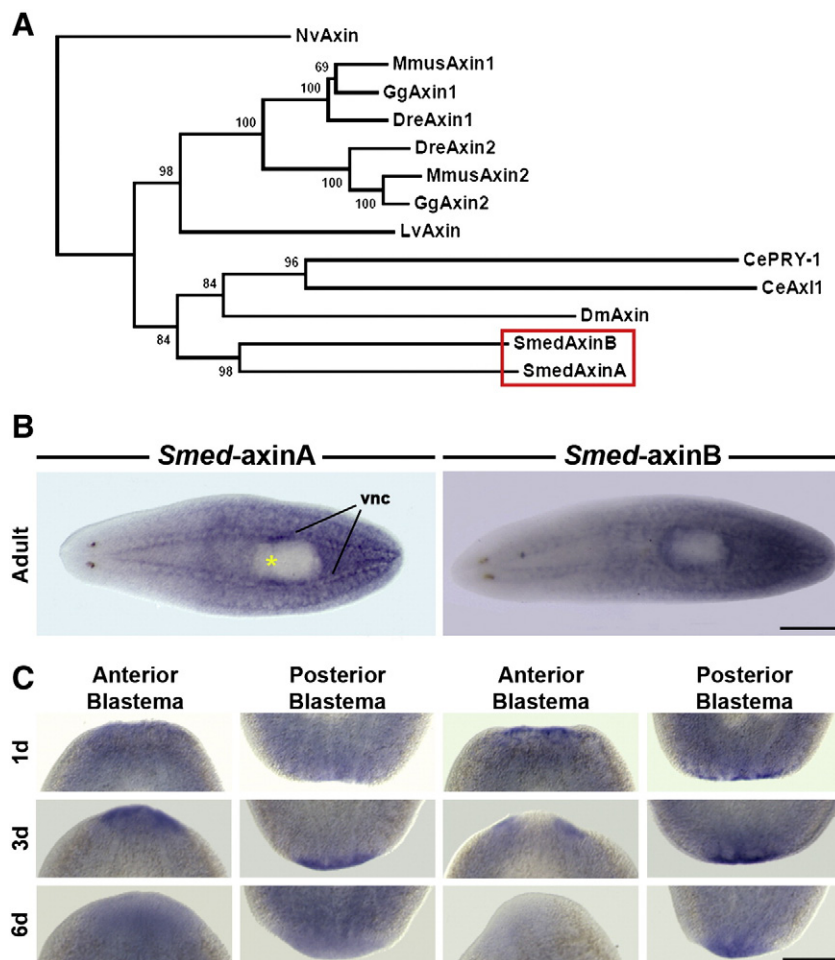


Fig. 1. Expression pattern of *Smed-axin* paralogs. (A) Phylogenetic tree of *Schmidtea mediterranea* Axin proteins showing that the two planarian *Smed-axins* represent a lineage-specific duplication. Nv: *Nematostella vectensis*; MMus: *Mus musculus*; Gg: *Gallus gallus*; Dre: *Danio rerio*; Lv: *Lytechinus variegatus*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; DM: *Drosophila melanogaster*; Smed: *Schmidtea mediterranea*. (B) Expression pattern of *Smed-axinA* and *Smed-axinB* in adult and (C) regenerating trunks revealed by whole-mount *in situ* hybridization. Anterior is shown to the left in (B) and to the top in (C); yellow asterisk indicates the pharynx; d, days after amputation; vnc, ventral nerve cords. Scale bars, 500 μ m in (B) and 200 μ m in (C).

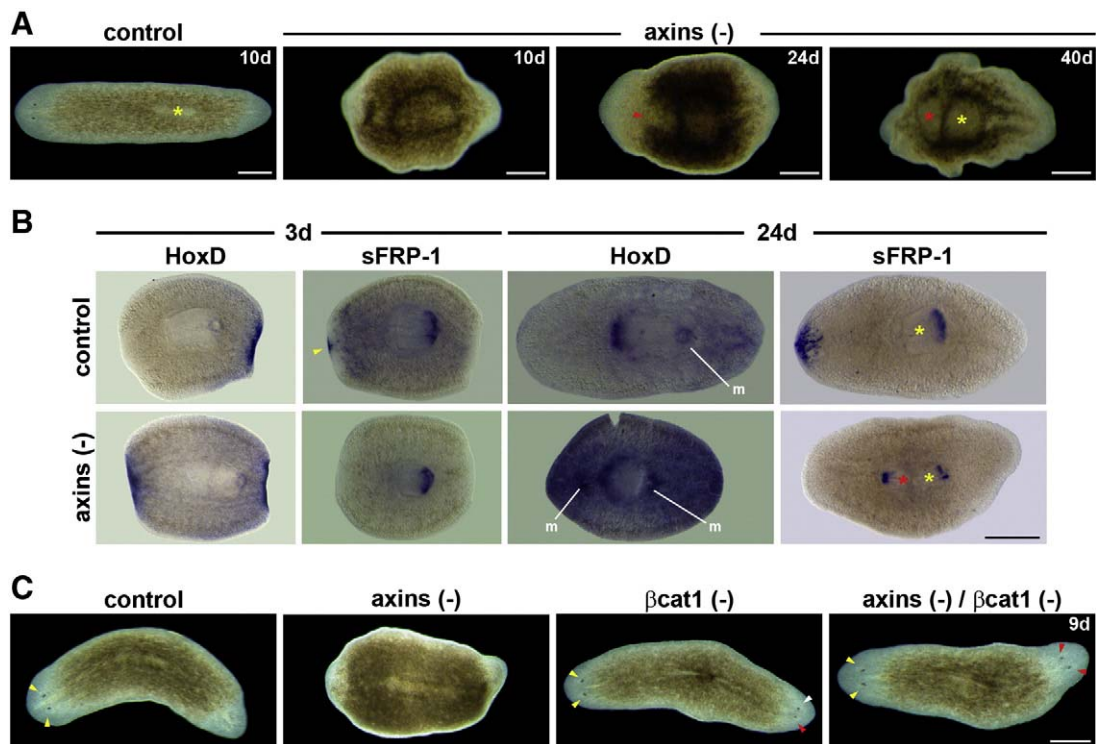


Fig. 2. Ectopic Wnt/ β -catenin pathway activation by *Smed-axins* RNAi results in two-tailed regenerated planarians. (A) *Smed-axins* RNAi during trunk regeneration. While control planarians regenerate a head at anterior wounds, *Smed-axins* RNAi animals regenerate a tail and pharynx with opposite polarity. (B) Posteriorization is accompanied by loss of anterior identity in *Smed-axins*-silenced planarians. Analysis with the central-posterior *Smed-HoxD* marker and the anterior *Smed-sFRP-1* marker, which is expressed at the most anterior tip (yellow arrow) and the pharynx, reveals that *Smed-axins* RNAi-treated planarians lose anterior and acquire central-posterior identity during regeneration. Note the differentiation of an ectopic mouth (m) following *Smed-axins* RNAi. (C) Triple RNAi for *Smed- β -catenin1* and *Smed-axins* demonstrates that the posteriorized phenotype after *Smed-axins* RNAi requires the *Smed- β -catenin1* gene. All control planarians regenerate normally; *Smed-axins* RNAi animals exhibit a two-tailed phenotype (penetrance = 47/49 [96%]); *Smed- β -catenin1* RNAi results in a two-headed phenotype (penetrance = 39/39 [100%]); and *Smed-axins* plus *Smed- β -catenin1* RNAi leads to a two-headed phenotype similar to that seen with *Smed- β -catenin1* RNAi alone (penetrance = 62/65 [95%]; 5 independent experiments). All images correspond to regenerating trunks fixed at different time points after amputation. Anterior is shown to the left. Yellow/red arrowheads indicate the differentiation of eyes in normal and ectopic positions, respectively. Yellow/red asterisks indicate the normal and ectopic pharynx, respectively. d: days after amputation. Scale bars, 500 μ m.

analyzed. *Smed-axinA* was expressed in both blastemas at day 3 of regeneration. As regeneration proceeded, *Smed-axinA* expression decreased and eventually the adult expression pattern was restored (Fig. 1C). In contrast, *Smed-axinB* expression was detected in both blastemas as early as 1 day after amputation. At day 3 of regeneration, *Smed-axinB* expression at anterior blastemas began to decrease and it had disappeared by day 6 after amputation. As regeneration proceeded, the *Smed-axinB* expression pattern observed in adult animals was restored (Fig. 1C). These expression data during regeneration and, in particular, in intact animals suggest that *Smed-axins* might have a role in AP polarity.

Ectopic Wnt/ β -catenin pathway activation by *Smed-axins* RNAi results in two-tailed planarians

To explore the role of *Smed-axins* in AP polarity, we performed RNAi experiments. Planarians were amputated pre- and post-pharyngeally and the resulting fragments were allowed to regenerate. Ten days after cutting, control trunks differentiated a pair of new eyes within the anterior blastema (unpigmented new tissue). In contrast, following *Smed-axinA/Smed-axinB* double knockdown (abbreviated as *Smed-axins* RNAi), regenerating trunks did not develop eyes (Fig. 2A). As regeneration proceeded, most *Smed-axins* RNAi planarians had an unpigmented bulge between the old and new anterior tissue (Fig. 2A, red arrowhead at 24 days) that corresponded to an ectopic pharynx with a reversed orientation (Fig. 2A, red asterisk at 40 days; see also Fig. 2B). *Smed-axins* RNAi-regenerated trunks exhibited tail morphology at their anterior wounds, resulting in animals with tails and pharynges at both body ends. We refer to this as a two-tailed phenotype (Fig. 2A).

No clear AP defect was detected in regenerating trunks after *Smed-axinA* or *Smed-axinB* single RNAi (Fig. S3A), although the efficiency of RNAi experiments was confirmed by quantitative PCR (Fig. S4). Interestingly, most of the *Smed-axinB* RNAi regenerating tails exhibited a posteriorized phenotype (Fig. S3B), suggesting that *Smed-axin* genes may have undergone some degree of sub-functionalization (see also note in Fig. S6). However, the two paralogs act synergistically to control AP polarity decisions during regeneration since both genes must be knocked down before clear defects in regenerating trunks and two-tailed planarians are observed. We therefore decided to characterize *Smed-axinA/Smed-axinB* double knockdowns in greater detail.

To assess whether these external morphological changes were accompanied by a fate switch in anterior blastemas, we used *Smed-HoxD* and *Smed-sFRP-1* as markers of central-posterior and anterior identity, respectively. From early stages of regeneration, *Smed-axins* RNAi regenerating trunks expressed *Smed-HoxD* at both ends, whereas *Smed-sFRP-1* expression was absent. This pattern remained constant throughout the regeneration process (Fig. 2B). Moreover, analyses with these and other markers (see below) revealed that most regenerated trunks from *Smed-axins* RNAi animals developed a new ectopic mouth and a pharynx with an opposing polarity in relation to the existing pharynx. As observed in *Smed- β -catenin1* RNAi (Iglesias et al., 2008), analysis of *Smed-axins* knockdowns with markers of dorsal and ventral structures suggests that the dorsoventral (DV) axis was not affected (Fig. S5).

Axins are well known negative regulators of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Zeng et al., 1997), acting as scaffold proteins for β -catenin degradation in the absence of Wnt signaling. To test whether the *Smed-axins* RNAi phenotype depends on *Smed- β -catenin1* function,

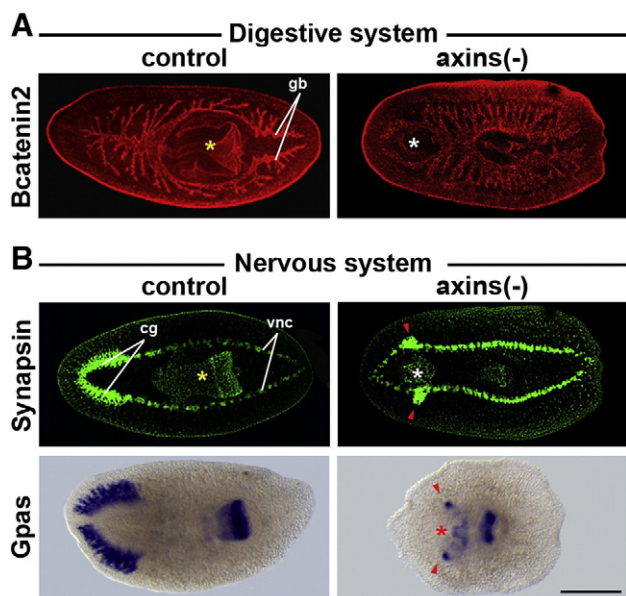


Fig. 3. Nervous and digestive systems in regenerated trunks after *Smed-axins* RNAi. (A) Analysis of the digestive system with anti-*Smed-β-catenin2* antibody reveals the differentiation of two posterior gut branches (gb) at each edge of *Smed-axins* RNAi-treated worms. Note also the differentiation of an ectopic pharynx with opposite polarity at their anterior wounds (white asterisk). (B) Analyses of the central nervous system with the pan-neuronal marker Synapsin and the marker *Smed-Gpas*, which is specifically expressed in the cephalic branches and the pharynx, reveal that, along with two ventral nerve cords in the anterior tail, *Smed-axins* RNAi-treated animals differentiate brain-like tissues (red arrowheads). All images correspond to 22 to 26-day regenerating trunks. Anterior is shown to the left. Yellow and white/red asterisks indicate the normal and ectopic pharynx, respectively. Synapsin and anti-*Smed-β-catenin2* images correspond to confocal z-projections. cg, cephalic ganglia; vnc, ventral nerve cords. Scale bars, 500 μm.

we performed combinatorial RNAi experiments. The efficiency of the RNAi experiments was confirmed by quantitative PCR for each gene after RNAi (Fig. S6). Triple RNAi knockdowns for *Smed-axins* and *Smed-β-catenin1* resulted in two-headed planarians identical to those of the single *Smed-β-catenin1* RNAi phenotype (Fig. 2C). This finding suggests that the two-tailed phenotype observed in *Smed-axins* RNAi planarians requires the *Smed-β-catenin1* gene.

Although no role in AP axis specification has previously been reported for *axin* genes in planarians (Gurley et al., 2008), the data presented here demonstrate that *Smed-axins* are conserved negative regulators of the Wnt/β-catenin pathway and are required for correct AP polarity re-establishment during planarian regeneration. Loss of function of these genes during regeneration results in the loss of anterior identity and acquisition of a central-posterior identity, resulting in animals with two tails and pharynges at both body ends. In agreement with our observations, the two-tailed phenotype has been also reported in planarians after promoting either the Hedgehog pathway or the Wnt/β-catenin pathway itself by knocking down other negative regulators of the canonical Wnt pathway (Gurley et al., 2008; Petersen and Reddien, 2011; Rink et al., 2009; Yazawa et al., 2009). Notably, Hedgehog signaling influences posterior specification by regulating Wnt/β-catenin signaling (Rink et al., 2009; Yazawa et al., 2009).

Brain differentiation occurs in two-tailed planarians after silencing of either Smed-axins or Smed-APC-1

To address whether the AP polarity of specific organs is affected by *Smed-axins* RNAi, we analyzed the regeneration of the digestive and nervous systems. The planarian digestive system is composed of a pharynx located in the middle of the trunk, from which one anterior

and two posterior gut branches extend (Fig. 3A) (Saló, 2006). The central nervous system consists of two anterior cephalic ganglia (brain) situated above two ventral nerve cords (VNCs), which extend along the body and converge in the tail (Fig. 3B) (Agata et al., 1998; Cebrià et al., 2002b). *Smed-β-catenin2* immunostaining (which strongly labels the gut and pharynx) showed that trunks from *Smed-axins* RNAi-treated animals regenerated two posterior gut branches at each end of the animal (Fig. 3A). Moreover, most of them differentiated an ectopic pharynx with opposite polarity at their anterior wounds (white/red asterisks in Fig. 3 and Table S1). Surprisingly, however, analyses with the pan-neuronal marker synapsin revealed that, along with two VNCs in the ectopic “anterior” tail, *Smed-axins* RNAi animals differentiated two clusters of cells with brain-like characteristics next to the ectopic pharynx (red arrowheads in Fig. 3B). The brain identity of these cell clusters was further confirmed by analysis of the expression of *Smed-Gpas*, a brain-specific marker that also labels the pharynx (Fig. 3B). Remarkably, 100% of trunks analyzed between 24 and 30 days after amputation differentiated brain tissue in the ectopic “anterior” tail (Table S1). Together with the previous section, these results show that while posterior identity of anterior blastemas is accompanied by the differentiation of a posterior digestive system after *Smed-axins* RNAi, the differentiation of brain tissue is not completely abolished.

Previous studies did not report discernible brain tissue after directly or indirectly promoting the Wnt/β-catenin pathway (Gurley et al., 2008; Petersen and Reddien, 2011; Rink et al., 2009; Yazawa et al., 2009). To test the possibility that a hypomorphic phenotype occurs as a result of *Smed-axins* RNAi, we performed RNAi-dosage experiments. When the dsRNA dose was increased (two rounds of *Smed-axins* dsRNA injections), we observed that brain tissue still differentiated at anterior wounds and its size was the same as that observed after only one round of injections (Fig. S7). This suggests that the appearance of brain tissue after *Smed-axins* RNAi is not an effect of Axin protein persistence. Moreover, the finding that loss of function of another negative regulator of the Wnt/β-catenin pathway, *Smed-APC-1*, phenocopies *Smed-axins* RNAi at both the morphological and molecular level ruled out a pleiotropic effect of *Smed-axins* in brain differentiation (Fig. S8 and Fig. 4).

Overall, these findings show that brain differentiation occurs in two-tailed planarians generated by silencing *Smed-axins* and *Smed-APC-1*. Our data thus supports the idea that the mechanisms that control brain differentiation can be uncoupled from those driven by Wnt/β-catenin that determine AP body polarity (Adell et al., 2010). These findings are consistent with the results obtained after silencing Wnt11-6 and *ndk* genes, which led to the differentiation of ectopic brain tissues along the planarian body without further disturbing AP identities (Adell et al., 2009; Cebrià et al., 2002a; Kobayashi et al., 2007).

Early brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by Wnt/β-catenin pathway

To investigate the nature of this brain tissue differentiation after ectopic activation of Wnt/β-catenin pathway, we studied the process of planarian brain regeneration in more detail. A working model for planarian central nervous system regeneration has been suggested (Agata and Umesono, 2008; Cebrià et al., 2002b). Based on this model, the initial stage of brain regeneration is characterized by the formation and subsequent patterning of the brain primordia within the anterior blastema. These brain primordia then grow and re-establish proper connections with the regenerating VNCs in the blastema. Finally, the regenerated central nervous system recovers its functionality.

Regeneration time-course experiments in control animals with the early brain-specific marker *Smed-Gpas* showed that brain primordia in the form of two small cell clusters can be detected as early as 2 days after amputation (Fig. 4A). *Smed-axins* and *Smed-APC-1* RNAi animals

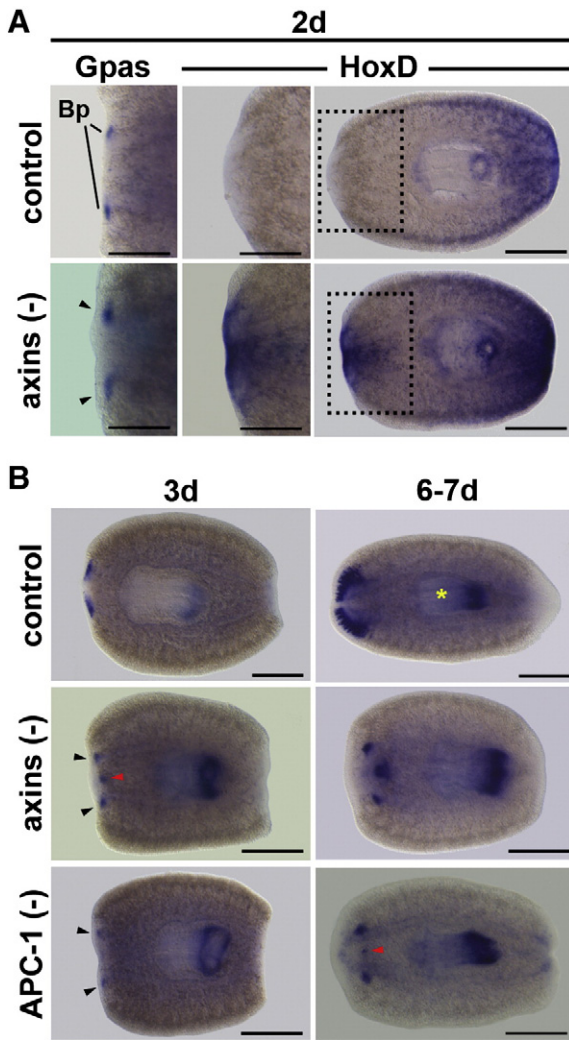


Fig. 4. Early brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by the Wnt/ β -catenin pathway. (A) Analysis of regenerating *Smed-axins* RNAi trunk fragments with *Smed-Gpas* and *Smed-HoxD* 2 days after cutting. As occurs in control animals, *Smed-axins* RNAi planarians regenerate brain primordia (bp) at anterior wounds soon after amputation (black arrowheads). However, after *Smed-axins* RNAi, the brain primordia differentiate within tissue with a central-posterior identity and in a more posterior region than in control animals. High magnification views of *Smed-HoxD* expression in the anterior blastema (dotted box) are shown to the right. (B) Expression analysis of *Smed-Gpas* during early stages of regeneration. In control animals, brain primordia grow and develop into a well formed brain as regeneration proceeds. By contrast, following *Smed-axins* or *Smed-APC-1* RNAi these primordia (black arrowheads) either fail to develop or disappear as regeneration proceeds. Anterior is shown to the left. d, days after amputation; red arrowhead, ectopic pharynx primordia; yellow asterisk indicates the normal pharynx. Scale bars, 300 μ m in high magnification and 500 μ m in all other images.

also differentiated brain primordia at anterior wounds, but these primordia either never developed into normal brains or disappeared as regeneration proceeded (Fig. 4B). Interestingly, a detailed view of anterior wounds following *Smed-axins* RNAi revealed that the brain primordia differentiated within tissue with a central-posterior identity (indicated by *Smed-HoxD* expression) but in a more posterior/proximal region as compared to control animals. Whereas the brain primordia differentiated distally within the anterior blastema 2 days after cutting in control animals, they differentiated close to the blastema/post-blastema (old tissue) boundary in *Smed-axins* RNAi planarians (Fig. 4A).

To ascertain whether brain patterning was affected we analyzed the expression of otd/Otx family genes (*OtxA* and *OtxB*) and the homeobox-containing gene *ortopedia* (*Otp*) (Umesono et al., 1997,

1999). As in the control animals, *Smed-OtxA*, *Smed-OtxB* and *Smed-Otp* are expressed sequentially along the medio-lateral axis of the brain in both *Smed-axins* and *Smed-APC-1* RNAi planarians (Fig. 5). With respect to patterning along the AP axis, it has been shown that a Frizzled homolog appears to be mainly expressed in the anterior part of the brain, whereas a Wnt11 homolog is restricted to the most posterior part and along the VNCs (Kobayashi et al., 2007). Consequently, we studied the expression of these two markers in RNAi-treated animals. *Smed-Wnt11-6* and *Smed-FzA* were expressed in the brain primordia of *Smed-axins* and *Smed-APC-1* knockdowns (Fig. 6). However, as at early stages of brain regeneration in control planarians, the compartments defined by these genes in the brain primordia that differentiated after *Smed-axins* or *Smed-APC-1* were less well delimited than for the *Otx/otp* genes since there appears to be overlapping expression in some regions of the brain (Fig. 6 at 3 days). This made it more difficult to unambiguously detect any defect in the specification of *Smed-Wnt11-6* and *Smed-FzA* territories. Based on the currently available markers, our results show that the silencing of *Smed-axins* or *Smed-APC-1* leads to the differentiation of a small round brain primordia that fails to develop into a well-formed brain but appears to be quite well patterned.

In summary, our data show that the silencing of either *Smed-axins* or *Smed-APC-1* results in the transformation of anterior blastemas into posterior ones (Fig. 2 and Fig. S8). In contrast, a posterior to anterior identity switch is observed in the blastemas of *Smed- β -catenin1* RNAi animals (Gurley et al., 2008; Iglesias et al., 2008; Petersen and Reddien, 2008). Since the posteriorized phenotype observed after *Smed-axins* or *Smed-APC-1* RNAi requires the *Smed- β -catenin1* gene (Fig. 2 and Gurley et al., 2008), blastema identity appears to be controlled by β -catenin activity in planarians (even though no data on the exact localization of β -catenin activation has yet been reported); basically, low levels of β -catenin activity would define anterior identity whereas high levels would induce a posterior one. Surprisingly, brain primordia differentiate

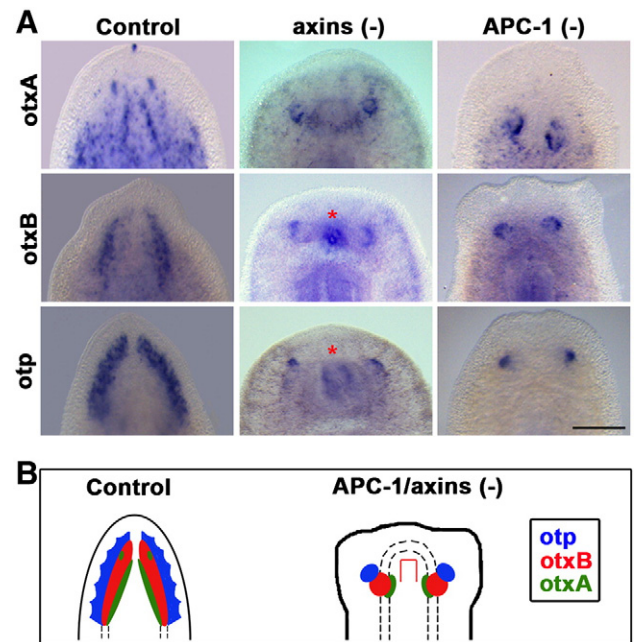


Fig. 5. Medio-lateral patterning of brain primordia is not affected in *Smed-axins* or *Smed-APC-1* RNAi-treated animals. (A) Expression analysis of *Smed-OtxA*, *Smed-OtxB* and *Smed-Otp*. As in control animals, in *Smed-axins* and *Smed-APC-1* RNAi-treated animals, *Smed-OtxA*, *Smed-OtxB* and *Smed-Otp* are expressed in distinct non-overlapping domains along the medio-lateral axis of the brain. All images correspond to high magnifications of anterior regions of 12-day regenerating trunks. Anterior is shown to the top; red asterisk indicates ectopic pharynx. Scale bars, 200 μ m. (B) Schematic representation of brain patterning in the different phenotypes described in (A).

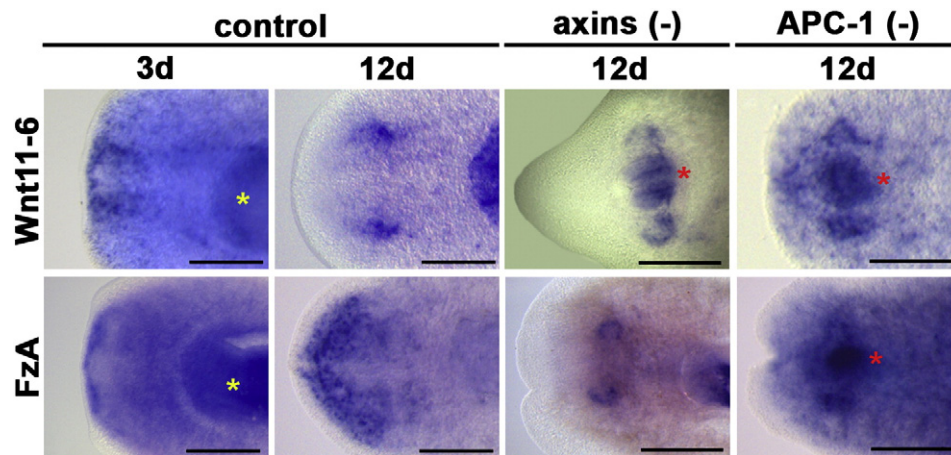


Fig. 6. *Smed-FzA* and *Smed-Wnt11-6* are expressed in brain primordia after *Smed-axins* or *Smed-APC-1* loss of function. In control animals, *Smed-FzA* and *Smed-Wnt11-6* are expressed in the brain at early stages of regeneration (3 d) but their expression only becomes segregated along the anteroposterior axis when the brain primordia grow (12 d). Similarly, *Smed-FzA* and *Smed-Wnt11-6* are also expressed in the small round brain primordia following *Smed-axins* or *Smed-APC-1* RNAi. However, since the growth of these brain primordia is arrested in RNAi-treated animals, it is difficult to unambiguously detect any defect along the anteroposterior axis of the brain. All images correspond to high magnifications of anterior regions. Anterior is shown to the left. d, days after amputation; red asterisk indicates ectopic pharynx. Scale bars, 200 μ m.

at the interface of the posterior-fated blastemas and anterior wounds of *Smed-APC-1* or *Smed-axins* RNAi animals (Fig. 4). This suggests that the mechanisms controlling early brain regeneration can be uncoupled from those involved in providing blastema polarity mediated by the Wnt/ β -catenin pathway. An important point is that these brain primordia display an overall proper pattern, but do not grow and develop into a fully formed brain within those posterior blastemas. Considering that those blastemas should display a high level of β -catenin activity, the fact that brain primordia do not further develop within them may suggest that low levels of β -catenin activity are required at late stages of brain regeneration for proper brain development. Consistent with this possibility, lower doses of dsRNA against *Smed-APC-1* allow brain primordia to grow to a certain extent (Fig. S9). However, further investigation is needed to ascertain whether the Wnt/ β -catenin pathway affects brain development directly or indirectly by promoting posterior identity in regenerating blastemas.

We are currently unable to explain why brain primordia differentiate upon amputation after silencing of *Smed-APC-1* or *Smed-axins*. However, our results suggest that an unknown mechanism is underlying early brain regeneration at anterior wounds despite the silencing of *Smed-axins* or *Smed-APC-1*. Two main scenarios can be considered. One recently proposed hypothesis is that the anterior wound goes through a transitory stage characterized by a low level of β -catenin activity that allows the initial development of brain primordia (Adell et al., 2010). This can also be extrapolated from the findings of Yazawa et al. (2009). The gradual increase in the level of β -catenin activity as a consequence of the silencing of *Smed-APC-1* or *Smed-axins* subsequently blocks further development of a fully formed brain in these, otherwise, posterior blastemas. This scenario implies that brain differentiation is incompatible with high β -catenin activity and that the aforementioned unknown mechanism may operate temporarily at anterior wounds to overcome the effect of *Smed-axins* or *Smed-APC-1* RNAi on β -catenin activity and consequently commit early brain primordia. Consistent with this hypothesis, the silencing of *Smed- β -catenin1* not only induces early regeneration of anterior/brain structures at any wound but also a gradual cephalization/anteriorization of RNAi-treated planarians and eventually a hypercephalized phenotype (Iglesias et al., 2008). An alternative, and less parsimonious, scenario would be that early brain regeneration is compatible with high levels of β -catenin activity whereas subsequent development of the brain is not. Further experiments are needed to clarify how the different levels of β -catenin activity influence not only blastema polarity but also brain differentiation within them.

Relationship between the FGFR/ndk and Wnt/ β -catenin signaling pathways in planarian brain regeneration

The existence in planarians of a brain-inducing circuit based on an FGF signaling pathway has been proposed. This hypothesis is based on the study of the *ndk* RNAi phenotype in planarians (which is characterized by the expansion of the brain outside the head region) and the fact that *ndk* is a FGFR-related gene that negatively regulates FGF signaling in *Xenopus* embryos (Cebrià et al., 2002a). Of particular interest in the observation of the *ndk* RNAi phenotype is that ectopic brain tissues also differentiated *de novo* at posterior wounds close to the blastema/post-blastema boundary (see Fig. S10), but these posterior brain tissues never expanded towards pre-existing tissues or posterior blastemas. This phenotypic trait is strikingly similar to the brain primordia observed at “anterior” wounds in the two-tailed planarians generated after ectopic Wnt/ β -catenin activation because, in both cases it takes place at the interface of posterior-fated blastemas and pre-existing tissues. Thus, we reasoned that the FGF/ndk signaling system could be one of the mechanisms postulated above that can overcome the *Smed-axins/Smed-APC-1* RNAi effect at anterior wounds and promote brain primordia differentiation despite the posteriorization of the blastema. The ideal way to test this possibility would be to inhibit the brain-inducing signals modulated by *ndk* at anterior wounds, but no FGF-like ligands (called brain activator/s in the planarian literature) or FGFR-like receptors responsible for anterior brain regeneration in planarians have yet been identified (Agata and Umesono, 2008). Alternatively, by performing combinatorial RNAi experiments, we sought to determine whether silencing *Smed-APC-1* would allow neoblast response to the brain-inducing signals modulated by *Smed-ndk* in pre-existing tissues. In order to ensure the effectiveness of these RNAi experiments we chose *Smed-APC-1* instead of *Smed-axins* since we reasoned that silencing two genes in combination would be easier. Moreover, we carried out two rounds of *Smed-APC-1* RNAi and amputation followed by a third round of *Smed-ndk* RNAi and amputation to properly down-regulate *Smed-APC-1* in pre-existing tissues. As reported above, following *Smed-ndk* RNAi, not only did the regenerating brain expand towards more posterior regions without further disturbing AP identities, but ectopic brain tissues also differentiated *de novo* at posterior wounds (Figs. 7 and S10). As in *Smed-APC-1* RNAi, double *Smed-ndk/Smed-APC-1* RNAi planarians did not develop well-formed brains at anterior wounds, and similarly to *Smed-ndk* RNAi differentiated brain tissues to more posterior regions. Thus, the silencing of *Smed-APC-1* does not impair the response of neoblast to the brain-

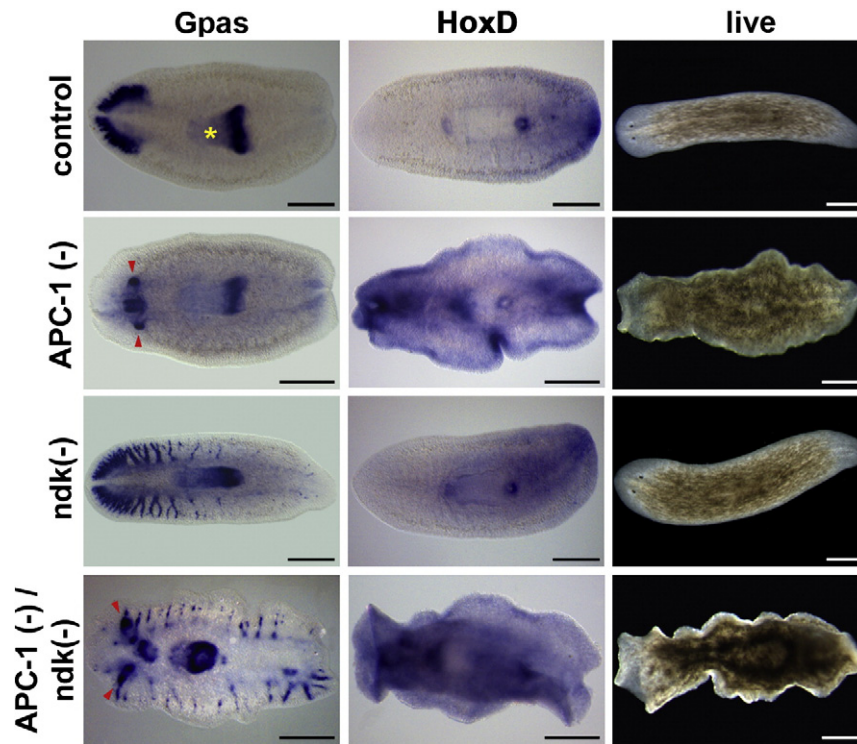


Fig. 7. Relationship between Wnt/ β -catenin and Ndk/FGFR pathways in planarian brain regeneration. *Smed-Gpas* expression analyses show expected phenotypes after *Smed-APC-1* and *Smed-ndk* RNAi. By contrast, double *Smed-ndk/Smed-APC-1* knockdown results in broader posterior expansion of brain tissues than single *Smed-ndk* knockdown. In addition, note the different morphology of the brain primordia in these double *Smed-ndk/Smed-APC-1* knockdowns (red arrowheads). *Smed-HoxD* analyses confirm posteriorization after *Smed-ndk/Smed-APC-1* and *Smed-APC-1* silencing, while anteroposterior identity is not affected in *Smed-ndk* RNAi planarians. All images correspond to 12-day regenerating trunks. Anterior is shown to the left. Yellow asterisk indicates the normal pharynx. Scale bars, 500 μ m.

inducing signals modulated by *Smed-ndk* in pre-existing tissues. Notably, we observed broader posterior expansion of brain tissues in double *Smed-ndk/Smed-APC-1* RNAi planarians than in *Smed-ndk* RNAi planarians (Fig. 7). This unexpected finding revealed that the FGFR/ndk and Wnt/ β -catenin signaling systems interact indirectly to establish the posterior limits of brain differentiation. Perhaps a feedback-loop between these two signaling systems is operating during planarian brain regeneration since cross-talk between FGF and Wnt signaling has been reported in many tissues and organisms and, depending on the developmental context, this can trigger synergistic or antagonistic effects (Kim et al., 2006). Remarkably, it has been shown that FGF signaling can specifically inhibit Wnt/ β -catenin signaling downstream of the β -catenin destruction complex in which Axin and APC operate (Ambrosetti et al., 2008) and that Wnt signaling can regulate the expression of different FGF ligands during development (Matsunaga et al., 2002). However, further studies are needed to better characterize the FGF/ndk system and determine exactly how these pathways interact during planarian brain regeneration.

Brain tissues form close to the pharynx at late stages of regeneration in two-tailed planarians

Surprisingly, during late stages of regeneration we observed a second mode of brain tissue differentiation after Wnt/ β -catenin ectopic activation. In 44% of *Smed-axins* RNAi animals analyzed, one or two additional clusters of cells resembling brain primordia (named brain primordia-like) appeared next to the original pharynx between 18 and 25 days after amputation, probably as a remodeling response. Like the early brain primordia described above, these brain primordia-like structures did not develop into fully formed brains but were homeostatically maintained. The phenotypes observed in regenerated *Smed-axins* RNAi trunks displayed a temporal progression (Table S1).

Likewise, *Smed-APC-1* RNAi trunk fragments differentiated brain primordia and brain primordia-like structures at anterior wounds and next to the original pharynx, respectively (Fig. 8). Noteworthy,

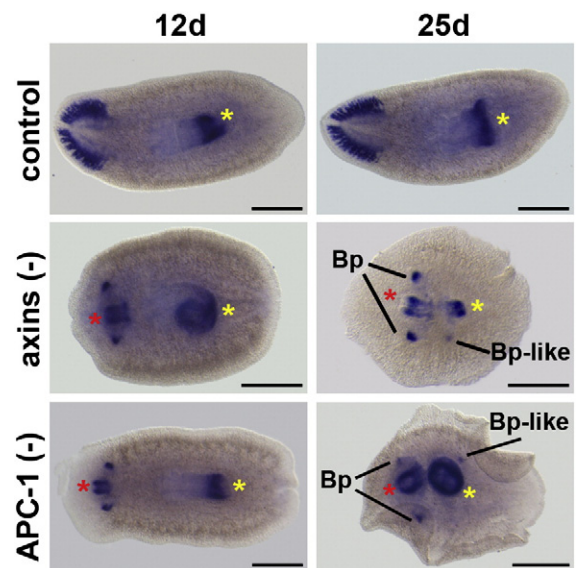


Fig. 8. Brain primordia-like structures differentiate close to the original pharynx at late stages of regeneration in *Smed-axins* and *Smed-APC-1* RNAi-treated animals. Analysis of *Smed-Gpas* expression showing the dynamics of brain tissue differentiation in trunk fragments. Two successive modes of brain tissue differentiation are observed following *Smed-axins* and *Smed-APC-1* RNAi. Firstly, like control animals, RNAi-treated animals regenerate brain primordia (bp) at anterior wounds (see also Fig. 4). Secondly, at late stages of regeneration, brain primordia-like (bp-like) structures differentiate next to the original pharynx. Anterior is shown to the left. d, days after amputation; yellow and red asterisks indicate normal and ectopic pharynx, respectively. Scale bars, 500 μ m.

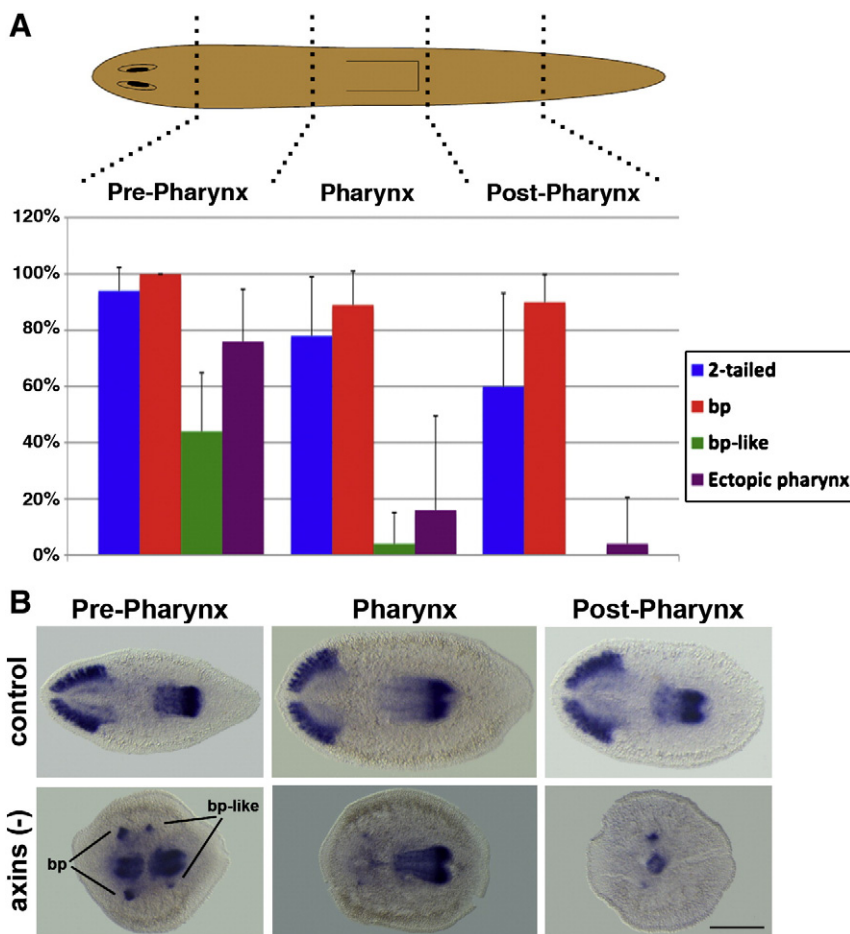


Fig. 9. The effect of *Smed-axins* RNAi on regeneration depends on the level of amputation along the anteroposterior (AP) axis. (A) Schematic representation of transverse amputations at different positions along the AP axis of *Smed-axins* RNAi-treated planarians. The two-tailed phenotype was scored on the basis of morphology whereas the other phenotypic traits were analyzed with the marker *Smed-Gpas*. The resulting bipolar fragments from more anterior locations were more likely to develop the two-tailed phenotype and ectopically differentiate a pharynx and brain primordia-like structures adjacent to the normal/original pharynx. Data show means for at least four experiments (see Table S4) analyzed at late stages of regeneration; bars are standard deviation. Statistically significant differences were observed between the different fragments for the two-tailed, ectopic pharynx and brain primordia-like phenotypic traits when analyzed by Chi square test at a significance level of 0.05. However, the differences between the fragments for the brain primordia phenotypic trait were not statistically significant. (B) Representative *Smed-axins* RNAi phenotypes along the AP axis analyzed with *Smed-Gpas*. All images correspond to 12-day regenerating fragments. Anterior is shown to the left. bp: brain primordia; bp-like: brain primordia-like; Scale bar, 300 μ m.

brain primordia-like structures also differentiated next to the newly formed pharynx in regenerating head fragments after both *Smed-axins* RNAi (Fig. S11 and Table S2) and *Smed-APC-1* RNAi (data not shown). The penetrance of this phenotype was directly proportional to the dose of dsRNA injected (Table S3).

Together with previous sections, these results show that, upon amputation, two successive modes of brain tissue differentiation are observed after ectopic activation of the Wnt/ β -catenin pathway. The first of these was an initial “default” response, in which brain primordia differentiated early during regeneration at anterior wounds independently of blastema polarity and dose of dsRNA injected (Fig. 4 and Fig. S7). In the second mode, differentiation of brain primordia-like structures occurred close to the original pharynx. This latter effect depended on the time of regeneration and the dose of dsRNA injected (Tables S1 and S3). Thus, the different phenotypes observed after ectopic Wnt/ β -catenin pathway activation appear to correspond to different degrees of remodeling of pre-existing tissues (or pharynx) to integrate them into the new body polarity. The differentiation of brain tissues next to both the ectopic and the original pharynx was the most severe phenotype observed (Fig. 8 at 25 days). Thus, it is tempting to speculate that during regeneration the presence of two opposite posterior blastemas leads to organize two opposed body axes composed of tail, pharynx and brain primordium tissues (the most severe phenotype). This is consistent with the idea that canonical Wnt

pathway specifies a posterior organizer, which in turns patterns the AP axis during planarian regeneration (Adell et al., 2010; Meinhardt, 2009a, 2009b). Such a mechanism for axial patterning has not only been shown to operate during hydra regeneration, but has also been proposed to represent an ancestral system for patterning the eumetazoan embryonic primary axis (Bode, 2009; Holland, 2002; Kusserow et al., 2005; Lee et al., 2006).

Our results have also uncovered a striking relationship between the pharynx and brain tissues, which always appear close to each other after over-activation of the Wnt/ β -catenin pathway. Interestingly, low doses of *Smed- β -catenin1* RNAi result in two-headed planarians with two pharynges located close to each other but with opposite polarities, and the differentiation of brain primordia-like structures is also observed (Fig. S12). Therefore, the appearance of these brain primordia-like structures close to the pharynx is not merely a consequence of the presence of two opposite posterior blastemas. Perhaps, a common feature of perturbing the Wnt/ β -catenin pathway would be the remodeling response of the pharynx to two confronting body axes. If so, the data would suggest that the pharynx somehow instructs the position at which brain primordia-like structures will differentiate. Further studies will be necessary to elucidate the role of the pharynx during planarian regeneration. In particular, it would be interesting to ascertain whether the region where the pharynx joins the anterior gut branch (the esophagus)

functions as a signaling center since this is a region in which many signaling factors are expressed (Fraguas et al., 2011; Gurley et al., 2010; Molina et al., 2007; Rink et al., 2009).

The Smed-axins RNAi phenotype depends on the level of amputation along the AP axis

Recently, a gradient of *Smed-β-catenin1* activity originating from a posterior organizer has been proposed to underlie positional identity along the AP axis (Adell et al., 2009, 2010; Iglesias et al., 2008; Meinhardt, 2009b). The severity of the phenotype after ectopic Wnt/β-catenin pathway activation could therefore be dependent on a pre-existing morphogenetic gradient along the AP axis of the regenerating animal. To assess this possibility, planarians were amputated at four levels along the AP axis and the regeneration of the resulting bipolar pre-pharynx, pharynx, and post-pharynx fragments were analyzed after silencing *Smed-axins* (Fig. 9). All control bipolar regenerating fragments developed normal anterior blastemas in which a normal brain developed irrespective of the level of amputation. In contrast, after *Smed-axins* RNAi, the penetrance of the two-tailed phenotype gradually increased as the level of amputation was moved towards the anterior end. The highest penetrance was observed in pre-pharynx fragments, which were posteriorized in 94% of cases. In addition, analyses of two-tailed fragments with the marker *Smed-Gpas* also revealed varying penetrance in the differentiation of brain primordia-like structures and ectopic pharynges according to the AP level from which the regenerating fragment originated (Fig. 9 and Fig. S13). Three observations are particularly noteworthy. First, all bipolar regenerating fragments differentiated brain primordia at anterior wounds. Second, differentiation of one or two brain primordia-like structures was observed next to the normal/original pharynx as a remodeling response in 44% and 4% of pre-pharynx and pharynx fragments, respectively (Table S4). Third, the susceptibility of bipolar regenerating fragments to ectopically differentiate a pharynx with opposite polarity increased in more anterior fragments such that the pre-pharynx fragments were most susceptible (76%).

Overall, these data suggest that early brain regeneration at anterior wounds occurs independently of any pre-existing AP morphogenetic gradient controlled by the Wnt/β-catenin pathway. In contrast, the likelihood of developing the most severe *Smed-axins* RNAi phenotype is a function of the position along the AP axis, with more anterior areas being more susceptible. This supports the existence of a *Smed-β-catenin* activity gradient originating from posterior blastemas since this susceptibility to develop the most severe phenotype could reflect relative differences of *Smed-β-catenin1* activity levels between the newly formed posterior blastema (high levels) and the pre-existing AP gradient of the regenerating fragment. However, further analyses will be required to determine whether a posterior organizer established by the Wnt/β-catenin pathway specifies the planarian AP axis through a gradient of *Smed-β-catenin1* activity.

Conclusions

Our data demonstrate that *Smed-axins* are conserved negative regulators of the Wnt/β-catenin pathway required for the re-establishment of AP polarity during planarian regeneration. Furthermore, we have shown that the mechanisms controlling early brain differentiation at anterior wounds are independent of those that control blastema polarity via the Wnt/β-catenin pathway. In contrast, however, ectopic Wnt/β-catenin activation by silencing *Smed-axins* or *Smed-APC-1* prevents the development of a fully formed brain, an indication that distinct mechanisms control early and late brain development. It remains to be determined whether β-catenin activity allows only early brain development or whether, upon amputation, unknown mechanisms operate at anterior wounds to overcome

temporarily the effect of *Smed-axins* or *Smed-APC-1* RNAi on β-catenin activity and consequently commit early brain primordia. Furthermore, we provide evidence of an indirect relationship between the Wnt/β-catenin and FGFR/ndk signaling systems in the control of the posterior limits of brain differentiation. Future studies will address the possibility that a feedback-loop between Wnt/β-catenin and the FGFR/ndk signaling systems controls AP patterning of the nervous system via effects on β-catenin activity.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.ydbio.2011.07.013.

Acknowledgments

The authors would like to thank F. Cebrià, J.M. Martín-Durán and I. Maeso for critically reading a version of the manuscript and all members of the E. Saló and F. Cebrià groups for helpful discussions. We also thank the anonymous reviewers for their valuable comments and suggestions for improving the manuscript; M.D. Molina and J.M. Martín-Durán for helping with quantitative real-time PCR; F. Cebrià, P. Newmark, H. Orii, K. Watanabe, T. Adell, M. Handberg-Thorsager and M. Sureda-Gómez for providing clones and reagents; I. Patten and A. King for editorial advice. M.I. is especially grateful to F. Cebrià for his support and advice during her doctoral training. The monoclonal antibody anti-SYNORF1 was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank. This work was supported by grant BFU2008-01544 from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain, and grant 2009SGR1018 (AGAUR) to E.S.; M. A. C. received an FPI fellowship from the MEC; M.I. received a fellowship from the University of Barcelona.

References

- Adell, T., Saló, E., Boutros, M., Bartscherer, K., 2009. *Smed-Evi/Wntless* is required for beta-catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration. *Development* 136, 905–910.
- Adell, T., Cebrià, F., Saló, E., 2010. Gradients in planarian regeneration and homeostasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000505.
- Agata, K., 2003. Regeneration and gene regulation in planarians. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 492–496.
- Agata, K., Umeson, Y., 2008. Brain regeneration from pluripotent stem cells in planarian. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 2071–2078.
- Agata, K., Soejima, Y., Kato, K., Kobayashi, C., Umeson, Y., Watanabe, K., 1998. Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. *Zool. Sci.* 15, 433–440.
- Almuedo-Castillo, M., Saló, E., Adell, T., 2011. Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 2813–2818.
- Ambrosetti, D., Holmes, G., Mansukhani, A., Basilico, C., 2008. Fibroblast growth factor signaling uses multiple mechanisms to inhibit Wnt-induced transcription in osteoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4759–4771.
- Bode, H.R., 2009. Axial patterning in hydra. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a000463.
- Boutros, M., Kiger, A.A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., Haas, S.A., Paro, R., Perrimon, N., 2004. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* 303, 832–835.
- Cebrià, F., Newmark, P.A., 2005. Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. *Development* 132, 3691–3703.
- Cebrià, F., Kobayashi, C., Umeson, Y., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Itoh, M., Taira, M., Sanchez Alvarado, A., Agata, K., 2002a. FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature* 419, 620–624.
- Cebrià, F., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Agata, K., 2002b. Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev. Growth Differ.* 44, 135–146.
- Chai, G., Ma, C., Bao, K., Zheng, L., Wang, X., Sun, Z., Saló, E., Adell, T., Wu, W., 2010. Complete functional segregation of planarian beta-catenin-1 and -2 in mediating Wnt signaling and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 285, 24120–24130.
- Collins III, J.J., Hou, X., Romanova, E.V., Lambrus, B.G., Miller, C.M., Saberi, A., Sweedler, J.V., Newmark, P.A., 2010. Genome-wide analyses reveal a role for peptide hormones in planarian germline development. *PLoS Biol.* 8, e1000509.
- Felix, D.A., Aboobaker, A.A., 2010. The TALE class homeobox gene *Smed-prep* defines the anterior compartment for head regeneration. *PLoS Genet.* 6, e1000915.
- Fraguas, S., Barberan, S., Cebrià, F., 2011. EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Dev. Biol.* 354, 87–101.
- Gurley, K.A., Rink, J.C., Sanchez Alvarado, A., 2008. Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science* 319, 323–327.

- Gurley, K.A., Elliott, S.A., Simakov, O., Schmidt, H.A., Holstein, T.W., Sanchez Alvarado, A., 2010. Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Dev. Biol.* 347, 24–39.
- Handberg-Thorsager, M., Saló, E., 2007. The planarian nanos-like gene *Smednos* is expressed in germline and eye precursor cells during development and regeneration. *Dev. Genes Evol.* 217, 403–411.
- Holland, L.Z., 2002. Heads or tails? Amphioxus and the evolution of anterior–posterior patterning in deuterostomes. *Dev. Biol.* 241, 209–228.
- Iglesias, M., Gomez-Skarmeta, J.L., Salo, E., Adell, T., 2008. Silencing of *Smed-betacatenin1* generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* 135, 1215–1221.
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M.C., Poulat, F., Behringer, R.R., Lovell-Badge, R., Capel, B., 2006. *Fgf9* and *Wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol.* 4, e187.
- Kobayashi, C., Saito, Y., Ogawa, K., Agata, K., 2007. Wnt signaling is required for antero-posterior patterning of the planarian brain. *Dev. Biol.* 306, 714–724.
- Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hrouda, M., Lentfer, J., Schmidt, H.A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M.Q., Holstein, T.W., 2005. Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433, 156–160.
- Lee, P.N., Pang, K., Matus, D.Q., Martindale, M.Q., 2006. A WNT of things to come: evolution of Wnt signaling and polarity in cnidarians. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, 157–167.
- Logan, C.Y., Nusse, R., 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810.
- Matsunaga, E., Katahira, T., Nakamura, H., 2002. Role of *Lmx1b* and *Wnt1* in mesencephalon and metencephalon development. *Development* 129, 5269–5277.
- Meinhardt, H., 2009a. Beta-catenin and axis formation in planarians. *Bioessays* 31, 5–9.
- Meinhardt, H., 2009b. Models for the generation and interpretation of gradients. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001362.
- Molina, M.D., Salo, E., Cebria, F., 2007. The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians. *Dev. Biol.* 311, 79–94.
- Molina, M.D., Neto, A., Maeso, I., Gomez-Skarmeta, J.L., Salo, E., Cebria, F., 2011. *Noggin* and *noggin*-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians. *Curr. Biol.* 21, 300–305.
- Morgan, T.H., 1901. *Regeneration*. Macmillan, New York. 316 pp.
- Newmark, P.A., Sanchez Alvarado, A., 2002. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat. Rev. Genet.* 3, 210–219.
- Oviedo, N.J., Newmark, P.A., Sanchez Alvarado, A., 2003. Allometric scaling and proportion regulation in the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev. Dyn.* 226, 326–333.
- Petersen, C.P., Reddien, P.W., 2008. *Smed-betacatenin-1* is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. *Science* 319, 327–330.
- Petersen, C.P., Reddien, P.W., 2009a. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 139, 1056–1068.
- Petersen, C.P., Reddien, P.W., 2009b. A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 17061–17066.
- Petersen, C.P., Reddien, P.W., 2011. Polarized notum activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration. *Science* 332, 852–855.
- Reddien, P.W., Sanchez Alvarado, A., 2004. Fundamentals of planarian regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 725–757.
- Reddien, P.W., Oviedo, N.J., Jennings, J.R., Jenkin, J.C., Sanchez Alvarado, A., 2005. *SMEDWI-2* is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* 310, 1327–1330.
- Rink, J.C., Gurley, K.A., Elliott, S.A., Sanchez Alvarado, A., 2009. Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia. *Science* 326, 1406–1410.
- Saló, E., 2006. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *Bioessays* 28, 546–559.
- Sanchez Alvarado, A., 2006. Planarian regeneration: its end is its beginning. *Cell* 124, 241–245.
- Sanchez Alvarado, A., Newmark, P.A., 1999. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5049–5054.
- Umesono, Y., Watanabe, K., Agata, K., 1997. A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev. Growth Differ.* 39, 723–727.
- Umesono, Y., Watanabe, K., Agata, K., 1999. Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes. *Dev. Genes Evol.* 209, 31–39.
- Yazawa, S., Umesono, Y., Hayashi, T., Tarui, H., Agata, K., 2009. Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior–posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 22329–22334.
- Zayas, R.M., Hernandez, A., Habermann, B., Wang, Y., Sary, J.M., Newmark, P.A., 2005. The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: analysis of ESTs from the hermaphroditic strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18491–18496.
- Zeng, L., Fagotto, F., Zhang, T., Hsu, W., Vasicek, T.J., Perry III, W.L., Lee, J.J., Tilghman, S.M., Gumbiner, B.M., Costantini, F., 1997. The mouse *Fused* locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* 90, 181–192.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Smed-axin A

RGS
 MSESFYQTESVNSLPLYSIPQLQNVVKVPTMEYVQTNQTDNPLVVDFKVLNDSQGVEIF 60
RGS
 RGFLESERVTHYLEFWFACQGFKSADREKVYQLIKVIYRAYIRSESKTAVPLQPNTKKNI 120
RGS
 VDKISSKQCLDQSFDTAQMEIRDVLIKEFYIRFIKSESFELYLQNSTSSDNSKSENLEN 180
 QIQNNIFRDVDCSHVNYSVNNASNHVSMK GKRRERSINSEIPTKTNKSKQCASGLNKDRRS 240
 IAEADPTSFVNQLNKRLEKVQLMQQCGISLQPDQKVVNIHVLDLVKTIDDDPESILDNHCS 300
 FLMDRDLNKNLVDVETITKQDTRDIRSVVSQDSGVATTFDPQWHNRPPYSQQIYNPSPI 360
 NPPWLSTPRQYRHHHHHDDHHFRTRRRNRSEDQSIYSLEECTSNQGPFFTRK GKSQASDA 420
 SSIFDSGVSSTYEQISHPMMVSSDRVSSWVNNHPGIVNTPVELTGNMKRSCSAQTPGYKE 480
DIX
 TINEGIESGPPGEVWIDAFVCVEAANNGD TYQEKVKAKGTCKGK GDSVIIIVGYFCGDPVP 540
DIX
 YRTQVPIGESGFTLGQFKMLLPRRGPYRYFFKRPCDEFDGGGAVQEEYTKMKMFFLCGKE 600
 KSLRKLKKWNHNNI* 614

Smed-axin B

RGS
 MKKVCHDNQTL DSSNAEYVVLQ TGSMSNNKPIVTKIDNLSLLLQESDSVTNFRLYLDSI 60
RGS
 NSGHFLDFWFACQGFKNFDRSDTHKLHQLTKVIYRAYIRSESPYAVPLKQNTKKSIVDKL 120
RGS
 SDRKCFDQSFDTAQLEIRDILSGEFLMNFQSDFYIEPKSFERNLLSNSSRIQEQISDI 180
 PVSSCSSSGHIGRKSSSARINAIASRGSEGVNDGNCNKGSTDNSFGQLYTAQNTGTITTV 240
 FNNNLMGNNGSGTGSKDRRNLSEIDPQAFAKLLYTKLEEIVVEEQMKFEKILRLVKSVPTE 300
 SDTDDSSSSAISYLMHCQWVHSQGANFKNSVDSSELVEAANALTMKASCKLKT TYRPGDLR 360
 DDHAQDILENHCLRIGLDEPATRHLKRELSDGKNRWRREHDLGSITSYDSGVATSLEQYS 420
 NLGIPGSILENVPWQKSNFKSLNLNEIGIDNSPSSHRYHHHHHHHHKHNHFLPKNQIVM 480
 ESTDASGFSYFKDSPTKKNISEVSSNFDSGVSSAYENMGRRFQPMNDKVS NWMCKNSNI 540
 TSTGPFNFHEYDSNNASGIPPNTPLISARGGFTSPSFCDIYPNQIYMLPKPIKQVNL YSP 600
 VPECDSIPHQSLESWLEQQATVSASALIGKTLKMNNTNLQKPCFCTNTAGINDLGFI APE 660
DIX
 ISEPCDNRDQAANDPKLNL TNKDSQITKTNTSSKSNLSLVVGYI GNDPVPYRTQIPDSQY 720
DIX
 ITLQFKSLVAKKGPFRYFFKRYCDEFDCGVVHEEIRDDAILPLWEGKVVAKIEKAE* 778

Fig. S1: Sequence analyses of both *Smed-axins* paralogs showing the conservation of the two conserved domains that characterize Axins: the RGS domain (Regulator of G protein signalling) near the NH2 terminus and the C-terminal DIX domain (Dishevelled/Axin homologous), which is necessary for homodimerization.

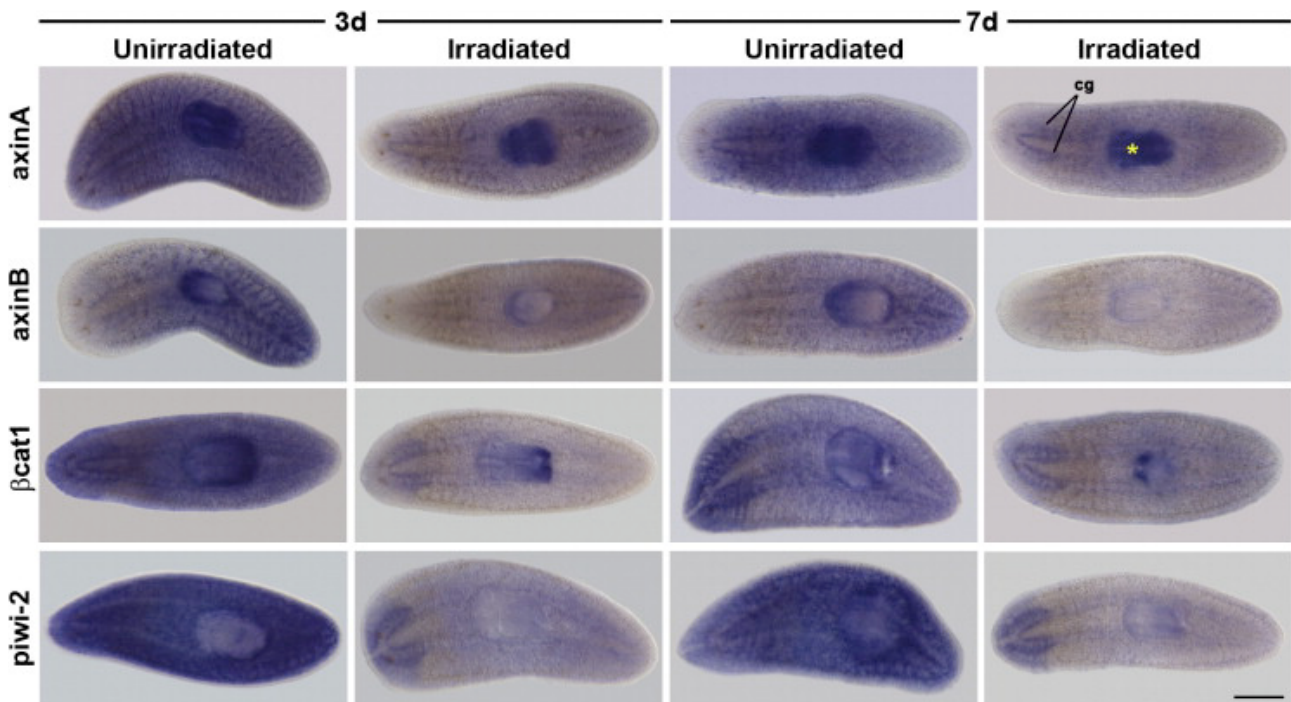


Fig. S2: Effects of γ -irradiation on *Smed-axins* and *Smed- β -catenin1* expression in intact planarians. *In situ* hybridization for *Smed-axinA*, *Smed-axinB* and *Smed- β -catenin1* 3 and 7 days after γ -irradiation reveals specific expression in both differentiated cells and neoblasts. *Smedwi-2* is a neoblast gene used as a control positive for genes affected by γ -irradiation (Reddien et al., 2005). Three days after γ -irradiation, expression of *Smed-axinA*, *Smed-axinB*, *Smed- β -catenin1*, and *Smed-piwi-2* is hardly detected in the mesenchyme. Also, no recovery of their expression is observed 7 days after γ -irradiation, suggesting that their expression is neoblasts or the progeny of newly divided cells (Eisenhoffer et al., 2008). *Smed-axinA* and *Smed- β -catenin1* expression in differentiated cells, such as the pharynx and cephalic ganglia, remains unaffected. Anterior is shown to the left. Yellow asterisk, pharynx; cg, cephalic ganglia; d, days after amputation. Scale bars, 500 μ m.

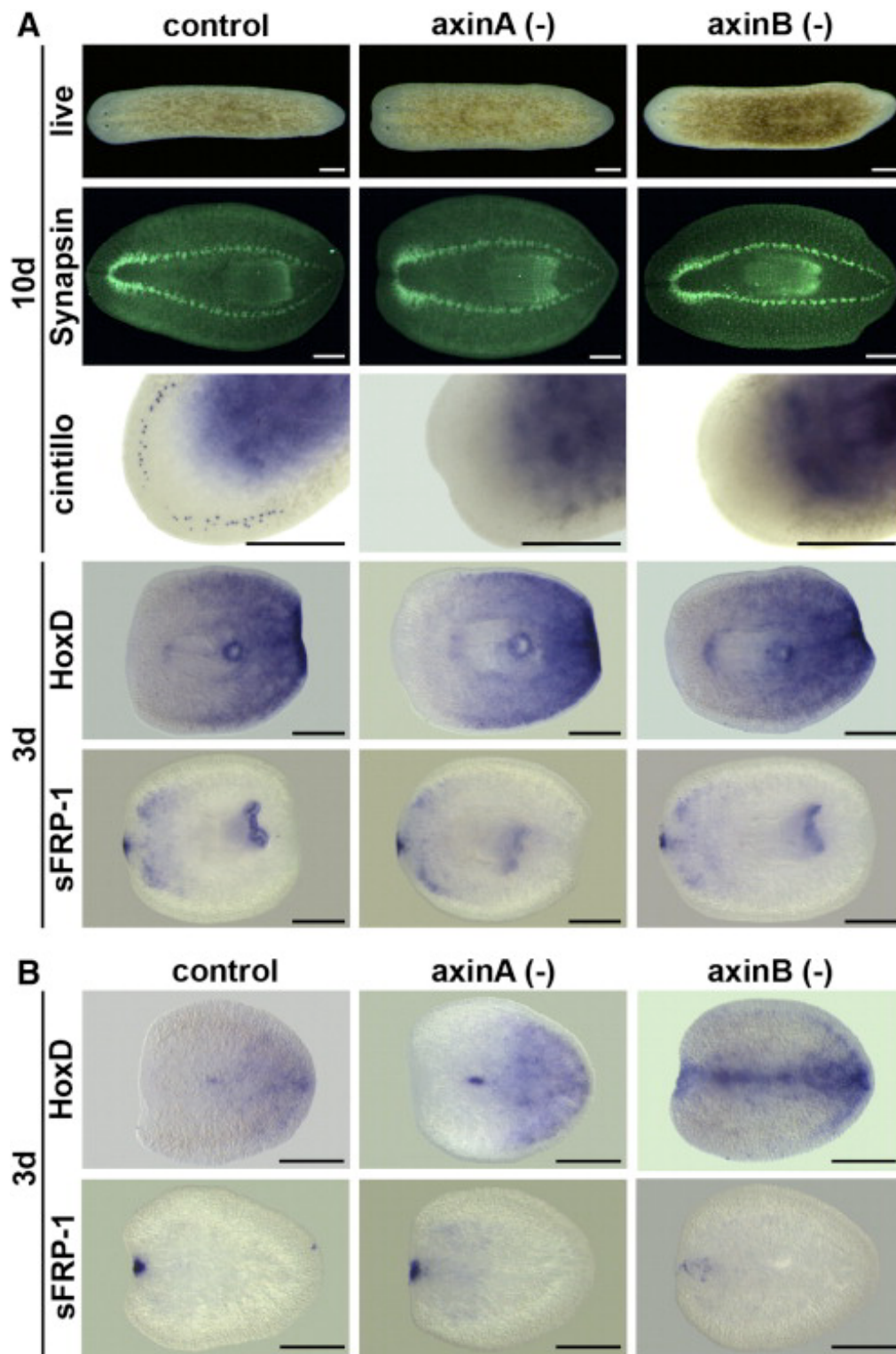


Fig. S3: *Smed-axinA* and *Smed-axinB* RNAi during regeneration

(A) Morphology of live animals and synapsin immunostaining show no clear anteroposterior defects in regenerating trunks after *Smed-axinA* or *Smed-axinB* single RNAi. Whereas posterior *Smed-HoxD* and anterior *Smed-sFRP1* expression is maintained after *Smed-axinA* or *Smed-axinB* single RNAi, expression of *cintillo*, which labels anterior chemoreceptors, disappears. All images correspond to regenerating trunk fragments. (B) Regenerating tails in *Smed-axinB* but not *Smed-axinA* RNAi-treated animals exhibit a posteriorized phenotype. Anterior is shown to the left. d, days after amputation. Scale bars, 300 μ m.

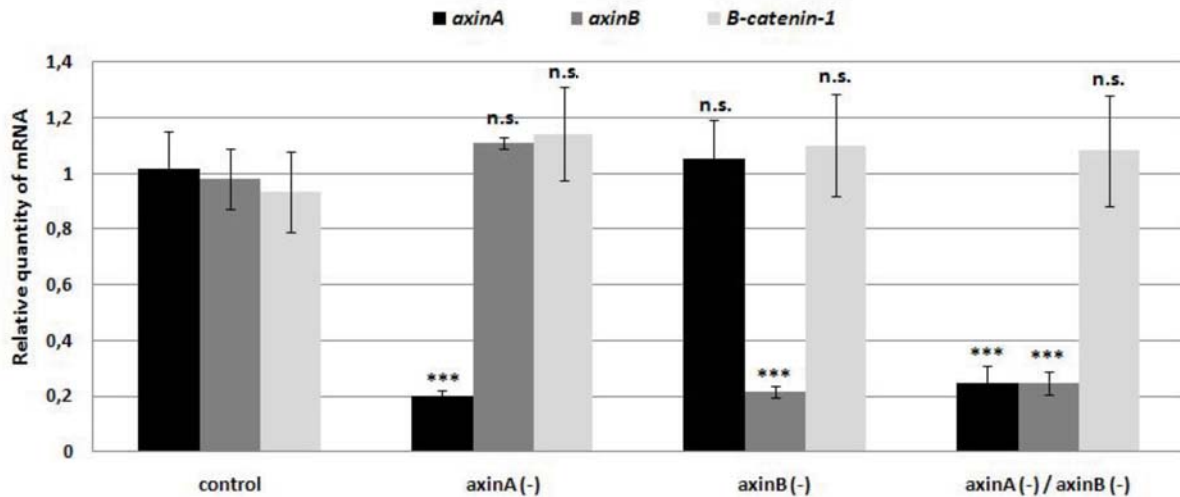


Fig. S4: Quantitative Real-Time PCR analysis after RNAi experiments. Graphical representation of the relative quantitative expression of *Smed-axinA*, *Smed-axinB* and *Smed-β-catenin1* in control (injected with GFP) and RNAi-treated animals after 3 days of regeneration. Whereas *Smed-β-catenin1* expression is not significantly affected, *Smed-axinA* and *Smed-axinB* are specifically and efficiently downregulated after single and double *Smed-axinA Smed-axinB* RNAi experiments. Values show means of three biological replicates; error bars are standard deviation. Statistical analyses with Student's *t*-test. *** $P < 0.001$; n.s, non-significant differences.

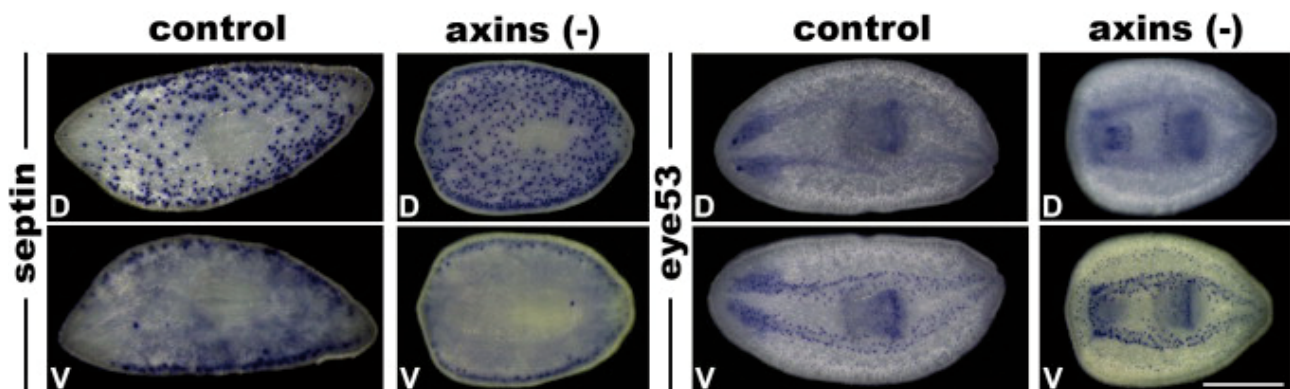


Fig. S5: The dorso-ventral (DV) axis is properly established after *Smed-axins* RNAi. Dorsal expression of *Smed-septin* and ventral expression of *Smed-eye53* are maintained in *Smed-axins* RNAi trunks after 11 days of regeneration. Anterior is shown to the left. D, dorsal side; V, ventral side. Scale bars, 500 μm .

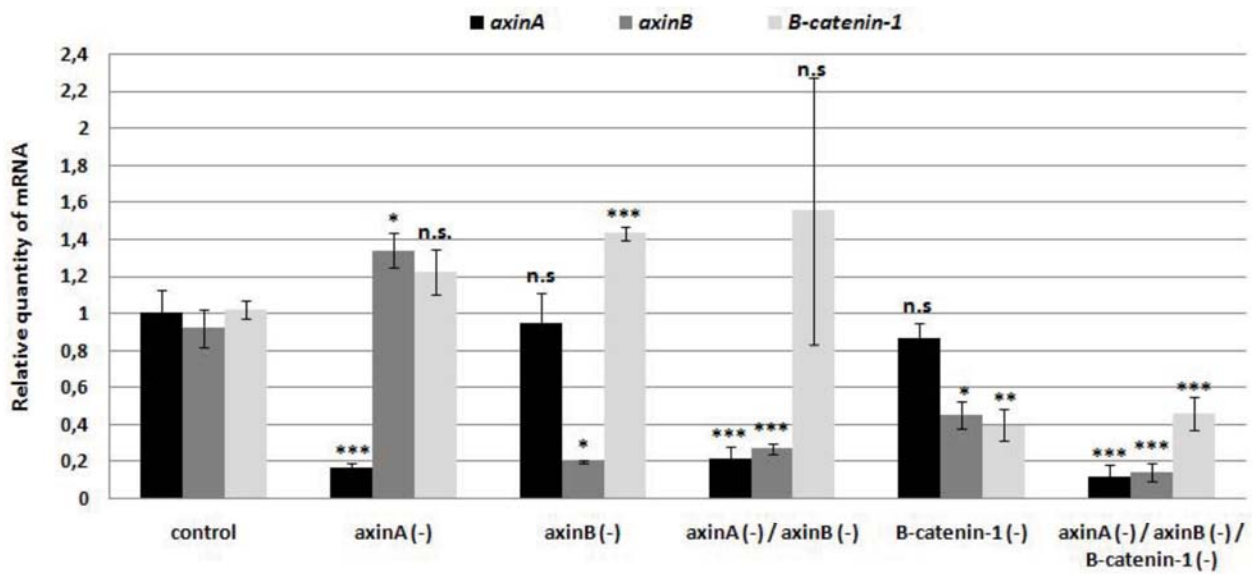


Fig. S6: Quantitative Real-Time PCR analysis after combinatorial RNAi experiments. Graphical representation of the relative quantitative expression of *Smed-axinA*, *Smed-axinB* and *Smed-β-catenin1* in control (injected with GFP) and RNAi-treated animals after 6 days of regeneration. *Smed-axinA*, *Smed-axinB* and *Smed-β-catenin1* are efficiently downregulated after single (*Smed-axinA*, *Smed-axinB*, or *Smed-β-catenin1*), double (*Smed-axinA**Smed-axinB*) and triple (*Smed-axinA**Smed-axinB**Smed-β-catenin1*) RNAi experiments. Interestingly, however, *Smed-axinB* is upregulated after *Smed-axinA* RNAi and downregulated after *Smed-β-catenin1*. These findings suggest that *Smed-axinB* expression could be under *Smed-β-catenin1* control and may participate in a negative feedback loop; this has been shown to be the case for *axin2* in vertebrates (Logan and Nusse, 2004). Note that *Smed-β-catenin1* is also upregulated after *Smed-axinB* RNAi, an effect that may reflect the complex feedback loops regulating the Wnt/β-catenin pathway. Despite *Smed-β-catenin* mRNA levels, β-catenin activity depends on protein stability regulated by the destruction complex in which axins operate. Values show means of three biological replicates; error bars are standard deviation. Statistical analyses with Student’s *t*-test. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.005$; * $P < 0.05$; n.s, non-significant differences.

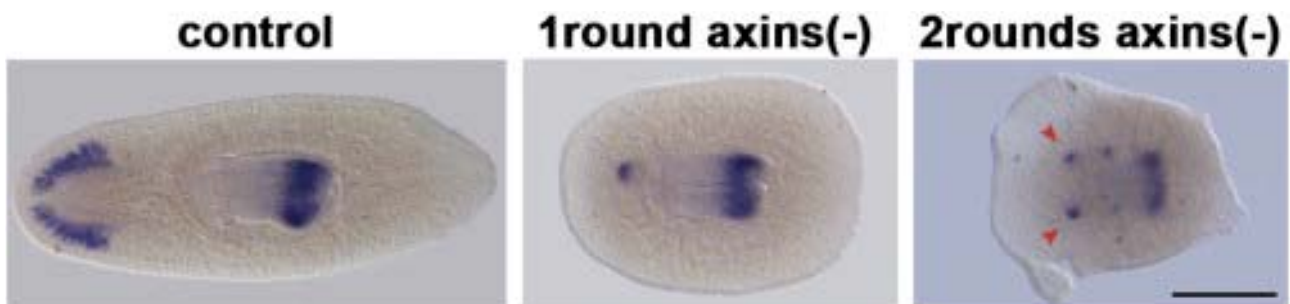


Fig. S7: Brain tissue differentiation after ectopic activation of the Wnt/β-catenin pathway is not a consequence of Axin protein persistence. *Smed-Gpas* expression shows that after two rounds of *Smed-axins* RNAi injection and amputation, brain primordia still differentiate in anterior wounds (red arrowheads). Images correspond to 12-day regenerating trunks (after the second amputation). Anterior is shown to the left. Scale bar, 500 μm.

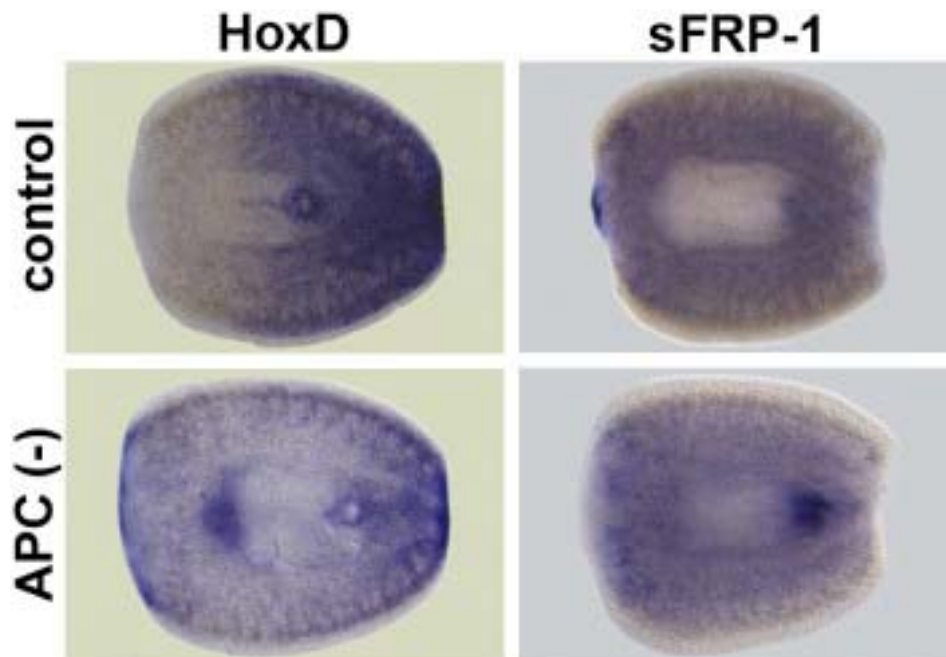


Fig. S8: *Smed-APC* RNAi phenocopies *Smed-axins* RNAi.

Analyses of *Smed-APC-1* RNAi with the same axial markers as *Smed-axins* RNAi (see Fig. 2). Expression of *Smed-HoxD* in anterior blastemas is accompanied by loss of anterior *Smed-sFRP1* expression, indicating that regenerating trunks are posteriorized in *Smed-APC* RNAi-treated animals. Images correspond to 3-day regenerating trunks. Anterior is shown to the left. Scale bar, 300 μ m.

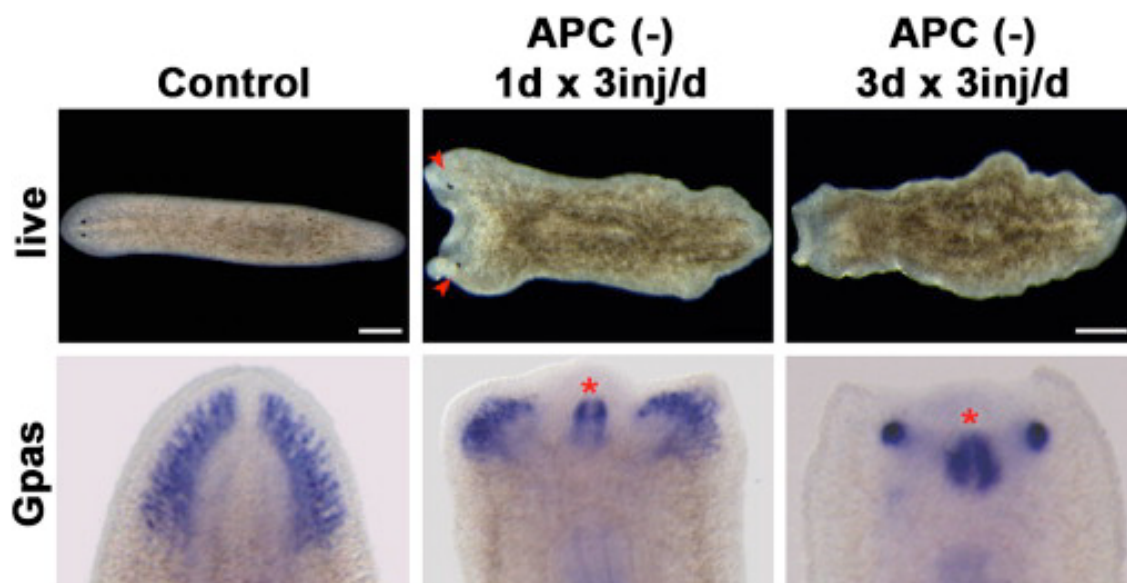


Fig. S9: Effect of lowering the dose of the *Smed-APC-1* dsRNA injection in brain development. Stereomicroscope views of the *Smed-APC-1* RNAi phenotype accompanied by *Smed-Gpas* marker analyses. When the dose of *Smed-APC* dsRNA was reduced to 1 instead of 3 standard injections, each brain primordium developed into a small brain able to differentiate eyes (red arrowheads). All images correspond to 12-day regenerating trunks. Anterior is shown to the left in live animals and to the top in all other images. 1 or 3d x 3 inj/d indicates that planarians were injected three times on 1 or 3 consecutive days, respectively; red asterisk indicates ectopic pharynx. Scale bars, 500 μ m for live images and 200 μ m for the rest.

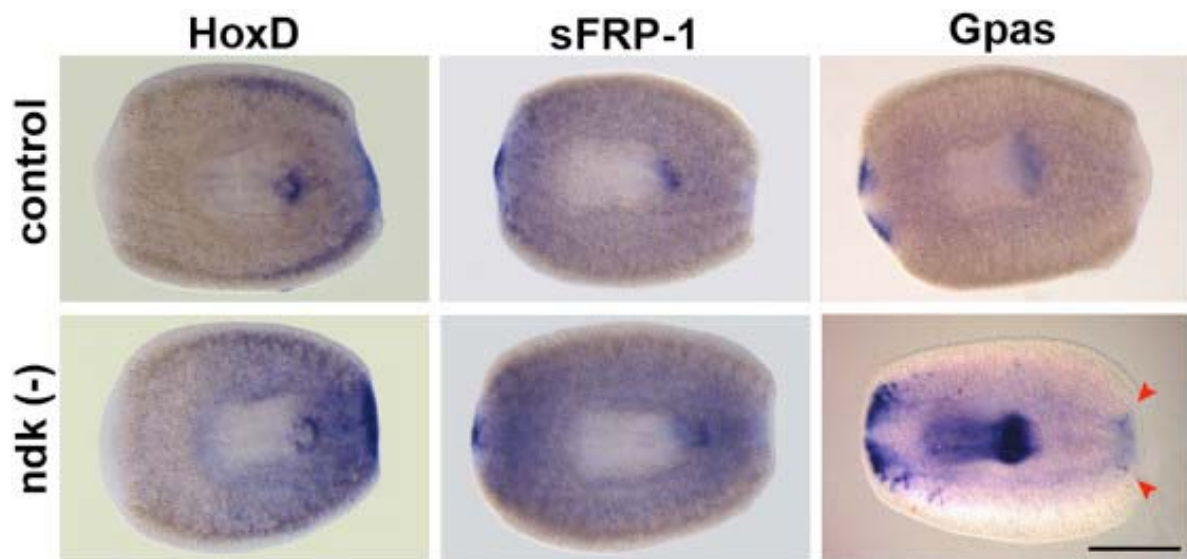


Fig. S10: Analysis of the *Smed-ndk* phenotype

Ectopic expansion of the brain revealed by *Smed-Gpas* expression occurs after *Smed-ndk* RNAi without disturbing posterior *Smed-HoxD* and anterior *Smed-sFRP1* expression. Note the differentiation of brain tissues at posterior wounds close to the blastema/post-blastema boundary (red arrowheads). Images correspond to 3-day regenerating trunks. Anterior is shown to the left. Scale bar, 300 μ m.

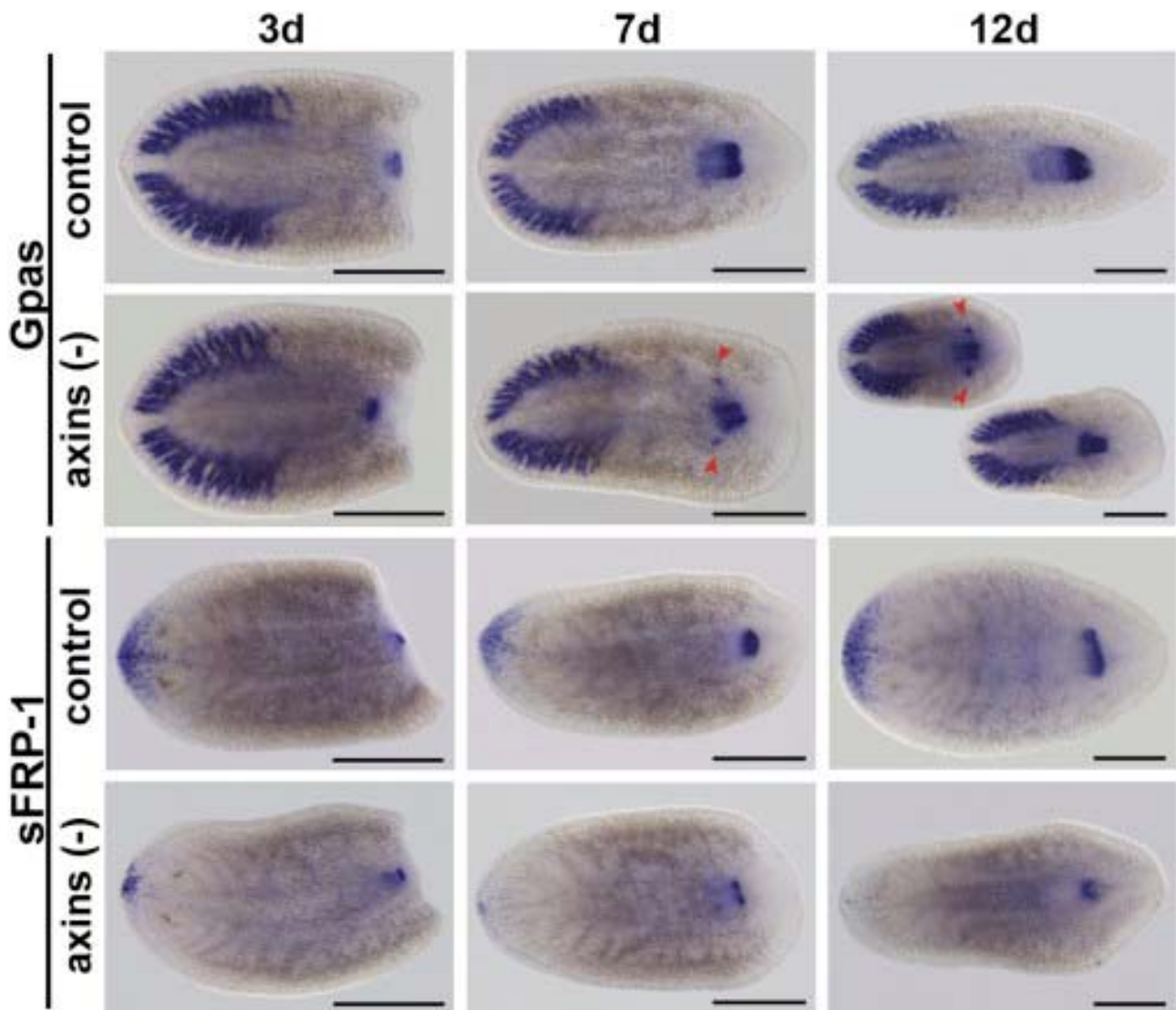


Fig. S11: *Smed-axins* RNAi regenerating head fragments show differentiation of brain primordia-like structures close to the pharynx. *Smed-Gpas* expression shows differentiation of brain primordia-like structures (red arrowheads) as a late response to amputation in the regenerating head fragments in which pharynxes are located at a distance from the pre-existing brain (see also Table S2). Anterior expression of *Smed-sFRP1* disappears, indicating that, although brain structures remain, a posteriorization event may have occurred in the regenerating head fragments. Anterior is shown to the left. d, days after amputation. Scale bars, 300 μ m.

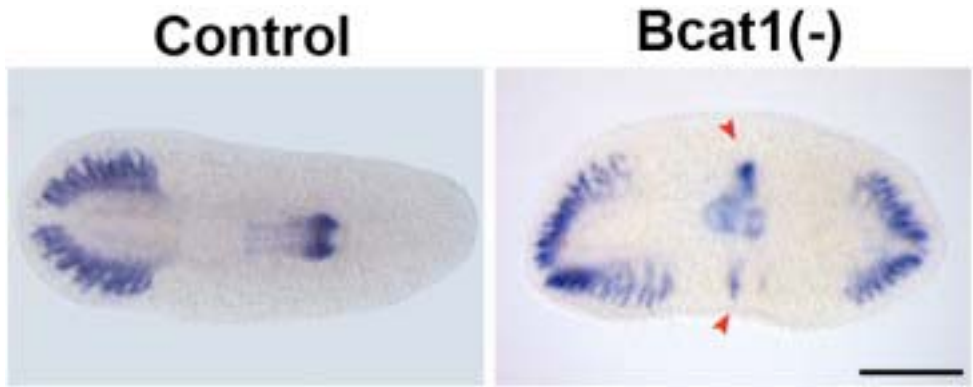


Fig.S12: Low doses of *Smed-β-catenin1* dsRNA injection also lead to the differentiation of two brain primordia-like structures close to the pharynx. *Smed-Gpas* expression shows that, besides the differentiation of the anterior and posterior brains, two brain primordia-like structures appear close to the pharynx (red arrowheads) after silencing of *Smed-β-catenin1*(see Materials and Methods). Images correspond to 26-day regenerating trunks. Anterior is shown to the left. Scale bar, 500 μm.

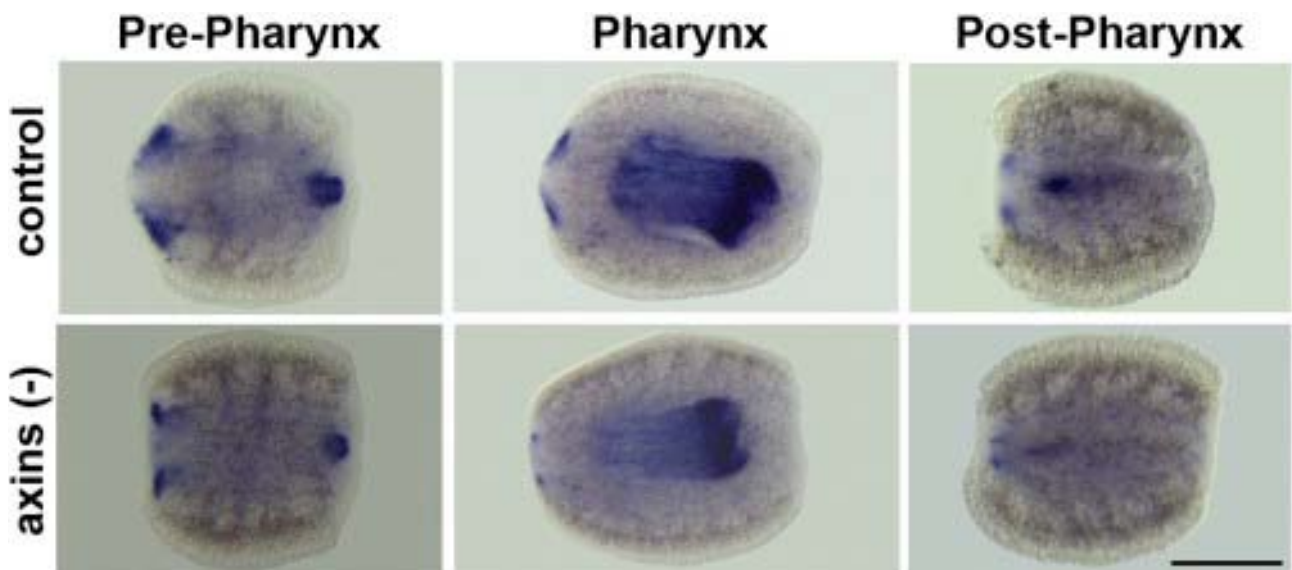


Fig. S13: *Smed-Gpas* expression during early regeneration of anteroposterior fragments. *Smed-Gpas* expression at 3 days post-amputation reveals differentiation of brain primordia at anterior wounds in all anteroposterior regenerating fragments, but not differentiation of brain primordia-like structures at this time. Brain primordia-like structures appear later (between 11-23 days after regeneration) as a remodeling response (see Fig. 9). Anterior is shown to the left. Scale bars, 300 μm.

Smed-axins phenotype		2-3 d n=23; 4exp	24-30d n=23; 5exp
Trunk	No brain primordia detected	4%	0%
	Brain primordia (Bp)	83%	26%
	Bp + Ectopic Pharynx	13%	30%
	Bp + Ectopic Pharynx + Bp-like next to the pharynx	0%	44%

Table S1: Quantification of the different phenotypes observed after *Smed-axins* RNAi at early and late stages of regeneration. n indicates the number of samples analyzed with *Smed-Gpas*; exp, number of different experiments; d, days after amputation.

Smed-axins phenotype		3 d	12-24d
Head	Brain primordia-like next to the pharynx	0% n=14; 4exp	50% n=36; 7exp
	Pharynx next to the brain	0% n=14; 4exp	39% n=36; 7exp

Table S2: Summary of the phenotypes obtained in relation to the differentiation of brain primordia-like structures in regenerating head fragments. n indicates the number of samples analyzed with *Smed-Gpas*; exp, number of different experiments; d, days after amputation.

Brain primordia-like next to the pharynx		1d x 3inj/d	3d x 3inj/d
Head	<i>Smed-axins</i> RNAi	25% n=8; 2exp	83% n=6; 2exp
	<i>Smed-APC-1</i> RNAi	20% n=5; 1exp	100% n=4; 1exp

Table S3: Dependence of differentiation of brain primordia-like structures on the injected dose of dsRNA. Quantification of 12-day regenerating heads with brain primordia-like structures after different doses of dsRNA injection. 1 or 3d x 3inj/d indicates that planarians were injected 3 times on 1 or 3 consecutive days, respectively; n indicates the number of samples analyzed with *Smed-Gpas*; exp, the number of different experiments.

Smed-axins (-) phenotype		Pre-pharynx		pharynx		Post-pharynx	
		3d	11-23d	3d	11-23d	3d	11-23d
Gpas	Bp + Ectopic Ph + Bp-l	0/7	15/34	0/7	1/28	0/7	0/20
	Bp + Ectopic Ph	7/7	11/34	0/7	5/28	0/7	1/20
	Bp	0/7	8/34	5/7	19/28	6/7	17/20

Table S4: Quantification of the temporal progression of the different phenotypes obtained in regenerating fragments from different anteroposterior levels. n indicates the number of samples analyzed with *Smed-Gpas*; d, days after amputation; Bp: brain primordia; Ectopic Ph, ectopic pharynx; Bp-l, brain primordium like.

References

- Eisenhoffer, G. T., Kang, H., and Sanchez Alvarado, A. (2008). Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell* **3**, 327-39.
- Logan, C. Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810.
- Reddien, P. W., Oviedo, N. J., Jennings, J. R., Jenkin, J. C., and Sanchez Alvarado, A. (2005). SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* **310**, 1327-30.

Anexo 2

Revisión 1:

“Wnt signaling in planarians: new answers to old questions”

María Almuedo-Castillo, Miquel Sureda-Gómez y Teresa Adell.

The International Journal of Developmental Biology, 56: 53-65.

Índice de impacto (2012): 2,614

Resumen en castellano:

La vía de señalización Wnt en planarias: nuevas respuestas para antiguas preguntas

Los ligandos Wnts son unas glico-proteínas secretables involucradas en una gran variedad de procesos celulares esenciales, como el control de la proliferación, la migración y la determinación de la identidad celular. En los últimos años, se han realizado muchos esfuerzos en dilucidar el papel de la vía de señalización Wnt durante la regeneración y la homeostasis de las planarias. Estas planarias tienen la increíble peculiaridad de que son capaces de regenerar cualquier fragmento amputado mimetizando a la perfección su identidad y proporción. En esta revisión, vamos a resumir toda esta información obtenida sobre la función de las vías Wnt canónica o β -catenin dependiente y Wnt no canónica o β -catenin independiente en planarias. También presentamos e intentamos poner en contexto todos los datos obtenidos que sugieren un papel de estas vías durante la embriogénesis de planarias. Finalmente, proponemos un modelo para integrar todos los datos obtenidos hasta el día de hoy y resaltamos aquellas preguntas que permanecen sin respuesta.

Wnt signaling in planarians: new answers to old questions

MARIA ALMUEDO-CASTILLO, MIQUEL SUREDA-GÓMEZ and TERESA ADELL*

Department of Genetics and Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

ABSTRACT Wnts are secreted glycoproteins involved in a broad range of essential cell functions, including proliferation, migration and cell-fate determination. Recent years have seen substantial research effort invested in elucidating the role of the Wnt signaling pathway in planarians, flatworms with incredible regenerative capacities. In this review, we summarize current knowledge on the role of canonical (β -catenin-dependent) and non-canonical (β -catenin-independent) Wnt signaling in planarians, not only during regeneration, but also during normal homeostasis. We also describe some of the preliminary data that has been obtained regarding the role of these pathways during embryogenesis. Models are proposed to integrate the different results which have been obtained to date and highlight those questions that still remain to be answered.

KEY WORDS: *planarian, Wnt signalling, regeneration, development, axial polarity*

Introduction

Wnt ligands are a family of secreted glycoproteins involved in cell-cell communication events that control every major developmental process, including cell-fate determination, cell proliferation, polarity, adhesion, motility, apoptosis, and hence, patterning and morphogenesis (reviewed in Mikels and Nusse 2006). Historically, Wnt ligands have been classified as canonical or non-canonical, depending on whether or not they lead to the activation of β -catenin. However, this classification may be artificial and the function of a specific Wnt ligand should not be understood as an intrinsic property of the ligand, but rather as a context-specific result of its interaction with different receptors (reviewed in van Amerongen and Nusse, 2009). Although the best known Wnt receptors belong to the Frizzled (Fz) family, other receptors, such as the tyrosine kinases Ror2 and RYK, have begun to be identified (Angers and Moon 2009).

The best understood Wnt signal-transduction cascade is the canonical pathway, in which binding of Wnt proteins to Frizzled/LRP5-6 receptors causes the recruitment and activation of Dishevelled, responsible for the disassembly of the β -catenin destruction complex, mainly composed of Axin, APC and GSK-3. As a consequence, β -catenin is stabilized and enters the nucleus, where it associates with Lef/Tcf transcriptional repressors, causing the derepression of transcriptional targets (reviewed in Huang and He, 2008). Thus, canonical Wnt signaling directly targets the nucleus, and it is broadly used to regulate cell fate, proliferation and self-renewal of stem and progenitor cells in any tissue and at any stage of metazoan life.

Despite the broad range of activities, β -catenin signaling is a strikingly conserved mechanism to pattern the antero-posterior (AP) axis in nearly all animals examined (reviewed in Petersen and Reddien, 2009). It controls specification of posterior identities in most bilaterian embryos (reviewed in Niehrs, 2010), and this role is conserved in adult stages during regeneration, as demonstrated in cnidarians (Hobmayer *et al.*, 2000) and in our current model, planarians.

By definition, Wnt signaling that does not lead to β -catenin activation is referred to as non-canonical or β -catenin independent. A number of non-canonical Wnt signaling pathways exist, including the planar cell polarity (PCP) pathway and the calcium pathway. PCP refers to the coordinated polarization of cells or structures in the plane of a tissue (Goodrich and Strutt, 2011). For instances, in *Drosophila* wing imaginal discs, where this phenomenon was first discovered, Dvl is recruited by a Fz receptor, promoting the asymmetric localization of the PCP core proteins within the cell, becoming the Fz-Dvl-Diversin/Diego (Div/Dgo) complex localized oppositely to the Strabismus/Van-Gogh (Stbm/Vang)-prickle (Pk) complex. The disruption of these protein asymmetries is manifested by the miss-orientation of wing hairs. Nowadays, β -catenin-independent pathways are linked to a highly diverse set of processes in both vertebrates and invertebrates. These include assembly and patterning of neural circuitry, convergent extension movements during gastrulation, orientation of cell division and planar polarization of cells and tissues (reviewed in Goodrich and Strutt, 2011). Although all these events occur in different biological contexts and they can

Abbreviations used in this paper: ap, antero-posterior; Fz, Frizzled; pcp, planar cell polarity.

*Address correspondence to: Teresa Adell. Department of Genetics and Institute of Biomedicine, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Catalonia, Spain. e-mail: tadellc@ub.edu

Final, author-corrected PDF published online: 16 March 2012

be viewed as independent from each other, their basis may be common: a concerted intracellular rearrangement controlled by regulating actin filaments, which models cell and tissue architecture.

The planarians are a particularly interesting model in which to explore the role of Wnt signaling in events as diverse as cell proliferation and patterning. These freshwater flatworms can regenerate a whole animal from almost any piece of their body. Although other species such as *Dugesia japonica*, are used by several research groups, *Schmidtea mediterranea* is now the most widely studied planarian species since its genome has been sequenced and several EST and transcriptomic databases have been generated. Since technology is also available for functional analysis using methods such as RNA interference (RNAi), it is well suited to experiments designed to unravel the molecular control of processes such as the re-establishment of tissue polarity during regeneration. In this review, we present the current data on the roles of the different

planarian Wnt signaling elements in development and regeneration and propose models to integrate the findings that have been obtained to date.

Canonical/ β -catenin-dependent Wnt signaling specifies posterior identity in adult planarians

Before the molecular era, generation of two-headed planarians was not a strange event. Morgan and Child observed that when a planarian is cut into extremely thin fragments, ‘two-headed’ or ‘janus headed’ planarians often develop (Morgan 1898; Child 1911). These observations were central to their proposal of a gradient, which Child supposed to be a ‘metabolic gradient’, responsible for AP axis patterning. According to this hypothesis, when the size of the sectioned planarian is very small, the difference in the activity of the ‘metabolic gradient’ between both edges is insufficient to instruct different fates in the two edges (reviewed in Blackstone 2006). The idea of a gradient underlying the bipolar anatomy of planarians has remained broadly accepted since its initial proposal by Morgan and Child (reviewed in Meinhardt 2009; Adell *et al.*, 2010). This parallels development in experimental embryology, where gradients have long been thought to be responsible for regulating axial development. It has now been demonstrated that the patterning of the AP axis (primary axis in prebilaterians) involves Wnts and β -catenin activity in almost all metazoans (reviewed in Petersen and Reddien, 2009; Niehrs, 2010).

The first and the most striking evidence for the essential role of canonical Wnt signaling in the specification of the planarian AP axis came from experiments involving silencing of *β catenin-1*. The *S. mediterranea* genome contains at least three β -catenins. *β catenin-1* seems to be both necessary and sufficient to transduce the canonical Wnt signal (Gurley *et al.*, 2008; Petersen and Reddien 2008; Iglesias *et al.*, 2008), whereas *β catenin-2* functions exclusively in cell-cell adhesion (Chai *et al.*, 2010). Although other organisms such as *C. elegans* and vertebrates also have genomic duplications of β -catenin, only planarians are known to exhibit a clear functional specialization between different paralogs. Thus, silencing of *β catenin-1* results in the complete loss of posterior and central identities and the generation of a fully anteriorized animal (Fig. 1 and 2). The planarians generated by *β catenin-1* silencing were referred to ‘radial-like hypercephalized’ planarian because of their almost radial symmetry. Such a striking transformation of the body plan as a consequence of targeting a single gene had no precedent. Consistent with the role of *β catenin-1* as an effector of a morphogenetic signal, decreasing doses of *β catenin-1* dsRNA generate a range of AP phenotypes. The strongest phenotype is the ‘radial-like hypercephalized’ planarian, followed by ‘two-headed’ planarians with multiple ectopic eyes, ‘two-headed’ planarians without ectopic eyes, and finally ‘tailless’ planarians, in which the tail has a rounded shape and the animals have two ventral nerve cords (VNCs) that fuse with a rounded morphology instead of connect-

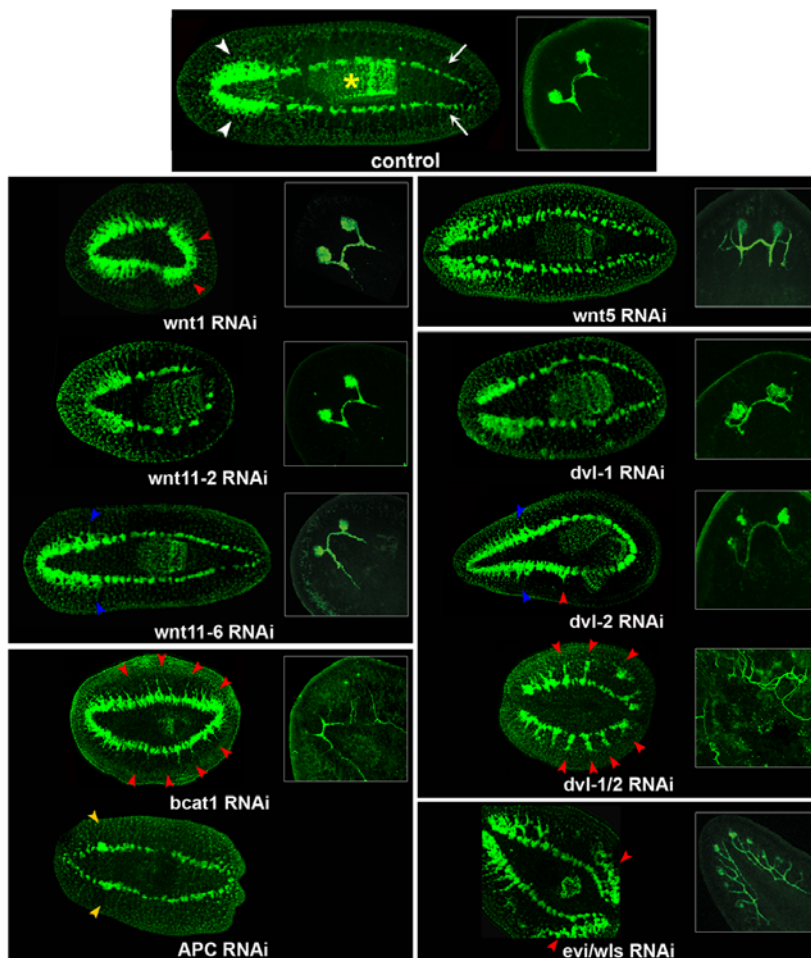


Fig. 1. Comparative analysis of the phenotypes generated after silencing different Wnt signaling elements. Immunohistochemistry with anti-synapsin (CNS) and anti-arrestin (VC-1) (visual system, within white squares) shows the CNS organization and paths of visual axons after different genetic ablations. In the control animal, the brain and the ventral nerve cords are labeled with white arrowheads and arrows, respectively. The pharynx is labeled with a yellow asterisk. In the silenced animals, the ectopic brain is labeled with red arrowheads, the expansion towards posterior of the brain is labeled with blue arrowheads and the two ectopic brain primordia are labeled with orange arrowheads. All animals correspond to trunk pieces after 12–20 days of regeneration. All images are confocal z-projections. Anterior is shown to the left.

Wnt signalling in Planarians

Gene	Expression	Phenotype	References
Evi-Wntless			Adell <i>et al.</i> (2009), Almuedo-Castillo <i>et al.</i> (2011)
Wnt1			Adell <i>et al.</i> (2009), Almuedo-Castillo <i>et al.</i> (2011), Gurley <i>et al.</i> (2010), Kobayashi <i>et al.</i> (2007), Petersen & Reddien (2008, 2009)
Wnt2			
Wnt5			
Wnt11.1			
Wnt11.2			
Wnt11.3			
Wnt11.4			
Wnt11.5			
Wnt11.6			
Wnt11.2(RNAi)			
Wnt11.6(RNAi)			
sFRP-1		—	Gurley <i>et al.</i> (2008), Petersen & Reddien (2008), Gurley <i>et al.</i> (2010)
sFRP-2		—	
sFRP-3		—	
Fz-A		—	Gurley <i>et al.</i> (2008), Petersen & Reddien (2009), Yazawa <i>et al.</i> (2009), Iglesias <i>et al.</i> (2011)
Fz-4		—	
Dvl-1			Gurley <i>et al.</i> (2008), Almuedo-Castillo <i>et al.</i> (2011)
Dvl-2			
GSK3-1			Adell <i>et al.</i> (2008)
GSK3-2		—	
GSK3-3		—	
APC			Gurley <i>et al.</i> (2008), Iglesias <i>et al.</i> (2011)
Axin-A			Iglesias <i>et al.</i> (2011)
Axin-B			
β -catenin-1			Gurley <i>et al.</i> (2008), Iglesias <i>et al.</i> (2008), Petersen & Reddien (2008), Chai <i>et al.</i> (2010)
β -catenin-2			
Vang-1			Almuedo-Castillo <i>et al.</i> (2011)
Vang-2			
Div			Almuedo-Castillo <i>et al.</i> (2011)

Fig. 2. Schematic summary of the expression patterns of Wnt elements and the phenotype generated after they are silenced. Gene expression is depicted in stripes when different paralogs are expressed in the same region. The features displayed in the phenotypes are the pattern of the CNS (brain in blue and ventral nerve cords in green), the eyes, the number and position of the pharynx and the organization of the epidermal cilia (apically located and well oriented, as in a wild-type situation, or internalized and with less density, after knockdown of components of the planar cell polarity pathway). In the case of the Wnt ligand family, only the ones for which a phenotype is obtained upon silencing are shown. The phenotype of vang-1/2 and div RNAi planarians corresponds to a control phenotype apart from the positioning of the cilia.

ing in the tip of the tail (Iglesias *et al.*, 2008; Adell *et al.*, 2010). Silencing of both *S. mediterranea* *dvl*s (*dvl-1* and *-2*) also results in the complete loss of posterior identity (Gurley *et al.*, 2008; Almuedo-Castillo *et al.*, 2011). Moreover, both paralogs seem to be functionally specialized, and only *dvl-2* is clearly involved in β -catenin-dependent signal transduction (Almuedo-Castillo *et al.*, 2011) (Fig. 1 and 2). Furthermore, silencing of *S. mediterranea* *APC* or *axins* (*axin-A* and *-B*), two elements of the β -catenin destruction complex, leads to posteriorized or ‘two-tailed’ planarians (Gurley *et al.*, 2008; Iglesias *et al.*, 2011) (Fig. 1 and 2).

The *S. mediterranea* genome contains a large Wnt family comprising 9 members (Petersen and Reddien 2008; Adell *et al.*, 2009; Gurley *et al.*, 2010). Although their phylogenetic relationship has not been definitely solved, 6 of them have been classified in the Wnt11 subfamily (*wnt11-1* to *-6*) and the other three each belongs to a different subfamily: Wnt-1 (*wnt1*); Wnt-2 (*wnt2*), and Wnt-5 (*wnt5*). With the exception of *wnt11-3* (formerly known as *wntP-4*), for which expression has never been detected, all of the *S. mediterranea* Wnts display a very specific expression pattern (Fig. 2). *wnt11-6* (formerly *wntA*, based on homology to the first reported *D. japonica* WntA) is expressed in the posterior part of the brain and in the pharynx, and causes posterior expansion of the brain when silenced (Kobayashi *et al.*, 2007; Adell *et al.*, 2009). *wnt11-4* (formerly *wntP-3*) is expressed in clusters of cells in the esophagus and also in isolated cells in the posterior part of the animals (Petersen and Reddien 2008; Gurley *et al.*, 2010), and *wnt-2* is detected laterally in the head region. However, no phenotype has been reported after silencing of these genes. *wnt5* is expressed from the most external region of the CNS to the lateral edges of the planarian (Adell *et al.*, 2009; Gurley *et al.*, 2010; Almuedo-Castillo *et al.*, 2011). Its role will be discussed in the corresponding section, as it clearly functions as a non-canonical Wnt in our model.

In this section we will focus on the ‘posterior’ Wnts, expressed in the posterior part of the intact planarians. *wnt1* (formerly *wntP-1*) is expressed in a row of discrete cells exclusively in the posterior dorsal midline (Petersen and Reddien 2008; Gurley *et al.*, 2010), *wnt11-1* and *2* in a broader domain in the tail (Petersen and Reddien 2008; Adell *et al.*, 2009), and *wnt11-5* (formerly *wntP-2*) as a gradient from the tail to the prepharyngeal region (Petersen and Reddien 2008; Petersen and Reddien 2009) (Fig. 2). Interestingly, during regeneration, their mRNA appears gradually. The first Wnt expressed is *wnt1* in individual cells in both anterior and posterior blastemas. In fact, it has been shown to be activated in response to any wound as early as 6 hours after amputation (Petersen and Reddien 2009; Gurley *et al.*, 2010). At 48 hours, its expression is restricted to the posterior midline, resembling the pattern in the intact animals. *wnt11-1* and *2* are not detected until 48 hours after amputation, when they appear exclusively in the posterior blastema (Adell *et al.*, 2009; Gurley *et al.*, 2010). *wnt11-5* expression is known to be triggered by *wnt1* and β -catenin at posterior wounds at 24 h post-amputation (Petersen and Reddien 2009). As is already expressed in the trunk region of intact animals, it does not disappear after amputation but moves posteriorly as regeneration proceeds, in parallel to the morphogenetic changes and establishment of new AP identities (Fig. 3). It is interesting to note that the wound induced *wnt1* expression and the dynamics of *wnt11-5* expression are not affected after ablation of neoblasts by irradiation, suggesting that, although proper morphallactic remodeling cannot take place, the first global response to the new positional identities are stem cell

independent (Petersen and Reddien 2009; Gurley *et al.*, 2010).

Functional analysis of the ‘posterior’ Wnts by RNAi demonstrates that *wnt1* signals through a canonical pathway, since its silencing produces ‘two-headed’ planarians (Fig. 1 and 2). However, the loss of polarity is achieved in a very low percentage of animals, and after silencing of *wnt1*, most of the animals appear with the same ‘tailless’ phenotype already reported to be generated after low-level silencing of β catenin-1 and *dvl-2* (Adell *et al.*, 2009; Almuedo-Castillo *et al.*, 2011). Planarians in which *wnt11-2* has been silenced also display the ‘tailless’ phenotype, but never a reversal of polarity (Fig. 1 and 2). No phenotype is reported after individual silencing of the other posterior Wnts. Based on their expression pattern and functional data, it has been suggested that synergistic effects of several posterior Wnts account for the graded activation of β -catenin along the planarian AP axis, as it has also been proposed in cnidarians (reviewed in Guder *et al.*, 2006). Specifically, *wnt1* is thought to activate *wnt11-5* through β catenin-1 and both would be responsible for patterning the posterior end. This relationship is supported by the observation that silencing of *wnt11-5* together with *wnt1* increases the proportion of ‘two-headed’ planarians (Petersen and Reddien 2009). It has also been proposed that *wnt11-2* could be a target of β catenin-1 (Yazawa *et al.*, 2009), but synergistic effects have never been demonstrated. Remarkably, *wnt11-5* expression appears just after *wnt1* and before *wnt11-1/2* during regeneration of head fragments, which normally do not express posterior Wnts (Petersen and Reddien 2009). Thus, current data suggest that *wnt1* and *wnt11-5* act through β catenin-1. However, the canonical role of *wnt11-1* and *2* remains to be demonstrated. After silencing of *wnt11-2*, genes expressed in the midline of planarians fail to properly localize along the posterior midline of the animal, but are detected as dispersed cells around the rounded tail. It has therefore been proposed that *wnt11-2* is required for recruitment of midline cells rather than for establishment of posterior identity (Gurley *et al.*, 2010). It is possible that *wnt11-2* controls the cell migration or the oriented cell division required to extend the posterior axis, similar to the non-canonical function of Wnt-11 and Dishevelled in AP elongation of the epiblast during vertebrate gastrulation (Gong *et al.*, 2004).

Interestingly, ‘radial-like hypercephalized’ planarians are never generated when *wnts* are silenced alone or in combination (Adell *et al.*, 2009; Petersen and Reddien 2009). To explain this observation it could be proposed that inputs from different Wnts could control activation of β catenin-1. Although some Wnt ligands are more relevant than others in targeting a specific response, receptors are the key components to initiate the different cascades (van Amerongen and Nusse, 2009). We can thus expect some degree of rescue by the other Wnt ligands that preferentially signal through different receptors. An alternative explanation is that RNAi targeting of a single intracellular element, which probably has a short half-life, is much easier than silencing several more stable secreted proteins. Finally, the available data also suggest that the position within the pathway at which the silenced gene acts can be decisive. For instance, silencing of *S. mediterranea* dishevelleds, an intracellular element common to every Wnt branch and that directly controls β -catenin degradation, produces a rapid and complete anteriorization of treated planarians (Fig. 1 and 2). In contrast, silencing of *evi/wls*, a transmembrane protein required for secretion of Wnts, only produces bipolar ‘two-headed’ animals with multiple eyes, even when two rounds of injection/regeneration

Wnt signalling in Planarians

are performed (Adell *et al.*, 2009; Almuedo-Castillo 2011) (Fig. 1 and 2). As expected, silencing of those elements also produces β -catenin independent defects, which will be discussed in the corresponding section.

Canonical Wnt activation is responsible for posterior specification during regeneration but also during homeostasis in intact planarians. Injection of β catenin-1 or *dvl-1/2* dsRNA generates fully anteriorized animals even when no injury has been induced (Peteresen and Reddien 2008; Iglesias *et al.*, 2008; Almuedo-Castillo *et al.*, 2011). This is not surprising if we consider that the mechanisms of pattern formation should always be active in planarians, which are continuously renewing their tissues and setting them to new proportions, for instance when adjusting their size to food availability. However, silencing of other elements of the pathway such as *wnt1* during homeostasis does not generate “two-headed” planarians, supporting that during regeneration, the early posterior-fate choice of *wnt1* takes place just in response to a wound. Amputation forces the regeneration of new tissues and, thus, de novo synthesis of proteins. In general, quicker and stronger effects are observed in regenerating than in intact animals. However, we should bear in mind that homeostasis and regeneration, particularly during early stages, are unlikely to involve the same molecular inputs and responses. During regeneration, cells must adopt completely different fates with respect to their original position and, thus, very early signals must re-direct their fate in a context of high rates of apoptosis and proliferation. In contrast, the changes in tissue fates during homeostasis are more progressive and follow already established patterns. For that reason it is important to pay attention to the expression pattern of genes that show a polarized expression at specific time points. The current data will be discussed below in an attempt to propose a general model for the re-establishment of AP pattern during regeneration.

Alternative mechanisms involved in planarian antero-posterior axis specification

Although canonical Wnt signaling is essential for patterning the AP axis in adult planarians, other pathways, such as the hedgehog (Hh) pathway, are known to be involved in establishing and maintaining polarity (Rink *et al.*, 2009; Yazawa *et al.*, 2009). Silencing of the planarian homologs of Patched, a Hh receptor with inhibitory activities, generates ‘two-tailed’ planarians, whereas inhibition of the planarian homologs of Hh, Gli-1 or Smo induces anteriorization (Fig. 3). However, inhibition of Hh signaling generates posterior heads in only a few animals, and the effect is only more penetrant when two of the elements are silenced simultaneously or two rounds of regeneration are induced (Yazawa *et al.* 2009). In most animals, *Hh* silencing leads to a ‘no-tail’ phenotype (Fig. 3) that differs from the ‘tailless’ phenotype generated after β catenin/*wnt1/wnt-11-2* RNAi (Fig. 2). In fact, after *Hh* silencing, the posterior marker Fz4 does not disappear, demonstrating that posterior identity is not completely abolished

(Rink *et al.*, 2009). The essential difference between the ‘tailless’ and the ‘no-tail’ phenotype is that in the first the VNCs and gut do differentiate but do not end at a posterior tip, while in the second the structures fail to differentiate. Those differences could reflect a secondary role for Hh in proliferation and growth, in addition to the one in fate determination.

Simultaneous silencing of *patched* and β catenin-1 produces anteriorized animals, demonstrating that Hh acts upstream of β -catenin (Rink *et al.*, 2009). The expression patterns of the components of the Wnt pathway, together with the observation that Hh transcripts are found not in the posterior blastema cells but in the preexisting VNCs, led Yazawa *et al.*, (2009) to propose a model in which Hh might be transported posteriorly along axons in the VNCs. According to that model, Hh would then be responsible for the activation of *wnt1*, which would lead to the activation of β catenin-1 and *wnt11-2*. This model is very suggestive, since, after amputation, planarians would regenerate according to the existing AP polarity of the fragment. If a directional signal exists, this is inherent to the existing CNS, and the fact that, after amputation, adjacent cells adopt different fates according to each blastema would be easily explained. As argued by the authors, a recent report demonstrating that voltage-gated Ca^{2+} channels are involved in the acquisition of proper polarity during regeneration (Noggi *et al.*, 2009) would agree with this model, as Ca^{2+} channels are essential for microtubule assembly and axonal transport (Rajnicek and McCaig, 1997). However, it should be noted that, at least at



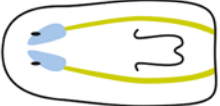


Gene	Phenotype	References
<i>notum(RNAi)</i>		Petersen & Reddien (2011)
<i>islet(RNAi)</i>		Hayashi <i>et al.</i> (2011)
Hedgehog Pathway <i>hedgehog(RNAi)</i> <i>gli-1(RNAi)</i> <i>smo(RNAi)</i>		Rink <i>et al.</i> (2009), Yazawa <i>et al.</i> (2009)
<i>ptc(RNAi)</i> <i>sufu(RNAi)</i>		
<i>inx5+13;12(RNAi)</i>		Oviedo <i>et al.</i> (2010)

Fig. 3. Schematic representation of the antero-posterior defects generated after modulating “non-Wnt” elements. The features displayed in the phenotypes are the pattern of the CNS (brain in blue and ventral nerve cords in green), the eyes, and the number and position of the pharynx. Silencing of *notum* or inhibitory elements of the Hh pathway induce “two-tailed” planarians. Silencing of activators of the Hh pathway or of Hh itself produces posterior regeneration defects. RNAi of *islet* leads to ‘tail-less’ regeneration phenotype. Downregulation of *innexins* generates ‘two-headed’ planarians. The pharynges of *notum* RNAi planarians are represented by dots because the exact position and number have not been precisely determined.

the mRNA level, *ptc* expression does not show any asymmetry between 3 and 48 hours (Rink *et al.*, 2009).

Perhaps more interesting is the recent study by Beane *et al.*, (2011), who demonstrated that membrane depolarization is sufficient to drive anterior regeneration, even in posterior wounds, and that calcium signaling is at least one of the target effects of the depolarization. Taken together, these data highlight the essential role of ion transport as an early signal to regulate differential gene expression and to control polarity and morphogenesis.

The existence of long-distance communication mechanisms to rapidly inform cells of changes occurring during planarian regeneration is an attractive model. Further support for this mechanism comes from the work from Oviedo *et al.*, (2009) linking gap junctional communication with the integrity of the VNCs and the transport of signals such as Hh (Oviedo *et al.*, 2009). Gap junctions are plasma membrane channels involved in cell-cell communication via the direct transfer of small molecules between adjacent cells. They are known to be involved in syncytial communication between cell groups and to regulate many aspects of embryonic development (Levin *et al.*, 2007). The *S. mediterranea* genome contains a large family of innexins, the gap junctional components found in invertebrates, (Nogi and Levin 2005), and when their function is blocked, ‘two-headed’ planarians are generated (Nogi and Levin 2005; Oviedo *et al.*, 2009) (Fig. 3). Oviedo *et al.*, performed multiple experiments to block either innexins or the continuity of the VNCs during the process of regeneration and analyzed the polarity of the regenerated animals. Interestingly, they found that fragments containing the brain always regenerated a normal tail, even if the VNCs were disrupted or gap junctions blocked. However, when the VNCs were disrupted alongside blockade of gap junctions, the AP identity of the blastema was abnormal and ectopic posterior heads developed even in fragments containing the brain. Those results demonstrate an essential role of the pre-existing CNS in polarity specification and suggest that blastemas receive the information by at least two mechanisms: gap junctions and VNCs. Interestingly, both signals act very early and rapidly, as they are critical during the first 3-6 hours.

The strong phenotypes generated when modulating canonical Wnt signaling, suggest that the integration of information essential for AP patterning in adult planarians—irrespective of whether this occurs through long-range signals or local cues—acts at the level of β catenin-1 activity, and that other signals or mechanisms involved in AP patterning would function by regulating this activity. The interaction between the Hh and the Wnt pathway is an established mechanism for pattern formation during development. For instance, the absence of Shh signaling in vertebrates results in direct inhibition of β -catenin activity by Gli3R (Ulloa *et al.*, 2007). These findings are clearly consistent with the proposed cross-talk between Wnt and Hh signaling in planarians. On the other hand, it is not known whether Wnts can travel through gap junc-

tions. However, both Innexins and Connexins, in invertebrates and vertebrates, respectively, appear to be regulated by Wnt signaling (reviewed in Bauer *et al.*, 2005). Further studies will now be necessary to determine how these different mechanisms work together to control AP patterning.

Early fate decisions and the role of locally secreted wound-activated signals: proposing models for antero-posterior axis establishment

Based on gene expression pattern and kinetics, we have grouped the molecular events underlying regeneration into three theoretical

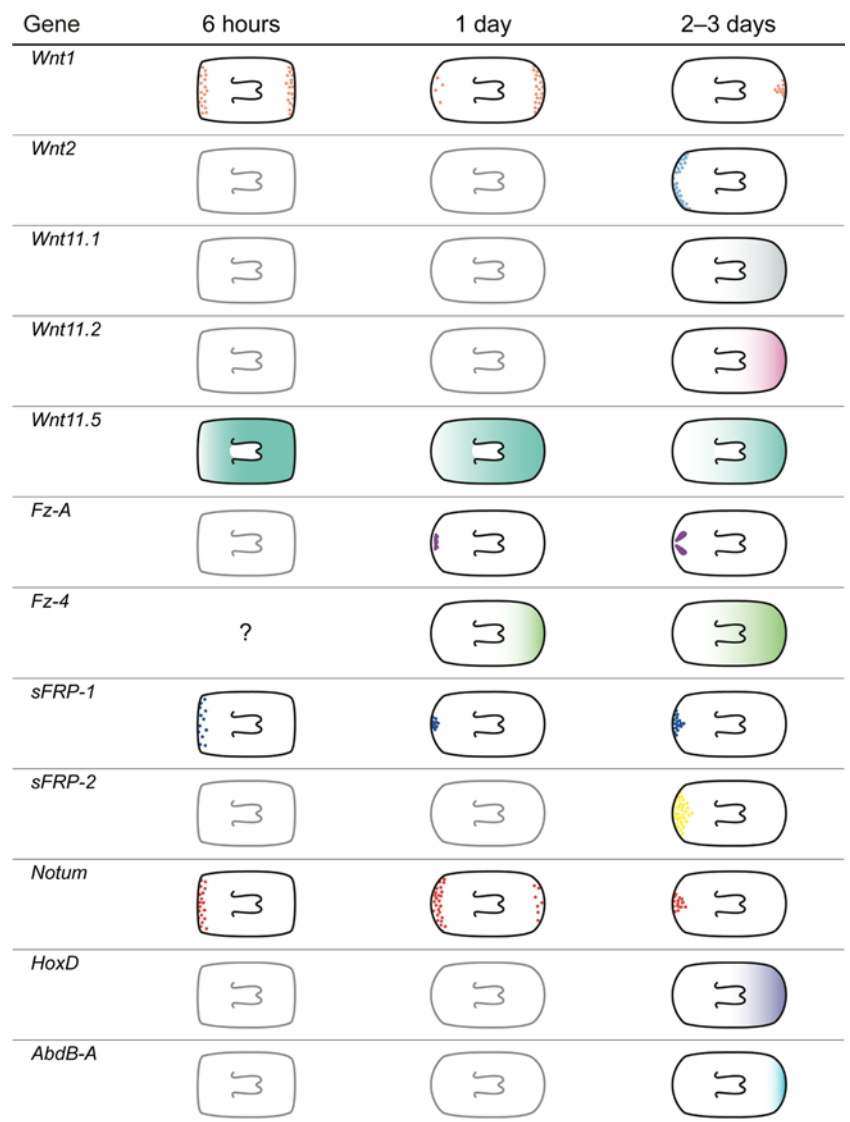


Fig. 4. Schematic representation of polarized gene expression during early regeneration. The first genes appearing in response to the wound are *wnt1*, *sFRP-1* and *notum*, although only *sFRP-1* exhibits permanent polarize expression in the anterior wounds. One day after amputation, *fzA* and *fz4* appear in the anterior and in the posterior wounds, respectively. At 3 days, all the known polarized genes are already detected, showing their anterior or posterior location, as well as *wnt1* and *notum*, which show their final polarized pattern. *wnt11.5* expression gradually moves posteriorly, in parallel to the re-patterning of the planarian fragment.

Wnt signalling in Planarians

stages. The earliest stage extends from wound healing to 18-24 hours after amputation. During this time, the expression pattern of several genes is “reset” and expression is either undetectable or found in regions that differ from those seen in adult planarians. It is important to note that AP decisions and cell-fate remodeling at this time are independent of stem cell proliferation (Petersen and Reddien 2009; Gurley *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2011). The second stage is from 18-24 hours to 3 days. During this period, most genes begin to be expressed in a definitive pattern. During the last stage, from 3 days to the end of regeneration, genes are clearly expressed in the primordia of the differentiating tissues and organs.

Currently available data suggest that the critical decisions influencing the establishment of axial polarity and appropriate cell fates are taken during the first stage. At that time, *wnt1* is activated at any wound in a set of isolated cells before becoming restricted to the most posterior dorsal midline during the second stage. The recently identified planarian homolog of Notum, a secreted hydrolase that modulates the range of action of Wnt ligands, is also critical for the acquisition of AP polarity. *notum* is highly up-regulated preferentially in anterior wounds as soon as 6 hours after amputation, and later on, at around 2 days, accumulates in the most anterior tip of the blastema; in intact animals it is exclusively expressed in the anterior-dorsal end (Petersen and Reddien 2011) (Fig. 4). Importantly, like *wnt1*, *notum* is expressed in any wound but always preferentially in the anterior edge. Supporting its role in preventing posterior specification, silencing of *notum* generates ‘two-tailed’ planarians (Fig. 3). *sFRP-1*, one of the three *S. mediterranea* secreted Frizzled-related proteins (sFRP), is the earliest gene to be detected in anterior blastemas, after only 3 hours (Fig. 4). No phenotype has been observed after silencing of *sFRP-1*, however. These wounding-response factors are perfect candidates to mediate the local control cell reprogramming after amputation and specifically launch the different regeneration programs.

A very recent report nicely shows that *D. japonica islet*, a LIM homeobox transcription factor, is essential to maintain *wnt1* expression during the second stage of regeneration, but does not have any effect on the wound-induced *wnt1* expression. During the first two days of regeneration, *islet* mRNA appears in the posterior dorsal midline, like *wnt1* mRNA. Moreover, *islet* RNAi planarians display the ‘tail-less’ phenotype, similar to the one caused by *βcatenin/wnt1/wnt11-2* silencing (Fig. 3). The authors suggest that Islet would be inducing stem cells to differentiate into Wnt1-secreting cells. Accordingly, the first stage related *wnt1*-expression is independent of both Islet function and stem cell proliferation (Hayashi *et al.*, 2011).

Except for *wnt11-5*, whose expression depends on the early posterior wound-induced *wnt1* expression (Petersen and Reddien 2009; Gurley *et al.*, 2010), the other ‘posterior’ Wnts (*wnt11-1* and *11-2*) are detected later on, during the second stage of regeneration, and are stem cell dependent (Gurley *et al.*, 2010). Similar patterns are observed for the only two Fz receptors analyzed to date, out of the 10 found in the *S. mediterranea* genome (Kobayashi *et al.*, 2007; Gurley *et al.*, 2008). *fzA*, is expressed in the anterior blastema at 1 day of regeneration with a pattern directly related with the differentiation of the brain primordia. Likewise, *fz4* is expressed in the posterior blastema also after 1 day of regeneration (Rink *et al.*, 2009) (Fig. 4). A second sFRP, *sFRP-2*, is detected in the anterior blastema, but not before the second day (Gurley *et al.*, 2010) (Fig. 4). It could be hypothesized that the decisions taken

in the first stage are permanently established during the second stage. Interestingly, the Hox genes *AbdbA* and *HoxD* are detected specifically in the posterior blastema around 2 days after amputation (Iglesias *et al.*, 2008) (Fig. 4), suggesting a possible role as canonical Wnt targets. From about 3 days after amputation, not only the Wnt elements but most of the genes are expressed in patterns clearly resembling the ones observed in adults. For instance, genes with polarized expression patterns are clearly concentrated at one tip of the animal, genes expressed in the brain appear as two bi-lateral domains in the anterior blastema and genes expressed in the pharynx appear in its primordium.

With all the available data, an integrative and coherent model for early AP fate decisions can be proposed in which wound-induced *wnt1* expression is responsible for activating *βcatenin-1* and its targets, such as *wnt11-5* and *notum* (Petersen and Reddien, 2011) (Fig. 5A). Notum is described as a target of β -catenin in other models, and in fact, its expression in planarians disappears or is upregulated after *βcatenin-1* or *APC* silencing, respectively. Moreover, evidence for an epistatic relationship is strengthened by the observation that silencing of *βcatenin-1* or *wnt1* together with *notum* produces the same phenotype as silencing *βcatenin-1* or *wnt1* alone, that is, ‘two-headed’ or ‘tailless’ planarians (Petersen and Reddien, 2011). Thus, in anterior wounds, inhibition of *wnt1* by anterior-specific signals such as *notum* and *sFRP-1* would allow the differentiation of a head. In posterior wounds, *wnt1* expression would be maintained and other *βcatenin* targets such as *wnt11-1/2* (Petersen and Reddien 2009; Yazawa *et al.*, 2009), the posterior Hox genes, and probably *wnt1* itself (Petersen and Reddien 2011) would be activated (Fig. 5A). The observation that notum is transiently expressed in the posterior blastema suggests that an unknown factor must target its inhibition.

Activation of wound-induced *wnt1* expression is known to be independent of *βcatenin-1* and stem-cell proliferation (Petersen and Reddien 2009; Gurley *et al.* 2010). One possibility is that it is under the control of a general signal that is released by the cells around the injury and is linked to ion transport and depolarization of cell membranes. Once activated in the posterior blastema, maintenance of *wnt1* expression does depend on *βcatenin-1* and very probably on Hh activation (Yazawa *et al.*, 2009). Interestingly, the ‘two-tailed’ planarians generated after over-activation of Hh have normal levels of *notum* expression (Petersen and Reddien 2011). This capacity of Hh to induce tail differentiation in the presence of *notum*, indicates that Hh is not involved in generating the asymmetric expression of notum and raises the possibility of a late role of Hh in posterior specification. The role of Hh in early regeneration is still an important question to be elucidated. Over-activation of Hh by *ptc* RNAi increases early *wnt1* expression in anterior and posterior wounds, which would agree with the expression of at least *ptc* at that early time point in the wounds (Rink *et al.*, 2009). The function of Wnt1 and Hh in anterior wounds also remains unknown, since no defect in anterior regeneration is observed after silencing *wnt1* or *Hh*. Different options can be considered, namely the expression of *wnt1* detected in anterior wounds does not imply a functional readout, or there is an early function of Wnt1 independent of posterior specification that we are not able to detect.

Since modulation of *βcatenin-1* leads to such striking AP defects, it has been widely assumed that its activation must be specific to posterior blastemas. However, this model predicts that *βcatenin-1* must also be active at least transiently in anterior tissues, for instance

to activate notum as early as 6 hours after amputation. In fact, *βcatenin-1* mRNA is detected in any wound, anterior or posterior, although not before 12 hours after amputation (Gurley *et al.*, 2008). Taking into account that β catenin function is post-transcriptionally regulated, it could be that at very early time points the pre-existing protein levels are sufficient to activate early targets such as *notum*. The possibility that *βcatenin-1* is in fact active in any blastema at any time would explain the high levels of mRNA detected for this gene in both blastemas at all stages of regeneration. This is often overlooked in the literature but is consistent with the essential role of β -catenin in the control of fundamental cell processes. Although the canonical Wnt signal has been conserved for posterior specification, it is also clearly involved in the patterning of any tissue and organ at any developmental stage. For example, in vertebrates, β -catenin is responsible for posterior specification of the embryo, as well as for specifically patterning the liver, the gut (reviewed in Ladde and Monga 2011) and the brain (Kiecker *et al.*, 2001). It therefore seems highly unlikely that the only function of *βcatenin-1* would be in AP axis specification, and evidence suggests that it is also a general mechanism necessary for the proliferation and differentiation of neoblasts at later stages of regeneration (Iglesias *et al.*, 2011). In our opinion, the fact that silencing of *βcatenin-1*, *axins* or *APC* only appears to result in AP axis defects in planarians merely reflects the crucial importance of *βcatenin-1* activity during the first few hours after amputation. ‘Two-headed’ planarians, which appear to have two well-patterned brains and a well-differentiated gut, may well occur because the downregulation of *βcatenin-1* is mild or only occurs for a short period of time (or both). However, it remains to be determined whether ‘radial-like hypercephalized’ planarians have a well-patterned brain or a well-differentiated digestive system. We would argue that *βcatenin-1* is essential in the first few hours of regeneration to re-establish the posterior organizer, and that this explains why we mostly see an anteriorized phenotype after it is silenced, but that it is also essential for patterning of adult tissues such as the CNS. This would explain the

ubiquitous expression of *βcatenin-1* in any blastema, throughout intact animals and both in differentiated cells such as neurons and in proliferating cells (Iglesias *et al.*, 2011) (Fig. 2).

Altogether, patterning of the planarian AP axis can be divided into two main phases. The first one, in response to wound healing and independent of stem cells, where AP fate choice takes place; and the second one, which involves stem cell proliferation, growth and identity maintenance (Petersen and Reddien 2009; Yazawa *et al.*, 2009; Gurley *et al.*, 2010; Petersen and Reddien 2011 and Hayashi *et al.*, 2011) (Fig. 5A). Accordingly, only the silencing of proteins that directly act in early posterior identity specification, such as *wnt1* or *βcatenin-1*, leads to the formation of a posterior head, while *wnt 11-1*, *11-2* or *islet* RNAi interference cause defects in patterning and elongating posterior tissues, but never inversion of polarity.

Is the planarian antero-posterior (AP) axis also patterned by β -catenin activity during embryogenesis?

The role of the Wnt/ β -catenin pathway in the establishment of the animal-vegetal (prospective AP) axis during early embryogenesis has been demonstrated not only in vertebrates but also in spiralian. In the nemertean *Cerebratulus lacteus*, as in most metazoans studied, β -catenin is restricted to the most vegetal cells and is required for proper endomesoderm development (Henry *et al.*, 2008). In the annelid *Platynereis dumerilii*, β -catenin is involved in establishing asymmetric sister-cell fate along the animal-vegetal axis (Schneider and Bowerman, 2007). Interestingly, this mechanism is also functional within Ecdysozoans, in the nematode *C. elegans* (Kaletta *et al.*, 1997).

To date, only two reports have presented data on the expression of Wnt elements in planarian embryos, specifically in the planarian species *Schmidtea polycroa*, which is closely related to *S. mediterranea* (Martín-Durán *et al.*, 2010; Martín-Durán *et al.*, 2011). Despite their phylogenetic position as spiralian, planarians

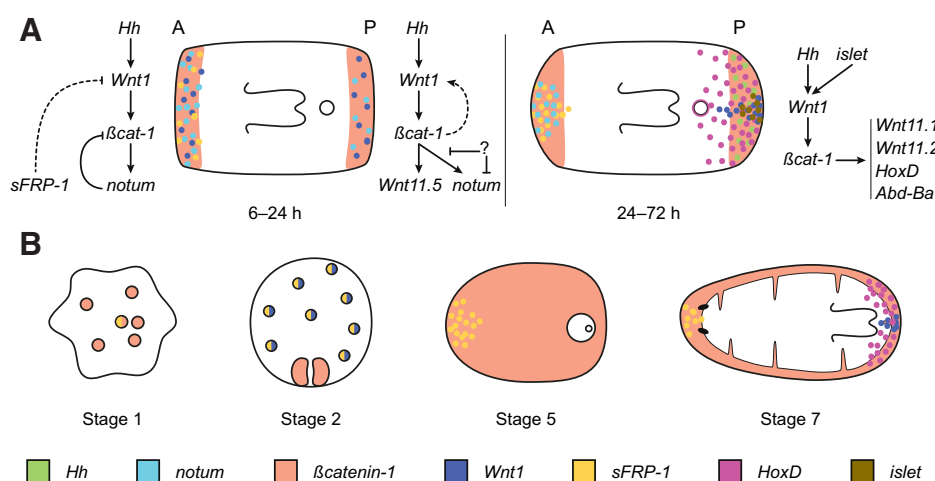


Fig. 5. Proposed model for establishment of posterior identities after amputation and comparison with the expression pattern of Wnt pathway components during embryogenesis.

(A) Proposed epistatic model for antero-posterior patterning during planarian regeneration. After wound-healing, *wnt1*, which is detected during the first few hours in any kind of wound, would activate β catenin-1, which would in turn activate very early targets, such as *wnt11-5* and *notum*. *Notum*, which normally modulates the range of Wnt activity, could inhibit the local function of β catenin-1 in the anterior wounds, but not in posterior ones, where an unknown signal should inhibit its function. Although no functional data have been reported, *sFRP1* is predicted to inactivate *Wnt1* in the anterior wound. *Hh* is known to modulate wound-induced *wnt1* expression. In a second phase, differential programs are already

launched in each blastema, but canonical Wnt activation needs to be maintained posteriorly. At this stage, around 2 days after amputation, the effectors of canonical Wnt signaling, such as the posterior Wnts and the posterior Hox genes, are activated. A indicates anterior; P, posterior. **(B)** Schematic representation of the expression of the Wnt elements analyzed during *Schmidtea polycroa* embryogenesis. β catenin-1 is detected as early as stage 1, but only by RT-PCR. At stage 2, β catenin-1 is expressed in the embryonic pharynx, and *sFRP1* and *wnt1* in the many blastomeres around the embryo. At stage 5, β catenin-1 is detected throughout the embryo, but the rest of the elements are not. At stage 7, the Wnt elements show a pattern clearly resembling that found in adults. Note that the expression dynamics of these Wnt elements during regeneration and during embryogenesis share some interesting features, for instance the early co-expression of *wnt1* and *sFRP1* and their subsequent polarization.

show an ectolecithal embryo without any recognizable cleavage pattern and with the early formation of transient structures required to introduce the maternal nutrients. During cleavage, or stage 1 (the first 36 hours), blastomeres are not attached and remain dispersed within the yolk-derived syncytium. At stage 2, a recognizable organization emerges. Some blastomeres move towards the periphery of the syncytium and form a thin embryonic epidermis. Other blastomeres migrate to a point in the syncytium, which may or may not be prespecified by an existing signal, and differentiate to form a provisional embryonic pharynx that will ingest yolk cells (Martín-Durán *et al.*, 2010). The embryonic pharynx is the only discernible external feature in planarian embryos until stage 6, when the definitive pharynx and the rest of the organs and tissues clearly differentiate.

βcatenin-1 is expressed at stage 2 exclusively in the embryonic pharynx of the yolk-feeding embryo. At stage 3 and 4, expression disappears, and at stage 5 it is detected ubiquitously in the germ band. By stage 7, embryos display the same expression pattern as that found in the adult, that is, widespread expression in the parenchyma and the nervous system (Fig. 5B). *wnt1* is also detected at stage 2 but in a completely different domain, that is, in the outlying blastomeres but not in the embryonic pharynx. Thereafter it is not detected until stage 7, in the juvenile, in a small cluster of cells at the posterior definitive tip, clearly resembling the adult pattern (Fig. 5B). *sFRP-1* is detected at stage 2 in the outlying blastomeres but not in the pharynx, the same as *wnt1*, but this expression is maintained during stages 3 and 4. At stage 5 it becomes restricted to discrete cells in the germ band on the opposite side to the degenerating embryonic pharynx. This asymmetric distribution is observed until the end of development, when *sFRP-1* is expressed in the anterior tip and in the definitive pharynx in the hatching embryo, again resembling the pattern found in the adult (Martín-Durán *et al.*, 2010) (Fig. 5B).

Together, these data suggest that the definitive mechanisms for patterning of the AP axis, involving canonical Wnt signaling, emerge at stage 5, that is, after yolk ingestion and proliferation of the blastomeres in the germ band, and when the embryo begins to flatten and the definitive structures appear. Accordingly, *hoxD* is not detected until stage 6, initially in a strip of cells at the embryonic pole containing the definitive pharynx and spreading later on from the pharynx to the posterior end, resembling the adult pattern (Iglesias *et al.*, 2008). Before stage 5, planarian embryos are undergoing patterning as well as differentiating a transient pharynx and beginning to actively feed on the external yolk. Due to its extremely divergent development, it is difficult to discern not only the role of canonical Wnt signaling but also whether axial polarity is established during the early stages of development. For instance, it is unclear whether the expression of *βcatenin-1* in the pharynx at stage 2 indicates a polarizing function of the whole embryo or is simply required for the differentiation of such a complex structure. However, the expression of *βcatenin* during differentiation of the transient pharynx could reflect an early role in endomesoderm specification, which is linked to posterior fates in most spiralian embryos analyzed (Martín-Durán *et al.*, 2010). Nevertheless, the co-expression of *sFRP-1* and *wnt1* in the outlying blastomeres at stage 2, the maintenance of *sFRP1* but not *wnt1* at stage 3, and the later restriction of their expression to the anterior and posterior tip of the embryo, respectively, strikingly resembles the situation found during regeneration in the anterior blastema (Fig. 5). However, the

relationship between those genes and *βcatenin-1* in both situations is not clear at all, at least from the data available on mRNA expression. It is interesting to note that, despite *βcatenin-1* only being expressed in the pharynx during initial embryonic stages, it has been shown by RT-PCR to be highly upregulated during the first few hours of development. This raises the interesting question of whether in planarians, like in most metazoans, maternal *βcatenin* is essential for the first polar decisions of the embryo. In most bilaterians, the main body axes are established before gastrulation, and later on they are only refined (reviewed in Niehrs, 2010). If we understand gastrulation as the induction of extensive cell movements in order to differentiate the embryonic germ layers, we would expect that the first axial polarity is established in planarians during stage 1, before differentiation of the transient pharynx. It will be very interesting to analyze Wnt activation and *βcatenin-1* activity during this period to determine whether their roles are conserved not only for refining and re-patterning the AP axis but also for its establishment.

Do planarians have anterior and posterior organizers?

An organizer is often defined as a group of cells with the ability to induce organized cell fates in the surrounding tissue, even when ectopically transplanted. In planarians, like in *Drosophila* imaginal discs or regenerating amphibian limbs, the dorsoventral (DV) boundary seems to act as an organizing region. Interaction between dorsal and ventral epidermal cells is an essential step for planarian regeneration and, moreover, grafting experiments demonstrate that ectopic DV confrontations generate outgrowths with an organized AP pattern (Schilt 1970; Kato *et al.*, 1999; Agata *et al.*, 2007). Those observations suggest the presence of organizing regions at specific positions along the DV boundary, similar to the apical ectodermal ridge, which is responsible for proximo-distal patterning of vertebrate limbs during regeneration (reviewed in Fernandez-Teran and Ros, 2008).

These findings beg the question of whether an anterior and a posterior organizer are also required during planarian regeneration. Current data suggest the existence of a posterior organizer as a source of Wnts and an anterior one as a source of Wnt inhibitors (Adell *et al.*, 2010; Meinhardt, 2009), and both of them would be very quickly re-established after amputation. However, this raises two important questions. Firstly, are those organizers also responsible for maintenance of the AP axis in intact animals? Secondly, is the anterior organizer also a source of neural activators?

The induction of different fates along the AP axis is likely to be the result of diffusion of the morphogens (Wnts) and their antagonists (sFRPs) or modulators (notum). However, given the large size of planarians (1- 10 mm), it seems unlikely that so few molecules could account for the patterning of the whole animal. Even during later stages of regeneration, when planarian fragments undergo extensive morphallaxis that requires complete cell re-specification, the range of apical morphogens will need to be very long. The observation that several Wnts and sFRPs are expressed in nested domains along the entire AP axis does support the hypothesis that their integrated activity would account for a graded activation of *βcatenin-1*. The 'intercalary model' of regeneration (Chandebois 1979; Chandebois 1980; Agata *et al.*, 2007) perhaps re-defines the mechanism of patterning more accurately. According to this model, the activity of the signals from the apical organizers would

be restricted to a number of cell diameters and would instruct the identity of tissue edges in the planarian. Intercalary regeneration can function as a general mechanism to re-arrange tissues and organs during regeneration and accounts for the re-specification of central structures. In our opinion, this model is also applicable to homeostasis in planarians. Of course, these models are not mutually exclusive, and canonical Wnt signaling could play an essential role in the process of intercalary regeneration, or 'continuous intercalary re-specification' in the case of intact animals. Nevertheless, it should be noted that the existence of a real gradient of β -catenin activity in planarians, such as the one reported in *Xenopus* embryos (Kiecker *et al.*, 2001), has never been demonstrated.

The potential role of the anterior organizer in the induction of neural fates is an intriguing problem, particularly the question of whether anterior identity can be uncoupled from neural differentiation. Although this issue is far from being resolved, some very interesting preliminary results have been obtained. It has been known for some years that silencing of *nou-darake* (*ndk*), an FGF receptor with inhibitory activities, induces brain differentiation along the length of the planarian body without affecting the AP identities (Cebriá *et al.*, 2002). Interestingly, *ndk* RNAi animals also differentiate a pair of 'brain primordia' in the posterior blastema (Cebriá *et al.*, 2002; Iglesias *et al.*, 2011). Thus, it could be that FGF activation induces neural fates in planarians, as has been described in models of embryonic development (reviewed in Stern, 2005). Very recently it has been reported that the 'two-tailed' animals generated after *APC* or *axins* RNAi also develop a pair of 'brain primordia' in ectopic posterior blastemas, which would correspond to the anterior wounds (Iglesias *et al.*, 2011). Although differentiation of those brain primordia cannot progress in the presence of high β -catenin-1 activity, this observation demonstrates that neural differentiation can take place in 'posterior' fated tissue. Taken together, these results suggest that early brain determination can be uncoupled from blastema polarity, and that FGF could function as a 'brain activator' secreted from the anterior organizer (Adell *et al.*, 2010; Iglesias *et al.*, 2011). Further evidence that brain differentiation can be uncoupled from positional identity comes from functional analysis of *prep*, a TALE class homeodomain protein that is expressed specifically in the head region (Felix and Aboobaker 2010). Although this gene is required for head formation and anterior markers are dramatically

diminished when it is silenced, the ectopic brain induced after *ndk* silencing does not require *prep* function.

Finally, the different phenotypes generated after canonical Wnt signal modulation suggest that the range and nature of the anterior and posterior organizers are essentially different (Meinhardt, 2009). β -catenin-1 downregulation easily induces completely anteriorized animals with a continuous brain and without any central structures such as the pharynx. In contrast, upregulation of β -catenin-1 never completely posteriorizes planarians. Instead, it generates 'two-tailed' animals with corresponding pharynges that have opposing orientations. Thus, suppression of the posterior organizer allows continuous differentiation of anterior structures, while induction of an ectopic posterior organizer is only possible at wounds and exerts a short-range effect. More data are required on the activity of Wnt pathway components and other factors that act in wounds and during homeostasis in order to explain these differential responses.

***S. mediterranea* wnt5 acts through a non canonical/ β -catenin-independent pathway to control neural connectivity**

Very little is known about the involvement of the β -catenin-independent pathway in the course of planarian regeneration. So far, the non-canonical Wnt pathway has been implicated in two different processes. Firstly, it is known to be involved in controlling neural connectivity during nervous system regeneration and, secondly, it plays a role in the apical docking and planar polarization of the cilia (Almuedo-Castillo *et al.*, 2011). *wnt5*, the only non-canonical Wnt described in planarians, is thought to function as a signal to restrict nervous system growth along the medio-lateral axis (Adell *et al.*, 2009; Gurley *et al.*, 2010). Secretion of Wnt5 is thought to require the transmembrane protein *evi/wntless* and probably also signals through both Dvls. This is based on the observation that loss of function of these former genes leads to similar defects in terms of lateral displacements and disconnections of the CNS, as well as aberrant projections of the visual axons (Adell *et al.*, 2009; Almuedo-Castillo *et al.*, 2011) (Fig. 1). However, the molecular mechanisms underlying *wnt5*-dependent positioning of neural structures remain to be defined. Two different options can be considered, namely that *wnt5* establishes medio-lateral patterning

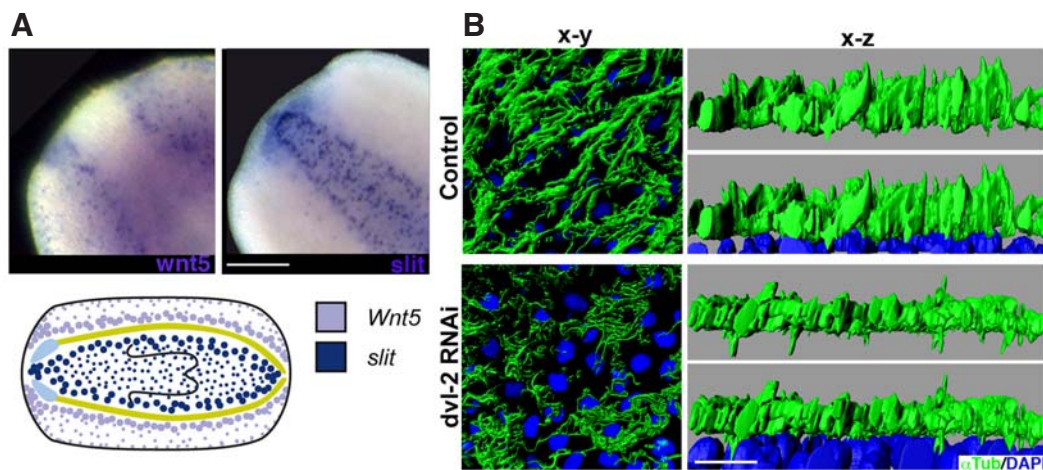


Fig. 6. The non-canonical Wnt pathway during planarian regeneration. (A) The expression patterns of *wnt5* and *slit* suggest a shared role in positioning the planarian nervous system along the medio-lateral axis. Animals correspond to trunk pieces 3 days after amputation. Anterior is shown to the left. (B) Anti- α -tubulin (α Tub) immunostaining of control and *dvl-2* RNAi planarians. Epidermal cilia of *dvl-2*-silenced planarians fail to localize apically and appear disorganized, shorter and embedded in the nuclear layer. x-y and x-z confocal projections are shown. DAPI nuclear staining is shown in blue. A region located

approximately 1 mm from the anterior end of the planarian was chosen for imaging ventral cilia. Confocal sections were deconvolved using Huygens Deconvolution Software (Scientific Volume Imaging) and processed using Imaris Software (Bitplane) for 3D reconstructions. Scale bar, 10 μ m.

of the blastema (Gurley *et al.*, 2010) or that it restricts the positioning of the regenerating nervous system by regulating migration of the neural precursor cells or axonal growth (reviewed in Endo *et al.*, 2007). The second possibility would be consistent with its evolutionarily conserved role as a repulsive cue for growing axons. Notably, *Wnt5* and *slit*, another conserved signal involved in repelling axon growth, show complementary expression patterns in which *Wnt5* is expressed from the outer part of the CNS to the planarian margin and *slit* is expressed from the internal part of the CNS to the midline (Marsal *et al.*, 2003; Cebriá *et al.*, 2007; Adell *et al.*, 2009; Gurley *et al.*, 2010) (Fig. 2). Moreover, the silencing of *slit* in planarians leads to collapse of the CNS at the midline (Cebriá *et al.*, 2007), a phenotype that could be considered opposite to the one generated after silencing *wnt5*, at least in relation to nervous system regeneration. All this may indicate that *wnt5*, together with *slit*, restricts the positioning of the newly differentiated nervous tissues along the medio-lateral axis of the blastema (Almuedo-Castillo *et al.*, 2011) (Fig. 6A). Whether or not these two molecules have reciprocal roles in regulating and restricting the expression of the other remains to be determined.

A planar cell polarity network is required for ciliogenesis and docking of apical basal bodies in the planarian epidermis

Planar cell polarity refers to the ability of cells to become asymmetrically organized within the plane of the tissue. This capacity is commonly controlled by a non-canonical branch of the Wnt pathway known as the PCP cascade, which involves the accumulation of specific components to different regions of the cell. Some of the key components of the PCP cascade are known to be involved in ciliogenesis. For instance, the docking and polarization of cilia basal bodies within the epithelial sheet appears to involve a combination of hydrodynamic forces and signaling through PCP proteins (reviewed in Wallingford and Mitchell, 2011).

In planarians, we have found that components of the evolutionarily conserved core PCP pathway—planarian orthologs of dishevelled (*dvl1/2*), van-gogh (*vang1/2*) and diversin (*div*)—are involved at least in the apical positioning of the cilia basal bodies (Almuedo-Castillo *et al.*, 2001). In a control situation, cilia emerge from the apical side of the cells, and the actin filaments are located on top of the nucleus (Fig. 6B). Silencing of *dvl-2*, *vang-1* and *-2*, or *div* leads to an aberrant arrangement of the cilia network, both at the level of the plane of the epithelium and at its apical-basal axis (Almuedo-Castillo *et al.*, 2011). Epithelial cilia appear at a lower density and are shorter and disorganized. In addition, the basal bodies of the cilia fail to reach the most-apical part of the epithelial cells (Fig. 6B). Interestingly, this loss of polarization is also observed in the epithelial actin network and a high concentration of empty vesicles and isolated basal bodies is found to be embedded in the cytoplasm of *dvl-2* RNAi planarians. Consistent with this observation, it has been shown that the positioning of the basal bodies in *Xenopus* embryos relies on the functional interaction of Dvl and the actin-remodeling Rho-GTPase, RhoA, in directing vesicle-containing basal bodies towards the apical side of the epithelial cells by active actin cytoskeleton rearrangements (Park *et al.*, 2008). These observations prompt us to conclude that the defective apical positioning of the cilia observed after silencing core components of the PCP pathway in planarians could be a

consequence of abnormal assembly of the actin filaments, leading to aberrant vesicle trafficking of the cilia basal bodies.

Given the phylogenetic position of planarians within the Lophotrochozoa superphylum, the presence of a functional PCP network in these organisms has evolutionary significance. The relationship between PCP and ciliogenesis has been demonstrated in vertebrates (reviewed in Wallingford and Mitchell, 2011), but not in invertebrates, possibly because the most common models, such as *Drosophila*, do not have a ciliated epidermis. The presence of this network within the spiralian thus suggests that it may be an ancient feature in bilaterians. Interestingly, while the role of Wnt ligands as master orientating cues for planar polarity is broadly accepted in vertebrates, there is no evidence for such a role in *Drosophila* (Chen *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2011). When we consider that no defects related to cilia docking are found after silencing any Wnt ligand in planarians (Almuedo-Castillo *et al.*, 2011) (Fig. 2) these results together suggest that orchestration of planar polarity by a Wnt gradient may be a vertebrate innovation (reviewed in Goodrich 2011).

Finally, although it might be predicted that interference with core components of the PCP would affect processes such as cell migration of different cell types during regeneration, no such defects are observed. In fact, the only defects that have been described are those relating to ciliogenesis. Although we tend to think of all PCP proteins as a complex, however, it has been demonstrated that many features are context specific and vary between the different tissues and organisms under study (reviewed in Goodrich and Strutt, 2011). Thus, further studies are required in order to identify new functions of the PCP network during planarian regeneration.

Concluding remarks

Current evidence from planarians supports an evolutionarily conserved role for canonical Wnt signaling in specifying posterior identity not only during embryogenesis but also in adults. In planarians and cnidarians, the two classical models with extreme regenerative capacities, this mechanism is active both during regeneration and homeostasis. Although very little is known about the activation of canonical Wnt signaling at the adult stage of non-regenerating models, it is tempting to speculate that the constant maintenance of these ‘embryonic’ signals could be the key to regenerative capacity, as recently discussed in Reddien (2011). A second feature of regenerative animals is the existence of pluripotent and totipotent stem cells. The neoblast population of planarians possesses pluripotent/totipotent stem cells, able to differentiate into any cell type (Wagner *et al.*, 2011). It may be that the maintenance of these stem cells in adult animals is possible thanks to the continued activation of the signaling centers. In planarians, the BMP signaling pathway also has an evolutionarily conserved role, as it is required for re-establishment and maintenance of the DV axis during regeneration and homeostasis, respectively (Molina *et al.*, 2007; Orii *et al.*, 2007; Reddien *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2011; Gaviño *et al.*, 2011). Thus, in adult planarians, as in most metazoan embryos, Wnts and BMPs establish the main body axes that specify a spatial coordinate system to pattern the body. The establishment of both the AP and DV axis must be interdependent because they are always perpendicular. In planarians, it is not known whether a unique organizer could share both functions or, as proposed by Meinhardt (2009), the DV interaction triggers

the formation a first organizer, which establishes DV identities, and then the AP organizer arises to pattern the AP identities in a perpendicular direction.

In contrast to the β -catenin-dependent pathway, the molecular components and interactions that underlie the specific activation of the different non-canonical branches of the Wnt signaling pathway are still far from clear. Interestingly, results in planarians support a conserved role for Wnt5 as a β -catenin-independent input. It remains to be determined whether it regulates cell fate, cell migration or functions as an axon guidance cue. Perhaps more relevant, however, is the discovery that PCP elements have a conserved role in apical positioning of the cilia in planarians, as this had only been reported previously in vertebrates. In planarians, like in *Drosophila*, PCP appears not to depend on Wnt ligand, and components of the PCP pathway appear to exert local effects that do not require morphogenetic signals. Nevertheless, the possibility that Wnts act as modulators of this pathway, possibly through Frizzled binding, cannot be completely ruled out.

Recent years have seen substantial advances in our understanding of the role of the Wnt pathway during planarian regeneration and homeostasis, and evidence has accumulated that its function is conserved from the embryo to the adult. However, as usual, with new information come new questions. Many elements of the pathway remain to be characterized in planarians, for instance the receptors and co-receptors, and the nuclear transcription factors. More importantly, we still do not know which cell types express the different Wnt elements and how they control neoblast differentiation and migration. To advance research in these areas, technical developments will also be required, for instance to obtain reliable readouts of the different branches of the Wnt pathway or analyses at the protein level, such as protein localization, protein-protein interaction, over-expression and live-imaging. Of course, all these methodologies rely on the successful implementation of transgenesis in planarians. Furthermore, it is clear that much more effort should be invested in studying non-standard models across the entire phylogenetic tree and at different developmental stages in order to identify common and derived traits and discover the essential mechanisms that govern cell behavior. Planarians are currently established as an invaluable model for integrative research into body patterning, tissue regeneration and stem cell biology. We therefore expect many of the questions raised in this review to be answered in the coming years.

Acknowledgments

We specially thank J.M. Martín-Durán for the drawings and E. Saló for unconditional support; all members of the F.Cebrià and E.Saló groups for discussion and suggestions; and I. Patten for advice on English style. This work was supported by grant BFU2008-01544 from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC), Spain, and grant 2009SGR1018 (AGAUR). M.S. received a fellowship from the University of Barcelona and M. A. C. received an FPI fellowship from the MEC.

References

- ADELL T, MARSAL M., SALÓ E (2008) Planarian GSK3s are involved in neural regeneration. *Dev Genes Evol* 218: 89–103.
- ADELL T, CEBRIÀ F, SALÓ E (2010) Gradients in planarian regeneration and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000505.
- ADELL T, SALÓ E, BOUTROS M, BARTSCHERER K (2009) Smed-Evi/Wntless is required for β catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration. *Development* 136: 905-910.
- AGATA K, SAITO Y, NAKAJIMA E (2007) Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis *Develop Growth Differ* 49: 73–78.
- ALMUEDO-CASTILLO M, SALÓ E, ADELL T (2011) Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2813-2818.
- ANGERS S, MOON RT (2009) Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell* 10: 468-477.
- BAUER R, LÖER B, OSTROWSKI K, MARTINI J, WEIMBS A, LECHNER H, HOCH M (2005) Intercellular communication: the *Drosophila* innexin multiprotein family of gap junction proteins. *Chem Biol*. 12: 515-526.
- BEANE WS, MOROKUMA J, ADAMS DS, LEVIN M (2011) A chemical genetics approach reveals H,K-ATPase-mediated membrane voltage is required for planarian head regeneration. *Chem Biol* 18: 77-89.
- BLACKSTONE NW (2006) Charles Manning Child (1869-1954): the past, present, and future of metabolic signaling. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 306: 1-7.
- CEBRIÀ F, KOBAYASHI C, UMESONO Y, NAKAZAWA M, MINETA K, IKEO K, GOJOBORI T, ITOH M, TAIRA M, SÁNCHEZ ALVARADO A, AGATA K (2002) FGFR-related gene nou-darake restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature* 419: 620-624.
- CEBRIÀ F, GUO T, JOPEK J, NEWMARK PA (2007) Regeneration and maintenance of the planarian midline is regulated by a slit orthologue. *Dev Biol* 307: 394-406.
- CHAI G, MAC, BAO K, ZHENG L, SUN Z, SALÓ E, ADELL T, WU W (2010) Complete functional segregation of planarian (beta)-catenin-1 and -2 in mediating WNT signaling and cell adhesion. *J Biol Chem* 285: 24120-24130.
- CHANDEBOIS R (1979) The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian regeneration (I) Blastema emergence. *Develop Growth and Differ* 21: 195-204.
- CHANDEBOIS R (1980) The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian regeneration (II) Distalization. *Develop Growth and Differ* 22: 693-704.
- CHEN WS, ANTIC D, MATIS M, LOGAN CY, POVELONES M, ANDERSON GA, NUSSE R, AXELROD JD (2008) Asymmetric homotypic interactions of the cadherin flamingo mediate intercellular polarity signaling. *Cell* 133: 1093-1105.
- CHILD CM (1911) Studies on the dynamics of morphogenesis and inheritance in experimental reproduction. I. The axial gradient in *Planaria dorotocephala* as a limiting factor in regulation. *J. Exp. Zool* 10: 265-320.
- ENDO Y, RUBIN JS (2007) Wnt signaling and neurite outgrowth: insights and questions. *Cancer Sci* 98: 1311-1317.
- FELIX DA, ABOOBAKER AA (2010) The TALE class homeobox gene Smed-prep defines the anterior compartment for head regeneration. *PLoS Genet* 6:e1000915.
- FERNANDEZ-TERAN M, ROS MA (2008) The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *Int J Dev Biol* 52: 857-871.
- GAO B, SONG H, BISHOP K, ELLIOT G, GARRETT L, ENGLISH MA, ANDRE P, ROBINSON J, SOOD R, MINAMI Y, ECONOMIDES AN, YANG Y (2011) Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev Cell* 20: 163-176.
- GAVIÑO MA, REDDIEN PW (2011) ABmp/Admp regulatory circuit controls maintenance and regeneration of dorsal-ventral polarity in planarians. *Curr Biol* 21: 294-299.
- GONG Y, MO C, FRASER SE (2004) Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* 430: 689-693.
- GOODRICH LV, STRUTT D (2011) Principles of planar polarity in animal development. *Development* 138: 1877-1892.
- GUDER C, PHILIPP I, LENGFELD T, WATANABE H, HOBMAYER B, HOLSTEIN TW (2006) The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* 25: 7450-7460.
- GURLEY KA, RINK JC, SÁNCHEZ-ALVARADO A (2008) β catenin defines head versus tail identity during planarian and homeostasis. *Science* 319: 323-327.
- GURLEY KA, ELLIOTT SA, SIMAKOV O, SCHMIDT HA, HOLSTEIN TW, SÁNCHEZ ALVARADO A (2010) Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Dev Biol* 347: 24-39.
- HAYASHI T, MOTOISHI M, YAZAWA S, ITOMI K, TANEGASHIMA C, NISHIMURA O, AGATA K, TARUI H (2011) A LIM-homeobox gene is required for differentiation of Wnt-expressing cells at the posterior end of the planarian body. *Development* 138: 3679-3688.
- HENRY JQ, PERRY KJ, WEVER J, SEEVER E, MARTINDALE MQ (2008) Beta-catenin is required for the establishment of vegetal embryonic fates in the nemertean, *Cerebratulus lacteus*. *Dev Biol* 317: 368-379.

Wnt signalling in Planarians

- HOBMAYER B, RENTZSCH F, KUHN K, HAPPEL CM, VON LAUE CC, SNYDER P, ROTHBÄCHER U, HOLSTEIN TW (2000) WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* 407: 186-189.
- HUANG H, HE X (2008) Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol* 20: 119-125.
- IGLESIAS M, SALÓ E, GOMEZ-SKARMETA JL, ADELL T (2008) Silencing of *Smed-bcatenin-1* generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* 135: 1215-1221.
- IGLESIAS M, ALMUEDO-CASTILLO M, ABOOBAKER AA, SALÓ E (2011) Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by the Wnt/ β -cateni pathway. *Dev Biol* 358: 68-78.
- KALETTAT, SCHNABEL H, SCHNABEL R (1997) Binary specification of the embryonic lineage in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 390: 294-298.
- KATO K, ORII H, WATANABE K, AGATA K (1999) The role of dorsoventral interaction in the onset of planarian regeneration. *Development* 126: 1031-1040.
- KIECKER C, NIEHRS C (2001) A morphogen gradient of Wnt/ β -catenin signaling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* 128: 4189-4201.
- KOBAYASHI C, SAITO Y, OGAWA K, AGATA K (2007) Wnt signaling is required for antero-posterior patterning of the planarian brain. *Dev Biol* 306: 714-724.
- LADE AG, MONGA SP (2011) Beta-catenin signaling in hepatic development and progenitors: which way does the WNT blow? *Dev Dyn* 240: 486-500.
- MARSAL M, PINEDAD, SALÓ E (2003) Gtwn-5 a member of the wnt family expressed in a subpopulation of the nervous system of the planarian *Girardia tigrina*. *Gene Expr Patterns* 3: 489-495.
- MARTÍN-DURÁN JM, AMAYAE, ROMERO R (2010) Germ layer specification and axial patterning in the embryonic development of the freshwater planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev Biol* 340: 145-158.
- MARTÍN-DURÁN JM, ROMERO R (2011) Evolutionary implications of morphogenesis and molecular patterning of the blind gut in the planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev Biol* 352: 164-176.
- MCNEILL H (2010) Planar cell polarity: keeping hairs straight is not so simple. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a003376.
- MEINHARDT H (2009) Beta-catenin and axis formation in planarians. *Bioessays* 31: 5-9.
- MIKELS AJ, NUSSE R (2006) Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25: 7461-7468.
- MOLINA MD, SALÓ E, CEBRIÀ F. (2007) The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians. *Dev Biol* 31: 79-94.
- MOLINA MD, NETO A, MAESO I, GÓMEZ-SKARMETA JL, SALÓ E, CEBRIÀ F (2011) Noggin and noggin-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians. *Curr Biol* 21: 300-305.
- MORGAN TH (1898). Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. *Archiv für Entwicklungsmechanik der organismen* 7: 364-397.
- NIEHRS C (2010) On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes. *Development* 137: 845-857.
- NOGI T, LEVIN M (2005) Characterization of innexin gene expression and functional roles of gap-junctional communication in planarian regeneration. *Dev Biol* 287: 314-335.
- NOGI T, ZHANG D, CHAN JD, MARCHANT JS (2009) A novel biological activity of praziquantel requiring voltage-operated Ca²⁺ channel beta subunits: subversion of flatworm regenerative polarity *PLoS Negl Trop Dis* 3:e464.
- ORII H, WATANABE K (2007) Bone morphogenetic protein is required for dorso-ventral patterning in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Growth Differ* 49: 345-349.
- OVIEDO NJ, MOROKUMA J, WALENTEK P, KEMA IP, GU MB, AHN JM, HWANG JS, GOJOBORI T, LEVIN M (2010) Long-range neural and gap junction protein-mediated cues control polarity during planarian regeneration *Dev Biol* 339: 188-199.
- PARK TJ, MITCHELL BJ, ABITUA PB, KINTNER C, WALLINGFORD WH (2008) Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat Genet* 40: 871-879.
- PETERSEN CP, REDDIEN PW (2008) *Smed-βcatenin-1* is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. *Science* 319: 327-330.
- PETERSEN CP, REDDIEN PW (2009) A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17061-17066.
- PETERSEN CP, REDDIEN PW (2009) Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 139: 1231-1241.
- PETERSEN CP, REDDIEN PW (2011) Polarized notum activation at wounds inhibits Wnt function to promote planarian head regeneration. *Science* 332: 852-855.
- RAJNICEK A., MCCAIG C. (1997) Guidance of CNS growth cones by substratum grooves and ridges: effects of inhibitors of the cytoskeleton, calcium channels and signal transduction pathways. *J Cell Sci* 110: 2915-2924.
- REDDIEN PW, BERMANGE AL, KICZA AM, SÁNCHEZ-ALVARADO A (2007) BMP signaling regulates the dorsal planarian midline and is needed for asymmetric regeneration. *Development* 134: 4043-4051.
- REDDIEN PW (2011) Constitutive gene expression and the specification of tissue identity in adult planarian biology. *Trends Genet* 27: 277-285.
- RINK JC, GURLEY KA, ELLIOTT SA, SÁNCHEZ ALVARADO A. (2009) Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia. *Science* 326: 1406-1410.
- SALÓ E (2006) The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *Bioessays* 28: 546-559.
- SCHILT J (1970) Induction expérimentale d'excroissances par des greffes hétéropolaires chez la planaire *Dugesia lugubris* O. Schimdt. *Ann Embryol Morphogenet* 3: 93-106.
- SCHNEIDER SQ, BOWERMAN B (2007) beta-Catenin asymmetries after all animal/vegetal- oriented cell divisions in *Platynereis dumerilii* embryos mediate binary cell-fate specification. *Dev Cell* 13: 73-86.
- STERN CD (2005) Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development*. 132: 2007-2021.
- ULLOA F, ITASAKI N, BRISCOE J (2007) Inhibitory Gli3 activity negatively regulates Wnt/ β -catenin signaling. *Curr Biol* 17: 545-550.
- VAN AMERONGEN R, NUSSE R (2009) Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136: 3205-3214.
- WALLINGFORD JB, MITCHELL B (2011) Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. *Genes Dev* 25: 201-213.
- WAGNER DE, WANG IE, REDDIEN PW (2011) Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* 332: 811-816.
- YAZAWA S, UMESONO Y, HAYASHI T, TARUI H, AGATA K (2009) Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 22329-22334.

Further Related Reading, published previously in the *Int. J. Dev. Biol.*

Planarian regeneration: achievements and future directions after 20 years of research

Emili Saló, Josep F. Abril, Teresa Adell, Francesc Cebrià, Kay Eckelt, Enrique Fernández-Taboada, Mette Handberg-Thorsager, Marta Iglesias, M Dolores Molina and Gustavo Rodríguez-Esteban
Int. J. Dev. Biol. (2009) 53: 1317-1327

From Planarians to Mammals - the many faces of regeneration

Jerzy Moraczewski, Karolina Archacka, Edyta Brzoska, Maria-Anna Ciemerych, Iwona Grabowska, Katarzyna Janczyk-Ilach, Wladyslawa Streminska and Malgorzata Zimowska
Int. J. Dev. Biol. (2008) 52: 219-227

Wnt signaling in hydroid development: ectopic heads and giant buds induced by GSK-3beta inhibitors

Werner Müller, Uri Frank, Regina Teo, Ofer Mokady, Christina Guette and Günter Plickert
Int. J. Dev. Biol. (2007) 51: 211-220

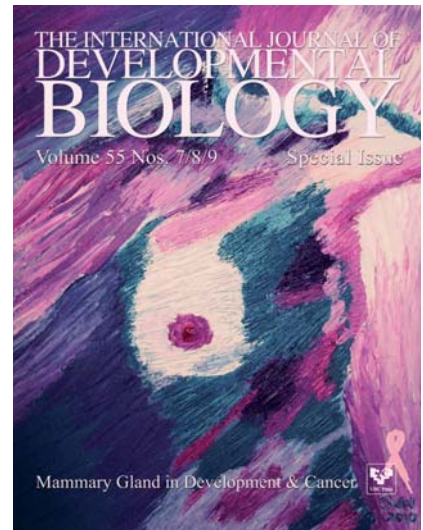
Disto-proximal regional determination and intercalary regeneration in planarians, revealed by retinoic acid induced disruption of regeneration.

R Romero and D Bueno
Int. J. Dev. Biol. (2001) 45: 669-673

A homeobox gene of the orthodenticle family is involved in antero-posterior patterning of regenerating planarians.

A Stornaiuolo, J R Bayascas, E Saló and E Boncinelli
Int. J. Dev. Biol. (1998) 42: 1153-118

5 yr ISI Impact Factor (2010) = 2.961



AGRADECIMIENTOS

“The important thing is not who you are, but who you are with.”

Llevo años recordando esta frase que le escuché a Iswaar Hariharan mientras hablaba de “cell sociology” para ponerla al frente de los agradecimientos, ya que tal y como una célula, una persona no es nadie sin su contexto. En mi caso, no puedo pensar en mejor entorno para haber realizado mi tesis. No sólo por la suerte de las publicaciones que hemos conseguido ni por todo lo que he aprendido, sino porque las personas con las que he compartido estos años me habéis enseñado a disfrutar haciendo ciencia y porque sinceramente, me lo he pasado brutal. Cuando empiezas la tesis eres como una esponja que absorbe las costumbres y conocimientos que encuentras a tu alrededor. De ahí, los primeros años trasnochando en el laboratorio, el intentar entender los modelos de transición a la bilateralidad de Martindale, descubrir la importancia de la arquitectura genómica durante la evolución, poner RTs a las tantas de la mañana sorteando a las atractivas chic@s cerca del Parc y muuuchas birras. Muchos os fuisteis y otros llegasteis, con los que seguí disfrutando y aprendiendo. Citar cada uno de vuestros nombres me resulta muy difícil por que no puedo pensar en una única situación o recuerdo en particular con la que asociaros y por la que agradeceros. No cabrían en esta página tantos viajes/workshops a islas del pacífico, retreats en el mediterráneo, congresos alrededor del mundo, el tour de festivales (Midnight City forever...), road-trips a Madrid, la Feria (de Sevilla)...y Barcelona, de día y de nit, las fiestas en Rosés 67, el Okinawa, el Bugui, el chino de Nacho (a pesar de que me tuvo al borde de la muerte), grandes Nasty Mondays, el Karma, el Salamandra (muy a pesar de mi salud también...), noches de series-yonkis en Diputació 154 (subpoena, probono) y sobretodo, los recuerdos del día a día en el lab (Sweet Nothing, mucha cuquez y el universo me reporta, entre muchos otros). Han sido unos años inolvidables en todos los sentidos y me ha encantado compartirlos con cada uno de vosotros. Y sé que aunque estos años no se repetirán nunca, estos recuerdos son sólo el principio de muchos más que compartiremos (como el Chocolate con churros...)

Por supuesto, agradecer también a mis directores de tesis, por que han permitido que estos años me hayan moldeado así, dejándome la libertad necesaria para desarrollarme como científica a la vez que siempre han estado ahí cuando les he necesitado, personal y profesionalmente.

A todas las personas que he conocido, inigualables compañeros de piso y de vida.

A los que habéis sido una parte esencial de estos años, aunque éstos nos hayan separado.

A mis amigos de Sevilla, que también habéis formado parte de esta etapa, al igual que de todas las que están por venir.

A mi compañero, con el que estoy deseando vivir todo lo nuevo que nos espera.

A mi familia; a mis titos; a mis abuelos, que estarían muy orgullosos de ver un libro, de cualquier tipo, con mi nombre.

A mis padres y a mi hermana, por que sois la causa de todo, de la persona que soy y de lo que he conseguido y conseguiré.

Y para terminar, cito a un amigo para decir que gracias a todos vosotros “volvería a hacer esta tesis una y mil veces”.

María