



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Organogènesi del sistema nerviós i dels òrgans sensorials en el desenvolupament embrionari de la planària *Schmidtea polychroa*

Francisco Monjo Luis

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE GENÈTICA  
PROGRAMA DE DOCTORAT DE GENÈTICA

Organogènesi del sistema nerviós i dels òrgans  
sensorials en el desenvolupament embrionari de la  
planària *Schmidtea polychroa*

FRANCISCO MONJO LUIS

TESI DOCTORAL  
2015







FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE GENÈTICA  
PROGRAMA DE DOCTORAT DE GENÈTICA

Organogènesi del sistema nerviós i dels òrgans  
sensorials en el desenvolupament embrionari de la  
planària *Schmidtea polychroa*

MEMÒRIA PRESENTADA PER  
**FRANCISCO MONJO LUIS**

PER OPTAR AL GRAU DE  
**DOCTOR PER LA UNIVERSITAT DE BARCELONA**

Tesi doctoral realitzada sota la direcció del Dr. Rafael Romero Benedí del  
Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de  
Barcelona

EL DIRECTOR

L'AUTOR

Dr. Rafael Romero Benedí

Francisco Monjo Luis

Barcelona, 2 de Novembre de 2015



# ÍNDEX

<b>ÍNDEX</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	5
1. El sistema nerviós .....	7
1.1 Desenvolupament del sistema nerviós .....	12
1.2 Desenvolupament del sistema nerviós a grups seleccionats de metazous .....	15
1.2.1 Neurogènesi en el grup germà dels Bilateria: Cnidaria .....	16
1.2.2 Neurogènesi als Bilateria: Models de neurogènesi dels Deuterostomia .....	18
Hemichordata. <i>Saccoglossus kowalevskii</i> .....	18
Chordata. Vertebrats .....	19
1.2.3 Neurogènesi als Bilateria: Models de neurogènesi dels Protostomia .....	23
Ecdysozoa. <i>Drosophila melanogaster</i> .....	23
Ecdysozoa. <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	26
Spiralia .....	28
Neurogènesi als Annelida: <i>Platynereis dumerilii</i> i <i>Capitella teleta</i> .....	30
Neurogènesi als Mollusca .....	33
Neurogènesi als Brachiopoda: <i>Terebratalia transversa</i> .....	34
1.2.4 Un programa comú de neurogènesi als bilaterals? .....	34
1.3 Mecanismes moleculars de control de la neurogènesi .....	36
2. Les planàries .....	41
2.1 Posició filogenètica .....	42
2.2 Anatomia general .....	44
Epidermis .....	44
Musculatura .....	45
Sistema excretor .....	45
Sistema digestiu .....	47
Sistema nerviós i òrgans sensorials .....	48
El parènquima .....	49
2.3 Reproducció .....	50
2.4 Desenvolupament embrionari .....	52
2.4.1 Els 8 estadis embrionaris de <i>S. polychroa</i> .....	52
2.4.2 L'estadi larvari .....	55
2.4.3 Formació dels sistema nerviós i dels ulls durant l'embriogènesi .....	56

2.5 Regeneració .....	58
2.5.1 El procés de la regeneració .....	59
2.5.2 Regeneració del sistema nerviós i dels ulls .....	60
2.5.3 Mecanismes moleculars que regulen la regeneració del sistema nerviós i visual .....	62
2.5.4 Els anticossos monoclonals i l'estudi de les planàries .....	66
<b>OBJECTIUS .....</b>	<b>69</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>73</b>
Informe del director sobre la participació del doctorand i l'índex d'impacte de les publicacions .....	75
Article 1. Embryonic development of the nervous system in the planarian <i>Schmidtea polychroa</i> .....	79
Resum .....	81
Article .....	83
Material Suplementari .....	99
Article 2. Morphological and molecular development of the eyes during the embryogenesis of the freshwater planarian <i>Schmidtea polychroa</i> .....	119
Resum .....	121
Article .....	123
Material Suplementari .....	133
<b>DISCUSSIÓ GENERAL .....</b>	<b>139</b>
1. El desenvolupament del sistema nerviós i d'altres derivats de l'ectoderm a l'embrió de <i>S. polychroa</i> .....	141
Òrgans epitelials: epidermis embrionària .....	141
Quina molècula reconeix l'anticòs monoclonal EpEmb? .....	142
Òrgans epitelials: epidermis definitiva .....	144
El sistema nerviós de l'estadi de larva intracapsular .....	145
Organogènesi del sistema nerviós definitiu .....	146
Comparació del model de neurogènesi embrionària de <i>S. polychroa</i> amb els mecanismes reguladors de la neurogènesi dels Bilateria .....	147
2. Relació entre el sistema nerviós, la miogènesi i l'establiment del patró en embrions de <i>S. polychroa</i> .....	152
Sistema neuromuscular .....	152

Polaritat dorsoventral a l'estadi 5 .....	155
3. Relació entre el desenvolupament embrionari i la regeneració .....	157
El sistema nerviós i la capacitat de regeneració de l'embrió .....	158
<b>CONCLUSIONS</b> .....	161
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	165
<b>ANNEXES</b> .....	183
Annex 1. Miogènesi en embrions de <i>S. polychroa</i> .....	185
Annex 2, Article 3. Generació d'anticossos monoclonals per l'embrió de la planària <i>Schmidtea polychroa</i> .....	193
Resum .....	195
Article .....	197
Annex 3, Article 4. Planarian embryology in the era of comparative developmental biology .....	225
Resum .....	227
Article .....	229



# INTRODUCCIÓ





## 1. El sistema nerviós

El desenvolupament d'un sistema nerviós és una innovació clau de l'evolució dels animals que va permetre desenvolupar una comunicació ràpida i eficient entre les cèl·lules d'un organisme a mesura que n'augmentava la complexitat (Nielsen, 2008). La seva funció primordial és la de rebre, codificar i integrar informació del medi intern i extern, i iniciar una resposta apropiada. És, per tant, el responsable d'accions relativament bàsiques, com la senyalització entre cèl·lules, i de més elaborades, com la coordinació dels sistemes d'òrgans o les interaccions entre els animals. En els éssers humans, la sofisticació del sistema nerviós fa possible l'aparició de capacitats cognitives complexes com per exemple el llenguatge, la cultura o la representació abstracta de conceptes.

El sistema nerviós és, a grans trets, un xarxa de cèl·lules especialitzades, les neurones, que són capaces d'emetre senyals nerviosos (o potencials d'acció) que es poden propagar a altres cèl·lules amb les sinapsis. La morfologia de les neurones reflexa la seva adaptació per dur a terme aquestes funcions: típicament consten d'una part receptora conformada pel cos cel·lular i l'arbre dendrític, i una de transmissora identificada amb l'axó i la seva regió terminal. Així, per la membrana de l'axó viatgen onades de descàrregues elèctriques que, en arribar al seu extrem, produeixen la senyalització sinàptica amb la dendrita d'una altra neurona o amb la membrana d'una cèl·lula diana. Amb aquest mecanisme s'alliberen substàncies de naturalesa iònica (o sinapsi elèctrica) o molècules de neurotransmissor (o sinapsi química) que permeten inhibir, excitar, o modular d'una altra manera la cèl·lula innervada.

A nivell funcional, diverses neurones poden treballar en grups anomenats arcs reflexes, que són la unitat bàsica de l'activitat nerviosa integrada. L'arc reflex primordial estava constituït per una sola cèl·lula multifuncional que era la responsable de generar el circuit necessari per rebre i donar resposta a un estímul. En la majoria d'animals, però, aquesta funció es va compartimentar en, com a mínim, dues neurones, una d'aferent (o sensorial) i una d'eferent (o motora) que s'encarreguen, respectivament, de conduir la informació cap a o des dels centres nerviosos. A mesura que es van anar agregant intermediaris entre aquests dos grups van aparèixer les interneurones, i això va permetre que els circuits neuronals adquirissin una major plasticitat i que es donés una progressiva concentració de neurones en regions estratègiques del cos.

Les neurones s'acostumen a acompanyar per les cèl·lules de la glia, que també formen part de la histologia nerviosa. La glia es caracteritza per la presència d'abundants inclusions de tipus granular i vesicular al citoplasma, i per la capacitat de formar un embolcall més o menys elaborat al voltant de les neurones. El cas més paradigmàtic d'aquest fenomen és la cobertura de l'axó amb una capa de mielina, una substància lipídica que augmenta la rapidesa i l'eficiència de transmissió dels impulsos nerviosos. Les funcions que s'atribueixen a les cèl·lules de la glia són sempre associades amb la protecció i l'assistència a la neurona; s'encarreguen, entre d'altres, d'eliminar residus cel·lulars o neurotransmissors, donar suport estructural, fagocitar patògens, participar en el desenvolupament i la reparació del sistema

nerviós, i intervenir en la modulació dels circuits neuronals (Hartline, 2011). A l'organisme poden ser tan o més nombroses que les neurones i es classifiquen segons la seva localització o per la seva morfologia i funció.

Si observem la diversitat animal existent i del registre fòssil comprovarem que s'ha produït un augment progressiu de la complexitat del sistema nerviós que probablement reflecteix de manera general etapes del seu procés d'evolució (Schmidt-Rhaesa, 2007). Avui en dia, però, la majoria d'animals pluricel·lulars (o metazous) desenvolupen un d'aquests dos tipus de sistemes nerviosos:

**Sistema nerviós difús:** està format per una xarxa de neurones sensorials epitelials i neurones efectores subepitelials que s'encarreguen de rebre i processar informació locomotora o neurosecretora a nivell local. No es distingeix un centre integrador de la informació i les senyals que s'originen en un punt de la xarxa es poden estendre en qualsevol direcció. Un exemple de sistema nerviós difús el trobem a l'epiteli de la paret del cos dels cnidaris o dels hemicordats.

**Sistema nerviós centralitzat (o SNC):** és un teixit nerviós delimitat que compren aglomeracions de neurones especialitzades (o nuclis) que s'interconnecten per tractes axonals (o neuròpils). Es pot subdividir en parts separades (o ganglis), i es comunica amb la perifèria mitjançant commissures o nervis en els quals diversos axons són embolcallats per una capa de teixit conjuntiu. La forma més simple de SNC està constituïda per un cervell anterior organitzat en dos grans ganglis i un cordó nerviós longitudinal que discorre fins a l'extrem posterior del cos. Des d'aquests òrgans s'estenen branques laterals i altres tipus de projeccions que contacten amb les neurones del sistema nerviós perifèric (o SNP), que es localitzen per sota de o entre l'epidermis, o bé formen plexes que innerven els òrgans interns. Així, el SNP s'encarrega de captar la informació i transmetre-la cap al SNC, i, aquest, la transporta al cervell que és l'òrgan integrador dels inputs i l'iniciador de les respostes. El SNC adopta diferents graus de complexitat en diferents filums d'animals, sent els més notables l'increment de la mida, configuració i capacitat funcional del cervell dels cordats, o el desenvolupament del sistema nerviós dels cefalòpodes que és el que conté el cervell més gran en relació a la resta del cos de tots els organismes invertebrats.

A banda, trobem altres elements habituals del sistema nerviós com són els òrgans i les neurones sensorials, que són els qui tradueixen en senyals reconeixibles els estímuls del medi. La informació captada d'aquesta manera pot ser molt variable, i inclou, entre d'altres, l'associada amb les forces mecàniques, el so, els camps elèctrics o la temperatura. Els principis bàsics de la transducció de les diferents senyals són molt similars entre ells, i impliquen l'activitat de proteïnes de membrana que poden ser excitades i llavors afavoreixen la creació d'un potencial d'acció que es transmet a una interneurona o una neurona eferent. Les cèl·lules receptores desenvolupen extensions de la seva membrana on s'hi concentra tot la maquinària proteica necessària per aquestes funcions.

Un cas particular d'òrgans sensorials són els ulls o els ocells, que són qui duen a terme la fotorecepció, és a dir, l'adquisició de les emissions lluminoses. Tots els ulls contenen, com a mínim, una cèl·lula fotoreceptora i una cèl·lula pigmentària (Arendt i Wittbrodt, 2001). Els fotoreceptors són els responsables de la detecció de la llum i disposen de molècules fotosensibles, l'apoproteïna opsina, que estan connectades a una cascada de fototransducció (Vopalensky i Kozmik, 2009). Les opsines formen part del grup cromòfor i s'acumulen en microvillis (o ulls rabdomèrics) o en cilis (o ulls ciliars) a la superfície de la cèl·lula. La cèl·lula pigmentària, en canvi, protegeix a la cèl·lula fotoreceptora d'un excés de llum i permet, a la vegada, establir una direccionalitat de la radiació (Vopalensky i Kozmik, 2009). L'acoblament de les cèl·lules fotoreceptores amb les cèl·lules pigmentàries ha donat lloc a molts patrons diferents, entre els quals els més comuns són:

**Ulls en càmera:** les cèl·lules fotoreceptores s'agrupen protegides per les cèl·lules pigmentàries en una cambra comuna. Són característics dels vertebrats.

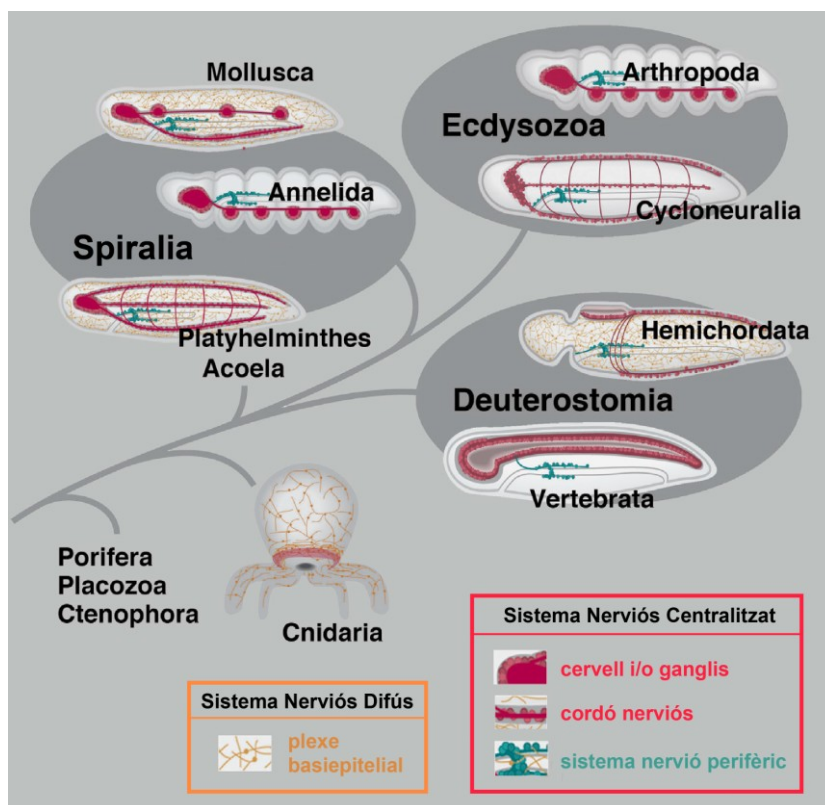
**Ulls compostos:** la unitat bàsica s'anomena ommatidi i està format per un nombre reduït d'ambdós tipus cel·lulars. L'agregació de diversos ommatidis forma l'ull compost. Són característics de molts artròpodes.

Els ulls també es poden classificar en eversos o inversos segons si la cèl·lula fotoreceptora està o no integrada amb les cèl·lules pigmentàries (Schmidte-Rhaesa, 2007). En els primers, els fotoreceptors projecten les seves estructures receptores cap al pigment i es connecten en paral·lel però per la regió oposada amb el sistema nerviós. En els segons, les cèl·lules pigmentàries formen una copa i les cèl·lules fotoreceptores penetren a la seva zona des del marge, el que força a la neurona a fer un gir de noranta graus respecte d'aquells.

Entendre com han canviat amb el temps aquests sistemes d'òrgans pot orientar-nos d'una manera definitiva sobre la comprensió de l'evolució animal. En principi hauria de ser possible la resolució d'aquestes qüestions amb la comparació del registre fòssil de diversos llinatges per distingir entre les alternatives. No obstant això, en la pràctica, a causa de dades incompletes fòssils (Budd, 2009), aquestes preguntes exigeixen d'estudis comparatius amb els animals existents per tal d'identificar homologies que poguessin haver estat adquirides de l'ancestre comú.

En el camp de la biologia evolutiva del sistema nerviós inicialment l'homologia es cercava a escala morfològica. Així, observant la distribució filogenètica dels tipus de sistemes nerviosos en un arbre *consensus* dels metazous (Figura 1) hom pot adonar-se que un dels primers organismes en desenvolupar una xarxa de neurones varen ser els del grup que inclou les anemones de mar, els coralls i les meduses (o Cnidaria) o bé un antecessor que hi estaria estretament relacionat (Nielsen, 2008; Liechneckert i Reichert, 2007). Aquests organismes mostren un sistema nerviós relativament simple consistent en una xarxa difusa i són, per tant, uns bons representants de les etapes primerenques de la seva evolució (Galliot i Quiquand, 2011). Amb l'explosió Càmbrica fa 550 milions d'anys i la conseqüent radiació animal s'establiren la majoria de clades dels Bilateria, animals de simetria bilateral i d'organització

triploblàstica (o amb teixits provinents de tres fulls embrionaris, l'ectoderma, el mesoderma i l'endoderma; Nielsen, 2008). Amb ells apareixen els primers sistemes nerviosos centralitzats i, amb el temps, aquesta organització es fa comú entre molts membres dels Deuterostomia i els Protostomia, les dues grans branques d'organismes bilaterals; en diversos grups de deuteròstoms, però, el cordó nerviós del SNC es localitza a la part dorsal del cos (p. e. als cordats), mentre que als protòstoms és majoritàriament a la part ventral (Figura 1; Schmidt-Rhaesa, 2007). Malgrat això, trobem que un sistema nerviós subepitelial semblant al dels cnidaris també és present en tàxons clau d'aquells grups, com ara els hemicordats deuteròstoms (Nübler-Jung i Arendt, 1996; Lowe i altres, 2003). Aquest fet, junt amb el que alguns cnidaris mostren estructures que suggereixen un cert nivell de centralització, com l'anell nerviós del voltant de la boca (Mackie, 2004), i la incerta posició filogenètica d'altres tàxons com els acels (Ruiz Trillo i altres, 1999; Philippe i altres, 2011), ha qüestionat quina de les dues formes és la més derivada i quin l'estat més ancestral (Holland, 2003; Liechtneker i Reichert, 2007; Schmidt-Rhaesa, 2007; Arendt i altres, 2008). A més, recentment, el posicionament com a basal respecte dels Porifera i Placozoa dels Ctenophora, un altres clade pre-bilateral amb un sistema nerviós difús, ha obert el debat de si el sistema nerviós va sorgir un sol cop i es va perdre secundàriament en aquells grups, o si es va originar independentment dos cops -als Ctenophora, i als Cnidaria+Bilateria- durant l'evolució animal (Moroz i altres, 2014; Ryan i altres, 2014). D'igual manera, la distribució dels tipus d'ulls ha incitat tot tipus de discussions fins que, finalment, s'ha proposat l'aparició separada i independent d'aquests òrgans en un nombre d'entre 40 i 65 vegades en els metazous (Schmidt-Rhaesa, 2007).



**Figura 1. Estructura del sistema nerviós als principals grups de metazous.** S'hi indiquen els teixits associats amb un sistema nerviós difús (en taronja) o amb un de centralitzat (òrgans del sistema nerviós central en vermell, i sistema nerviós perifèric en verd; modificat de Hartenstein i Stollewerk, 2015; la distribució filogenètica està basada en Ruíz-Trillo i altres, 1999, i Hejnal i altres, 2009). Tots els dibuixos menys el de Cnidaria mostren una visió lateral d'un animal adult on l'anterior és a l'esquerra i el dorsal a la part superior; Cnidaria s'organitza en un sol eix primari oral-aboral on la boca, que es troba a la part inferior del dibuix, demarca el pol oral.

Una altra aproximació a la cerca d'homologies la trobem en l'estudi de l'ontogènia del sistema nerviós. En els darrers 20 anys, amb l'emergència del camp de la biologia molecular, s'ha demostrat que la majoria dels gens que controlen el desenvolupament estan conservats entre els diferents filums animals, incloent-hi alguns dels llinatges més basals dels metazous i fins i tot organismes unicel·lulars (Baguñà i García-Fernández, 2003; Larroux i altres, 2008; Degnan i altres, 2009). Aquests s'acostumen a relacionar entre ells amb xarxes gèniques que, en últim terme, controlen processos equivalents a l'embrió (Davidson i Erwin, 2006). Pel que fa al desenvolupament del sistema nerviós (o neurogènesi) s'han identificat diferents mòduls genètics responsables de les seves etapes més primerenques, per exemple, aquells associats amb la determinació i formació dels progenitors neuronals (Guth i Wegner, 2008; Sarkar i Hochedlinger, 2013; Mizutani i Bier, 2008), amb l'establiment del patró (Hirth i Reichert, 2007; Niehrs, 2010), o amb l'especificació cel·lular (Bertrand i altres, 2002; Guillemot, 2007; Vopalensky i Kozmik, 2009). Els procés de neurogènesi, a més, pot ser acotat a una sèrie de passos discrets que són comuns entre els Deuterostomia, Cnidaria i Edysozoa, un dels dos clades dels Protostomia (Goodman i Doe, 1993). Als Spiralia, l'altre gran grup de protòstoms (Giribert i altres, 2000), els estudis sobre aquestes qüestions s'han centrat als mol·luscs i anèl·lids (p. e. Tomarev i altres, 1997; Arendt i altres, 2002; Nederbragt i altres, 2002a; Nederbragt i altres, 2002b; Hartmann i altres, 2003; Le Gouar i altres, 2004; Denes i altres, 2007; Kerner i altres, 2009; Meyer i Seaver, 2009; Simionato i altres, 2009; Demilly i altres, 2013) mentre que poc se sap de la resta de filums. Analitzar l'organogènesi de les estructures nervioses, els patrons d'expressió i/o la funció d'aquells mòduls moleculars en altres grups de Spiralia és, per tant, necessari per reconstruir quin és el mode ancestral de neurogènesi primerenca del grup i, més enllà, per comprendre millor l'evolució d'aquest sistema d'òrgans als metazous.

Aquest treball tracta sobre l'estudi comparatiu de la neurogènesi embrionària a l'espècie de trícilad *Schmidtea polychroa*, un organisme model emergent que ha guanyat força en el camp de la regeneració i per al qual darrerament se n'ha començat a caracteritzar el desenvolupament embrionari a nivell molecular (Martín-Durán i altres, 2012b). Abans d'introduir els trets bàsics d'aquest organisme, però, presentaré el coneixement acumulat sobre el procés de neurogènesi primerenca en altres models animals. Així doncs, en aquesta primera part de la introducció em centraré en descriure els principals passos que se segueixen en el desenvolupament del sistema nerviós. Seguiré amb l'anàlisi del mode de neurogènesi en espècies d'aquells grups de metazous per als quals s'ha estudiat més a fons aquesta tema, on posaré un especial èmfasi en les seves etapes més inicials, i finalitzaré assenyalant els aspectes que estan conservats entre els diferents filums d'animals. En acabat, recopilo el coneixement dels principals mecanismes moleculars que regulen les etapes més crítiques d'aquest procés.

## 1.1 Desenvolupament del sistema nerviós

Els metazous arriben al seu partó corporal definitiu a través del desenvolupament des d'una sola cèl·lula, el zigot (Nielsen, 2012). Aquest procés s'inicia amb la segmentació i passa per una sèrie d'etapes més o menys estereotipades en que s'augmenta el nombre de cèl·lules i que acaben amb la diferenciació i la morfogènesi del juvenil -o de la larva, en animals amb un desenvolupament indirecte. Típicament, durant la segmentació el zigot es divideix diversos cops amb un patró característic de cada clade animal fins arribar a formar una massa de blastòmers denominada blàstula. A continuació s'esdevé la gastrulació en que els blastòmers es segreguen en capes o fulls embrionaris i es forma l'arquènteron, la cavitat digestiva primària. Com a conseqüència, la blàstula es transforma en una estructura més complexa, la gàstrula. En els organismes de simetria radial com els cnidaris aquesta gàstrula es diploblàstica i està limitada per un epiteli extern (o ectoderma) i un d'intern (o endoderma), mentre que els de simetria bilateral produeixen a més una tercera capa que es col·loca enmig de les altres dues (o mesoderma) i que els converteix en triploblàstics (Gilbert, 2010).

Els fulls embrionaris tenen un potencial de diferenciació més restringit i acaben donant lloc als teixits definitius a través de processos d'especificació i organogènesi. Així, des de l'endoderma es desenvolupa el tub digestiu i, ocasionalment, altres òrgans com els pulmons; al mesoderma es produeixen els òrgans que podríem considerar com a "intersticials" (p. e. músculs, teixits connectius, les gònades i òrgans associats amb l'aparell circulatori i excretor); i, finalment, l'ectoderma genera els epitelis i el sistema nerviós, incloent-hi les estructures sensorials.

El desenvolupament del sistema nerviós en particular s'inicia en les primeres etapes de l'embriogènesi, poc després de la gastrulació, i es pot perllongar fins a l'estadi juvenil o més enllà. L'estudi de la neurogènesi a la mosca *Drosophila melanogaster* va conduir a Goodman i Doe (1993) a dividir el procés en 8 passos que són aplicables a gairebé tots els animals pluricel·lulars amb un sistema nerviós i que són:

**1) La determinació i l'establiment de l'ectoderma neurogènic.** El tret de sortida de la neurogènesi és la determinació a partir de la coberta ectodèrmica que embolcalla l'embrió d'un ectoderma amb potencialitat per produir noves cèl·lules del sistema nerviós, és a dir, d'un ectoderma neurogènic. Aquesta potencialitat, però, pot ser propagada a cèl·lules distribuïdes per tot el teixit, i en aquest cas constitueix un ectoderma neurogènic generalitzat, o, alternativament, es pot veure restringida a un domini particular anomenat neuroectoderma.

L'ontogènia de l'ectoderma neurogènic ha estat un camp de treball intens, en especial des de la dècada dels anys noranta. En aquell moment diversos grups d'investigació van convergir en una visió que ha influït enormement en els estudis de neurobiologia i que es basa en la proposició de que l'estat per defecte de l'ectoderma és el d'esdevenir en neurogènic, i que només una senyal molecular repressora d'aquest estat fa que algunes cèl·lules vagin cap a llinatges epidèrmics (Stern, 2006). Per tant, en absència d'aquella molècula les cèl·lules del teixit sempre haurien de diferenciar en tipus nerviosos. Aquest model s'ha vist recolzat amb treballs posteriors en organismes model de vertebrats i a

*Drosophila melanogaster* (Mizutani i Bier, 2008), que, alhora, també n'han emfatitzat la complexitat, suggerint la implicació en un ordre seqüencial de més molècules de diverses vies de senyalització (Stern, 2006; Pera i altres, 2014).

**2) La generació i migració dels progenitors neuronals.** Un cop s'ha establert el neuroectoderma, es produeixen en aquell teixit les cèl·lules progenitores neuronals que són cèl·lules en divisió que habitualment passen per un nombre limitat de mitosis abans de produir una progènie nerviosa. Els patrons amb que aquests progenitors es poden multiplicar durant l'embriogènesi són, però, força diferenciats: es sotmeten a divisions asimètriques semblants a la d'una cèl·lula mare i, llavors, donen lloc a dues cèl·lules amb destins diferents on, típicament, una de les cèl·lules encara és proliferativa i l'altra és una precursora postmitòtica; o segueixen un patró simètric, en que es creen dues cèl·lules progenitores més o bé dues cèl·lules que emprenderan el camí de la diferenciació. Així, amb la divisió dels progenitors s'augmenta el nombre final de cèl·lules del sistema nerviós i, al neuroectoderma, es creen zones de creixement que més endavant diferenciaran en òrgans compostos com el cervell.

Durant la neurogènesi també trobem que els progenitors poden romandre a la superfície de l'epiteli neurogènic o ser internalitzats amb diferents tipus de moviments cel·lulars. Per exemple, amb la invaginació, en que es desplaça cap endins de l'embrió la major part d'aquell ectoderma. O amb la delaminació o la ingressió, en que es dona, respectivament, la migració de grups contigus de cèl·lules o de cèl·lules individuals des de la superfície apical cap a posicions més basals de l'epiteli. O, finalment, amb l'epibòlia en que es produeix un moviment de l'ectoderma epitelial que es propaga i s'estén com una unitat per tancar les capes més profundes de l'embrió, entre elles la de l'ectoderma neurogènic.

A més, un cop internalitzades, aquelles cèl·lules es queden en aquell lloc o, alternativament, migren a grans distàncies del mesènquima de l'embrió. El primer cas l'observem en el comportament dels neuroblasts de *Drosophila melanogaster*, mentre que el segon és dona en els moviments de migració radial al llarg de fibres de cèl·lules de la glia dels progenitors del cervell de vertebrats.

**3) L'especificació dels llinatges cel·lulars.** El sistema nerviós està format per una multitud de poblacions de neurones i també per diverses categories de cèl·lules de la glia. Totes aquestes cèl·lules s'especifiquen d'un mode jeràrquic durant la neurogènesi. Així, com hem vist, la primera decisió que ha de prendre l'ectoderma és si es convertirà en epiteli neural o epidèrmic. En cas de que segueixi el camí cap a epiteli neural, la segona decisió implicarà diferenciar-se en neurona o en cèl·lula de la glia i, la tercera, en quin subtipus ho farà. Tots aquests passos determinaran de manera successiva la naturalesa final de la cèl·lula.

En aquest procés és important determinar quin és el lloc i el moment de naixement d'una neurona, ja que aquests factors poden acabar afectant quina zona del sistema nerviós ocuparà la cèl·lula en el futur. Per exemple, la data de naixement de les neurones de la regió anterior del neuroectoderma de vertebrats determina quina capa del còrtex ocuparà aquella cèl·lula dins del cervell.



L'especificació temporal i espacial dels tipus i subtipus nerviosos s'obté amb una combinació de determinants materns heretats, d'interaccions cèl·lula a cèl·lula, amb la informació posicional de l'embrió i amb la segregació de factors d'especificació dins d'un llinatge descendent d'una cèl·lula mare. Algunes d'aquestes senyals actuen, per tant, amb propietats de factors extrínsecs -s'expressen en una cèl·lula progenitora en un moment donat i es transmeten a la progènie amb la divisió cel·lular- i d'altres com a factors extrínsecs -promouen en un moment concret un canvi en el patró de proliferació o en l'expressió d'alguns factors intrínsecs als progenitors (Bertrand i altres, 2002; Pearson i Doe, 2004; Guillemot, 2007; Kohwi i Doe, 2013).

També cal indicar que l'especificació del destí mostra una relació que pot estar o no lligada a la divisió del progenitor. És a dir, en la majoria d'ocasions les neurones inicien l'especificació dintre dels teixits en creixement i proliferació, però en d'altres les cèl·lules proliferatives romanen en un estat relativament indiferenciat durant l'embriogènesi i s'activa la seva determinació durant les fases més tardanes de la biologia de l'animal (p. e. durant la metamorfosi d'una larva o al juvenil). A més, en alguns organismes model com *Caenorhabditis elegans* s'ha vist que especificació i proliferació estan íntimament lligats i les poblacions de progenitors mostren patrons de divisió estrictament invariants que resulten en llinatges fixes de cèl·lules nervioses.

**4) El creixement i la guia dels axons.** La funció del sistema nerviós depèn no només de la diferenciació i la posició de les neurones, si no també de les connexions específiques que aquestes tenen amb les cèl·lules del voltant. Aquest factor condiona, entre d'altres, el patró local d'interaccions neuronals, la unió dels òrgans sensorials amb les neurones receptores del sistema nerviós, o el desplaçament a zones allunyades d'alguns axons del SNC.

El creixement dels axons es dona per l'acció de fibres nervioses pioneres, els coneguts com a cons de creixement axonal, que van per davant d'altres axons i els hi fan de guia. Els cons rastregen constantment l'ambient cel·lular i escullen la zona d'extensió mitjançant interaccions complementàries amb la superfície; alguns dels substrats que es troben són més adhesius i promouen la migració cap aquella direcció, mentre que d'altres ho són menys i fan que retrocedeixin.

Es poden distingir tres etapes durant l'extensió: l'etapa de selecció del camí, en que els axons viatgen al llarg d'una ruta que els porta a una regió concreta de l'embrió; l'etapa de selecció de la destinació, en que els axons reconeixen i s'uneixen a un conjunt de cèl·lules amb qui poden formar connectores estables; i l'etapa de la selecció de l'adreça, en que els patrons inicials són refinats de manera que cada axó s'uneix a un petit subconjunt dels seus possibles objectius. Cal remarcar, però, que les dues primeres etapes són independents de l'activitat nerviosa, i que la tercera implica la interacció entre diverses neurones que s'encarreguen de convertir les possibles projeccions solapants en un patró d'ajust fi i regulat.

**5) La formació de sinapsis.** Després del contacte de l'axó ha d'establir-se la sinapsi. La construcció de la sinapsi s'aconsegueix amb la migració del con de creixement per sobre de la superfície de la cèl·lula diana, i amb la formació de la làmina basal de la sinapsi i

l'engruiment de les membranes cel·lulars. Ulteriorment l'axó deixa de créixer per l'efecte de proteïnes que estan presents a làmina o que s'alliberen des de les vesícules sinàptiques.

**6) La unió de factors tròfics necessaris per la supervivència i la diferenciació.** Un dels fenòmens més inquietants de la neurogènesi embrionària és el de la mort cel·lular d'un gran nombre de neurones que s'han diferenciat correctament. Per exemple, durant el període fetal dels éssers humans moren aproximadament la meitat de les cèl·lules del cervell (Stiles i Jernigan, 2010). Amb aquest mecanisme es controla la correcta formació de circuits neuronals i s'eliminen poblacions cel·lulars que tenen una funció transient durant la neurogènesi.

La mort cel·lular de les neurones es regula amb processos d'apoptosi i es prevé amb factors neurotròfics que ajuden a la supervivència i que són subministrats pels teixits innervats o per les cèl·lules de la glia (Hartline, 2011; Stiles i Jernigan, 2010). Els factors neurotròfics també són importants durant l'edat adulta i la seva insuficiència pot resultar en malalties cognitives greus com el Parkinson.

**7) La reordenació competitiva de les sinapsis funcionals.** En ocasions els axons de diverses neurones innerven la mateixa cèl·lula però només es manté una de les unions en els estadis posteriors.

Malgrat la seva importància, aquesta qüestió ha estat investigada gairebé amb exclusivitat en les neurones que fan sinapsi amb les cèl·lules musculars (o motoneurones) en qui s'observa un fenomen de competència funcional dels axons per la selecció de la innervació. Així doncs, l'axó que produeix el potencial d'acció suficient per crear una resposta al múscul és qui es perllonga en el temps i qui té capacitat per suprimir la resta de sinapsis (Gilbert, 2010).

**8) La plasticitat sinàptica durant la vida de l'organisme.** És un procés que propicia el desenvolupament de noves connexions funcionals que poden ser necessàries en les etapes postembrionàries. Generalment es modula amb els inputs provinents del contacte entre l'organisme i l'ambient, i, en el mamífers, és la base de l'aprenentatge i la memòria.

## **1.2 Desenvolupament del sistema nerviós a grups seleccionats de metazous**

L'estudi comparat dels modes de neurogènesi, en especial en les etapes més primerenques -punts 1, 2 i 3 de la secció anterior-, ha demostrat ser una estratègia formidable per destriar quins són els mecanismes potencialment conservats que regulen la formació del sistema nerviós als metazous (p. e. Arendt i Wittbordt, 2001; Yeo i Gautier, 2004; Hirth i Reichert, 2007; Arendt i altres, 2008; Hartland, 2011; Hartenstein i Stollewerk, 2015). En aquesta secció passo a descriure d'una manera detallada aquells processos en models animals pertanyents als Cnidaria, i també en alguns Deuterostomia (p. e. Hemichordata i Vertebrata) i Protostomia (p. e. Nematoda, Arthropoda i alguns Spiralia). Per tal d'oferir una

imatge el més completa possible de cada model se'n concreta quins són els principals trets definitoris del clade, i també el tipus de sistema nerviós central i perifèric -principalment els òrgans visuals- que desenvolupa l'adult. Segueix una presentació del seu desenvolupament primerenc i, finalment, de la neurogènesi embrionària. En darrer lloc s'ofereix una taula resum i s'assenyalen les tendències evolutives més evidents de la neurogènesi primerenca que han identificat altres autors.

### 1.2.1 Neurogènesi en el grup germà dels Bilateria: Cnidaria

Biologia i estructura de sistema nerviós: Els Cnidaria són organismes de simetria radial o bilateral (Finnerty i altres, 2004), i diploblàstics en que l'ectoderma i l'endoderma es troben separats per una matriu extracel·lular, la mesoglea. Han esdevingut un model adequat per traçar els orígens de la neurogènesi degut a la seva posició filogenètica com a grup germà dels animals bilaterals (Galliot i altres, 2009; Galliot i Quiquand, 2011; Technau i Steele, 2011).

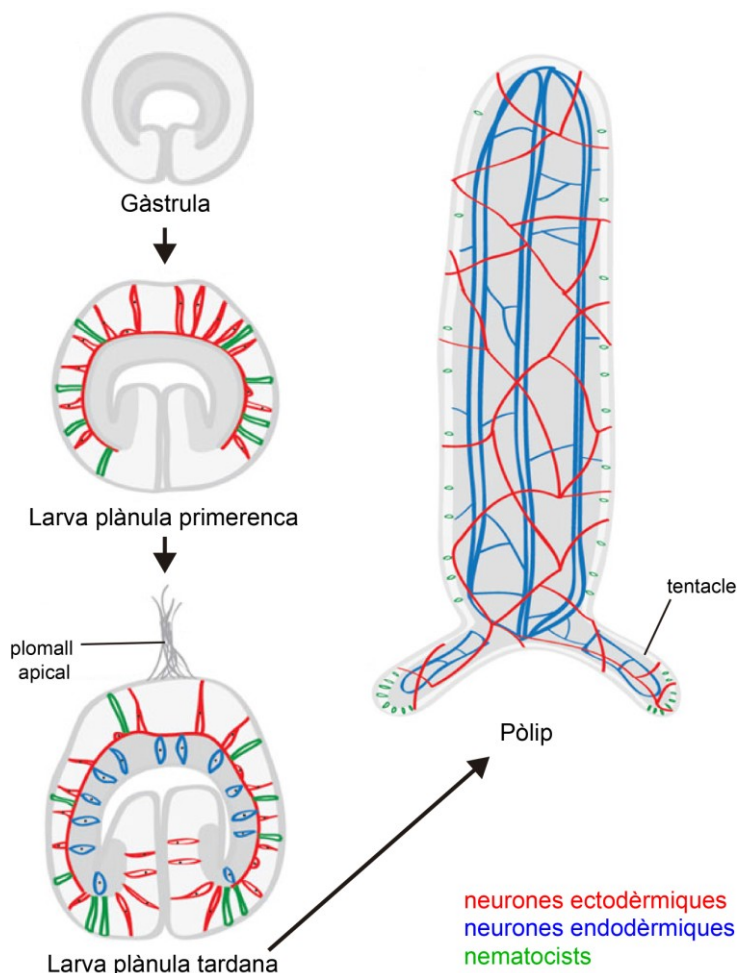
Els dos organismes de referència són *Nematostella vectensis* (classe Anthozoa) i *Hydra vulgaris* (classe Hydrozoa, ordre Medusozoa). *Nematostella* viu exclusivament com a pòlip sèssil, mentre que *Hydra* segueix un cicle vital peculiar en que la gàstrula origina directament l'estadi de pòlip i no arriba a formar una larva plànula o una medusa com en la resta d'espècies de Medusozoa; també es distingeix per mantenir una població de cèl·lules intersticials totipotents que li permeten regenerar i reproduir-se asexualment. Aquests trets han afavorit l'ús d'*Hydra* en estudis sobre la regeneració del sistema nerviós, mentre que a *Nematostella* s'hi ha caracteritzat sobre tot la neurogènesi embrionària (Galliot i altres, 2009).

El sistema nerviós adult d'ambdues espècies està format per neurones sensorials inserides a l'epidermis i neurones ganglionars subepitelials distribuïdes en una xarxa difusa per tot el pòlip. Algunes d'aquestes neurones arriben a concentrar-se en anells nerviosos que envolten la boca o altres regions. També s'observen cnidoblasts (o nematocists), que són un tipus de mecanoreceptor molt especialitzat i abundant que intervé en la captura de la presa i en la defensa de l'animal. No s'hi ha descrit la presència de cèl·lules de la glia.

A més, el pòlip de *Nematostella* mostra acumulacions nervioses de neurones i neurites associades amb replecs longitudinals de l'endoderma (Nakanishi i altres, 2012), i l'estadi de larva diferencia una estructura transitòria d'origen nerviós, el plomall apical (o òrgan sensorial apical) al pol aboral (o oposat a la boca) que capta senyals de l'ambient i que contribueix a la seva deposició i metamorfosi.

Desenvolupament embrionari i neurogènesi: En la majoria de cnidaris el desenvolupament embrionari és indirecte i les primeres divisions del zigot no mostren un patró de segmentació definit. Així, passen per una etapa de blàstula, que, per invaginació al pol animal, forma una gàstrula que, a la vegada, desenvolupa en una larva plànula ciliada abans de metamorfosar en el pòlip. La metamorfosi de la larva pot ser gradual o més dramàtica, i implica processos de mort cel·lular, proliferació i morfogènesi i, sovint, la substitució d'alguns teixits que s'havien diferenciat (Technau i Steele, 2011).

–Neurogènesi a *N. vectensis*: S'inicia entre l'estadi de blàstula tardana o de gàstrula. En aquell moment, tot l'ectoderma té potencial neurogènic i els progenitors neurals es troben distribuïts en petits clústers per la superfície (Magie i altres, 2005; Layden i altres, 2012; Richards i Rentzsch, 2014). Aquests funcionen amb una barreja de divisions simètriques i asimètriques, i, progressivament, es diferencien en cèl·lules sensorials o generen precursors que es desprenen de l'epiteli per convertir-se en cèl·lules ganglionars; els progenitors també originen els nematocists (Figura 2; Nakanishi i altres, 2012; Richards i Rentzsch, 2014), i, probablement, el plomall apical de la larva (Galliot i Quiquand, 2011). Més tard, en l'estadi de larva plànula, es consolida el plexe subepitelial i s'observa la formació de concentracions de neurones especialment a la regió aboral (Martin, 1992; Nakanishi i altres, 2008; Seipp i altres, 2010; Piraino i altres, 2011). Finalment, en la fase de pòlip es desenvolupa el plexe associat amb l'intestí a partir de cèl·lules progenitores endodèrmiques (Nakanishi i altres, 2012).



**Figura 2. Diferenciació del sistema nerviós de *Nematostella*.**

La neurogènesi s'inicia en una població de cèl·lules progenitores que es troben distribuïdes per tot l'ectoderma de la blàstula (no s'hi indica), i a l'estadi de plànula primerenca es fa evident la diferenciació de les neurones sensorials de l'ectoderma i ganglionars (en vermell), i dels nematocists (en verd) a la regió aboral o anterior de l'embrió. Més tard, a la larva plànula tardana, comença la neurogènesi des de l'endoderm (en blau), però no és fins a l'estadi de pòlip quan es consolida aquest plexe (modificat de Richards i Rentzsch, 2014). Tots els dibuixos mostren una secció transversal de l'embrió on el pol oral és a la part inferior del dibuix i el aboral a la superior; a la vegada, el pol oral es correspon amb la regió animal de la blàstula i el futur posterior de la larva i el pòlip, mentre que el pol aboral ho fa amb la regió vegetal i el futur anterior.

–Neurogènesi a *Hydra*: Els pòlips d'*Hydra* recanvien les neurones de manera activa i contínua amb un procés que és diferent al de *Nematostella*. Així, les cèl·lules del sistema nerviós i els nematocists es deriven de cèl·lules intersticials amb capacitat migradora que es localitzen entre l'ectoderma i l'endoderma de la columna del cos; aquestes cèl·lules també generen altres poblacions com cèl·lules secretores i de la línia germinal (Galliot i altres,

2009). Les cèl·lules intersticials progenitores de neurones es comporten com una cèl·lula mare que es divideix asimètricament, i s'autorenoven a la vegada que donen lloc a una cèl·lula filla que es diferencia o bé es sotmet unes quantes divisions més abans de fer-ho (Bode, 1996; David, 2012). Diverses senyals provinents dels extrems del cos (el cap i el peu) indueixen la migració dels precursors neuronals i les neurones (Galliot i Quiquand, 2011). Els progenitors dels nematocists formen, en canvi, petits clústers de fins a cinc cèl·lules sincitials que es diferencien abans de migrar cap als tentacles (Galliot i Quiquand, 2011). Un cop arribades a destí, les cèl·lules s'insereixen a l'epidermis o a regions subepitelials.

## 1.2.2 Neurogènesi als Bilateria: Models de neurogènesi dels Deuterostomia

### Hemichordata. *Saccoglossus kowalevskii*

Biologia i estructura de sistema nerviós: Els hemicordats són un fílum dels Deuterostomia estretament relacionat amb els cordats que tenen un cos celomat i segmentat en tres dominis -la probòscide, que es correspon amb l'anterior, el collar amb la medial i el tronc amb l'extrem posterior. En particular, *Saccoglossus kowalevskii* pertany al grup d'hemicordats enteropneusts i viu com a organisme bentònic; es reproduïxen sexualment amb la fecundació externa del ous, que estan envoltats per una capa de mucus gelatinosa secretada per la mare en el moment de la posta.

A nivell del sistema nerviós presenten moltes de les característiques plesiomòrfiques dels cnidaris (Lowe i altres, 2003), però també estructures que suggereixen un cert nivell de centralització (Nübler-Jung i Arendt, 1996; Nomaksteinsky i altres, 2009). Desenvolupen, per tant, un plexe nerviós subepitelial i diverses condensacions locals on les neurones s'empaqueten amb una alta densitat (Nübler-Jung i Arendt, 1996; Schmidt-Rhaesa, 2007; Nomaksteinsky i altres, 2009); alguns exemples en són el tub neural de la regió del collar o els cordons nerviosos que recorren per la part ventral i dorsal del tronc. Malgrat moltes de les neurones del plexe subepitelial tenen terminacions a l'epidermis no s'hi observa rastre d'òrgans sensorials.

Desenvolupament embrionari i neurogènesi: L'embriogènesi és directa i no passa per cap estadi de larva recognoscible (Colwin i Colwin, 1953; Lowe i altres, 2003). Els zigots es sotmeten a una segmentació holoblàstica i radial que finalitza amb la formació d'una blàstula buida en la qual les cèl·lules vegetals s'aplanen i s'organitzen en un plat vegetal. Durant la gastrulació, aquest plat s'invagina i, com a conseqüència, es forma un embrió organitzat en una capa interna d'endomesoderma i una d'externa d'ectoderma que és separada molt més tard amb la protrusió del celoma. Quan l'embrió ecllosiona, trenca la capa de mucus que el recobreix i s'enterra al substrat; allà adopta la forma adulta amb l'elongació del cos i la diferenciació de les estructures definitives.

L'estudi de la neurogènesi de *Saccoglossus* s'ha abordat principalment amb eines moleculars i, per tant, se'n desconeixen molts dels aspectes cel·lulars subjacents com ara els que fan referència al tipus de divisions dels progenitors o als mecanismes d'internalització d'alguns precursors. El treball més acurat el proporcionen Cunningham i Casey (2014);

aquests autors validen algunes de les observacions sobre la neurogènesi primerenca que havien estat descrites a Lowe i col·laboradors (2003) i, a més, determinen que:

–L'ectoderma de la gàstrula ja té un extens potencial neurogènic i comença a produir neurones poc després de la seva formació i abans de l'emergència del mesoderma; aquesta potencialitat podria estar especificada per endavant amb factors maternals del zigot

–Les neurones es diferencien quan encara estan dins de l'epiteli i ho fan amb una distribució àmplia per tot l'embrió. Amb el temps, però, la seva formació es concentra a la regió de la futura probòscide i als cordons dorsals i ventrals i, més endavant, el tub neural.

– En base a aquest patró de diferenciació, suggereixen que el sistema nerviós embrionari -el que es diferencia de forma difusa durant la fase de gàstrula- és transitori i es reorganitza abans de l'eclosió. Ara bé, no arriben a concloure si aquesta reestructuració es dona per la migració de neurones preexistents cap a la regió dels cordons, o amb la mort d'aquestes neurones i el naixement de noves neurones als cordons.

Altres estudis que complementen aquest model demostren que l'activació d'un gradient anteroposterior de senyals provinents del blastòpor o del pol posterior s'associa amb la regionalització anterior en la producció de neurones (Darras i altres, 2011), i que el tub neural es forma amb un procés d'invaginació (o neurulació) de l'ectoderma dorsal del collar que segueix un patró de posterior cap anterior; aquest fenomen és, fins a cert punt, similar a la neurulació dels vertebrats (Kaul i Stach, 2010).

## **Chordata. Vertebrats**

*Biologia i estructura de sistema nerviós:* Els vertebrats representen la majoria del filum cordats en quant a nombre d'espècies i inclouen grups tan diversos com els peixos, els amfibis, les aus o els mamífers. Entre d'altres caràcters, comparteixen amb aquells la presència d'una notocorda i un sistema nerviós basat en un cordó nerviós dorsal, i s'hi distingeixen per tenir una caixa cranial ben desenvolupada i un esquelet intern robust d'origen ossi i/o cartilaginós; a més, en tots els membres del grup excepte en els peixos de la classe mixinoïdeus l'esquelet de la regió dorsal es transforma en una columna vertebral que substitueix gran part de la notocorda durant l'embriogènesi tardana.

Han colonitzat un rang ampli d'hàbitats gràcies a la seva capacitat d'adaptació i són exuberants en quant als modes reproductius. Llevat d'excepcions, són sexuats i habitualment amb sexes separats, però de fecundació interna o externa, i amb cries vivíparas o ovíparas. La classe dels mamífers presenta la major complexitat en la reproducció, amb un embrió que es desenvolupa dins de la mare rebent l'aliment a través de la placenta i que, en néixer, es continua nodrint amb la llet segregada per les glàndules mamàries.

El seu sistema nerviós és típicament centralitzat i es construeix al voltant del cordó dorsal que s'engruixa en un cervell tripartit (o separat en tres grans dominis, el prosencèfal, el mesencèfal i el romboencèfal) a l'extrem anterior, i a la regió del tronc dona lloc a una espina dorsal. També desenvolupen òrgans sensorials parells dissenyats per la recepció a distància que inclouen els ulls amb lent i una retina inversa, els receptors de la pressió com les orelles

designades per l'equilibri o el so, o els receptors químics del gust o de les olors. Es creu que l'evolució d'aquests òrgans va estar influenciada pel canvi en l'estil de vida que es produí en l'ancestre del grup que amb una alta probabilitat va passar de ser filtrador a depredador actiu i, per tant, va requerir d'una major eficiència en la localització i la captura de la presa (Hickman Jr. i altres, 2006). Els òrgans sensorials es comuniquen amb el sistema nerviós central a través d'un sistema nerviós perifèric de tipus somàtic que consta de nombrosos ganglis i nervis cranials i raquidis, i existeix, a més, un sistema nerviós perifèric de tipus autònom que controla el funcionament dels òrgans interns.

Desenvolupament embrionari i neurogènesi: Com ja passava amb la reproducció, els modes de desenvolupament i de segmentació són també molt variables. Així, trobem grups que poden desenvolupar-se de manera directa (p. e. els peixos) o indirecta (p. e. els amfibis), i fins a tres tipus de patrons de segmentació del zigot: la holoblàstica rotacional, que és típica dels mamífers; la holoblàstica i radialment asimètrica, que s'observa en l'espècie model d'amfibi *Xenopus laevis*; i la meroblàstica discoïdal, que es característica de peixos com *Danio rerio* i de les aus (Gilbert, 2010). Malgrat aquestes grans diferències, tots els grups de vertebrats tenen en comú la formació d'un organitzador mesodèrmic dorsal que dirigeix la gastrulació i que propaga senyals que indueixen la neurogènesi a la regió propera de l'ectoderma (o el neuroectoderma o placa neural; Vieira i altres, 2010). Aquest organitzador diferenciarà durant la gastrulació en la notocorda, que serà decisiva per la regulació de la posició i el destí de cèl·lules derivades dels tres fulls embrionaris (Stemple, 2005).

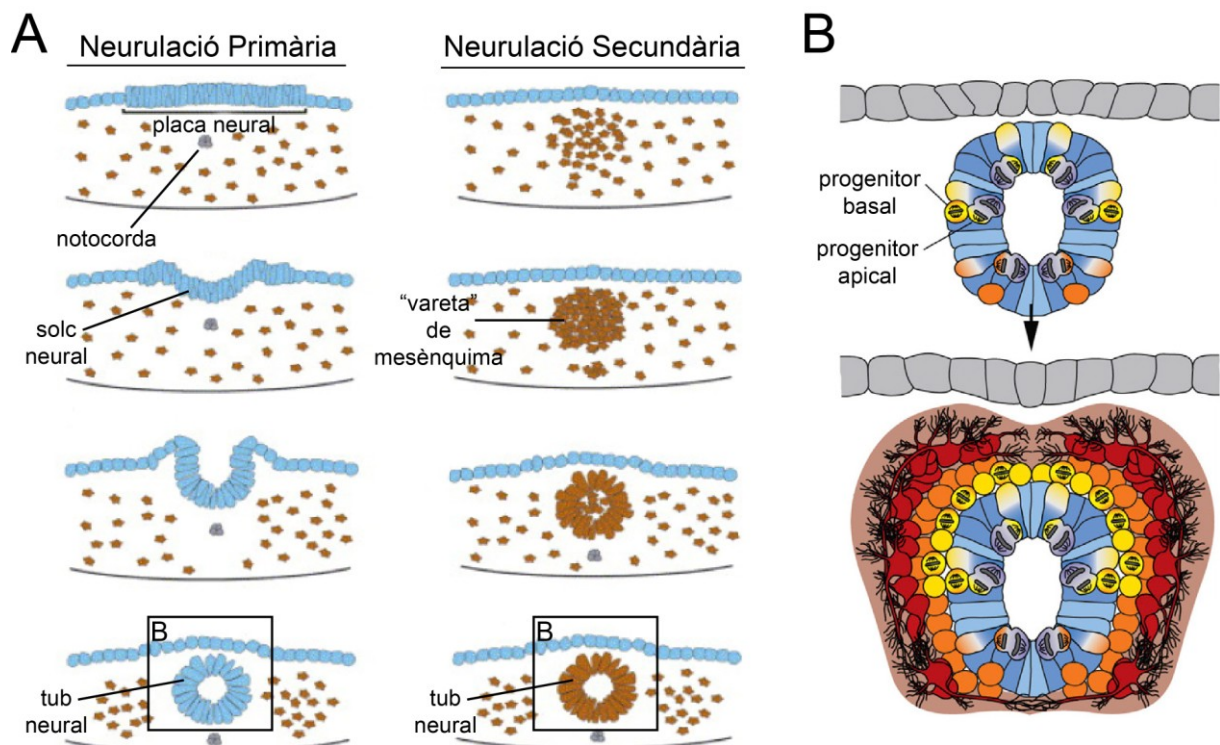
Pel que fa a la neurogènesi, els vertebrats són un dels Bilateria on s'ha estudiat més a fons. Com acabem de veure, es limita a un teixit concret, el neuroectoderma, que després de ser reclutat passa pels estadis de placa neural, de solc neural i de tub neural abans de generar les cèl·lules nervioses. S'han descrit dos mecanismes amb els quals l'epiteli de la placa es converteix en un tub intern (Figura 3A; Harrington i altres, 2009; Gilbert, 2010):

–Amb la neurulació primària, en que les cèl·lules de l'organitzador dirigeixen les de la placa a proliferar, invaginar en un solc neural, i “pessigar” des de la superfície fins a separar un tub buit. El tercer pas -el de “pessigar” o tancament del tub neural- no es dona de manera homogènia en tota la superfície del solc; per exemple, als amniotes el tancament progressa en un sentit d'anterior cap a posterior, mentre que a les aus s'inicia en la part mitja del futur cervell i avança alhora en ambdues direccions.

–Amb la neurulació secundària, en que el tub neural sorgeix de la coalescència de cèl·lules mesenquimàtiques en una cable sòlid que, posteriorment, forma cavitats que s'uneixen per crear un tub buit. En aquest procés les cèl·lules del mesènquima tenen l'origen en els presumptius ectoderma i endoderma.

D'aquesta manera s'arriba a la producció de dues porcions de tub neural separades - l'anterior que s'obté amb la neurulació primària i la més posterior amb la secundària-, i el tub complet es forma ajuntat els dos fragments (Harrington i altres, 2009). La neurulació primària també té la propietat de dividir l'ectoderma original en tres grups de cèl·lules: les pròpies del tub neural, que formaran el cervell i l'espina dorsal; les de l'epidermis i la pell externes; i la cresta neural, que és un teixit transitori que es separa de l'extrem dorsal de la placa i/o del tub

i que donarà lloc a neurones i cèl·lules de la glia del sistema perifèric, i a altres tipus de cèl·lules.



**Figura 3. Neurulació a vertebrats i estructura del tub neural.** **A** El tub neural es forma al llarg de l'eix anteroposterior amb dos mecanismes: amb la neurulació primària en que les cèl·lules de la placa neural (en blau) adopten una forma columnar per, després, plegar cap a l'interior de l'embrió i, amb l'ajut de moviments d'extensió convergent, formar el solc neural que s'allargarà i s'acabarà separant de l'epiteli per originar el tub del cap i de part del tronc de l'embrió; o bé amb la neurulació secundària, que es caracteritza per la condensació del mesènquima (en marró) en una "vareta" que, després, es sotmet a una transició epitelial per organitzar-se en el tub neural de la cua de l'embrió (modificat de Lowery i Sive, 2004). **B** Arquitectura del tub neural durant la neurogènesi. En el panell superior s'hi mostra un estadi primerenc en que només es reconeixen progenitors apicals a la part més interna del tub i progenitors basals a la més externa (en groc), mentre que el panell inferior il·lustra un estadi més avançat on s'han anat format diverses capes de cèl·lules nervioses (en taronja, vermell i marró; modificat de Hartenstein i Stollewerk, 2015). Tots els dibuixos mostren una secció transversal de l'embrió on el futur dorsal és a la part superior del dibuix.

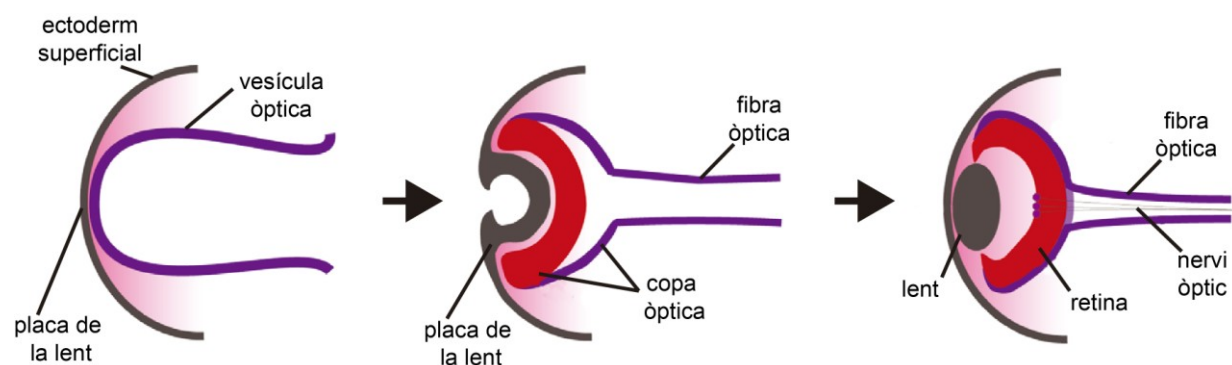
En general, el tub neural és força més grans que en altres grups de cordats més basals (p. e. l'amfiox), i es manté com una monocapa pseudoestratificada fins que s'expandeix per l'acció de cèl·lules proliferatives durant la neurogènesi primerenca (Figura 3B; Gilbert, 2010). Inicialment, les cèl·lules en proliferació o bé formen part del neuroepiteli (o progenitors apicals), o delaminen i cobreixen la superfície basal del teixit (o progenitors basals). Amb el temps, però, els progenitors apicals fan la transició a un estadi que és molecularment diferent (o cèl·lules radials de la glia), i canvien el seu mode de divisió, que passa de ser de tipus simètric a asimètric autorenovador (Götz i Huttner, 2005; Taverna i altres, 2014). Per tant, aquest tipus de progenitor més especialitzat genera una cèl·lula filla que es manté mitòticament activa i una altra que l'altra delamina i es diferencia en una



neurona, un oligodendròcit o, una cèl·lula semblant a un progenitor basal. En els estadis tardans de la neurogènesi, les cèl·lules radials canvien un altre cop les seves propietats amb el que se'n restringeix encara més el potencial -passen a diferenciar sobre tot en l'astroglia-, o bé es mantenen en un estat indiferenciat i passen a constituir un grup de cèl·lules mare nervioses adultes (Grabel, 2012). Els progenitors basals, en canvi, no s'autorenoven en cap moment i es divideixen un número limitat de vegades -típicament només una- abans de donar lloc a una neurona. Aquest tipus d'activitat incrementa enormement el nombre total de cèl·lules i permet l'expansió de determinades zones del cervell, com ara el telencèfal o el còrtex (Florio i Huttner, 2014).

Totes les poblacions cel·lulars que acabem de descriure s'organitzen en l'espai gràcies a un seguit de senyals difusibles que refinen un pre-patró que ja s'havia establert a l'embrió durant la gastrulació (Vieira i altres, 2010). En concret, durant la neurogènesi el tub neural es regionalitza en el sentit anteroposterior des de centres organitzadors secundaris inserits al propi teixit i es polaritza en el sentit dorsoventral des d'estructures com la notocorda, que es troba a ventral al llarg del tub, o la placa del pis, que es correspon amb la línia mitja ventral del tub. En últim terme, l'acció d'aquests centres reguladors controlarà processos com la partició del tub neural anterior o la formació diferencial de poblacions de neurones a l'espina dorsal.

Per últim, cal apuntar que la mort cel·lular programada és també present durant la neurogènesi dels vertebrats (Yeo i Gautier, 2004). De fet, sembla ser essencial en les seves etapes inicials ja que s'ha detectat dins de poblacions de progenitors del neuroectoderma i la placa neural, i en cèl·lules que tot just acabaven de sortir del cicle cel·lular. La funció exacta d'aquest fenomen sembla estar relacionada amb la correcció d'errors durant la diferenciació, o amb l'eliminació de cèl·lules que han sofert un dany durant la proliferació o que són sobreres (Yamaguchi i Miura, 2015).



**Figura 4. Desenvolupament de l'ull a vertebrats.** Les vesícules òptiques tenen l'origen en evaginacions des de la línia mitja del cervell anterior cap a l'ectoderma superficial suprajacent. A més, durant les etapes més tardanes es forma des de cèl·lules de procedència mesodèrmica una fibra òptica que embolcalla i protegeix el nervi òptic (modificat de Zagozewski i altres, 2014).

Pel que fa al desenvolupament dels òrgans sensorials, normalment implica tant la neurogènesi des de cèl·lules progenitores d'origen ectodèrmic com la formació de teixits

derivats del mesoderma o l'endoderma. Per exemple, els ulls creixen a partir del neuroepiteli, l'ectoderma epidèrmic, la cresta neural i una porció del mesoderma (Gilbert, 2010; Zagozewski i altres, 2014). El desenvolupament de l'ull comença durant la regionalització del tub neural, en una regió anomenada camp de l'ull que més tard es separa en dues vesícules òptiques a cada cantó del diencèfal (Figura 4). Llavors, les vesícules contacten amb l'ectoderma superficial del cap on hi indueixen un engruiximent pseudoestratificat de l'ectoderma anomenat placa de la lent. A continuació, la placa de la lent s'invagina i es separa de l'ectoderma que l'envolta per formar una vesícula de la lent des d'on es diferencien les cèl·lules fibroses característiques de la lent adulta. I a la vegada, la vesícula òptica es doblega cap endins seu i envolta la vesícula de la lent per formar la copa òptica que acabarà comprènent les capes neural i pigmentada de la retina adulta. L'òrgan contactarà amb el cervell a través d'un nervi òptic format pels axons de cèl·lules ganglionars localitzades a la base de la retina.

### 1.2.3 Neurogènesi als Bilateria: Models de neurogènesi dels Protostomia

#### **Ecdysozoa. *Drosophila melanogaster***

*Biologia i estructura de sistema nerviós: Drosophila melanogaster*, també anomenada mosca del vinagre o mosca de la fruita, és una espècie d'artròpode de l'ordre Diptera que s'usa com a model d'estudi en la genètica del desenvolupament des de principis del segle XX. Com la resta d'espècies del seu grup es caracteritza per tenir un cos recobert per una cutícula orgànica i segmentat en tres tagmes principals -el cap, el tòrax i l'abdomen- que, a la vegada, es divideixen en d'altres de més petits. Al tagma del cap s'hi distingeix un aparell bucal i un parell d'ulls compostos, i del tòrax hi creixen tres parells de potes i un parell d'ales locomotrius. Els individus adults són cosmopolites, tenen els sexes separats i es reproduïxen de manera sexuada amb la fecundació interna de la femella. Mostren un desenvolupament postembrionari holometàbol, el que implica que han de metamorfosar en tres fases de larva i una de pupa abans d'arribar a la d'imago o organisme adult. En cadascuna d'aquestes transformacions es produeix la muda de la cutícula i, en el pas final de pupa a imago, es dona una reorganització força notable d'alguns teixits i la formació d'estructures addicionals de l'exoesquelet.

El sistema nerviós de *Drosophila* és molt similar al de la resta d'insectes i està integrat per ganglis de neurones del sistema nerviós central i estomatogàstric, i cèl·lules accessòries de la glia. Al sistema nerviós central, els ganglis de neurones s'agrupen en un cervell anterior o es distribueixen pels segments conformant un cordó nerviós ventral. En canvi, els ganglis del sistema nerviós estomatogàstric estan aïllats i s'uneixen en una xarxa que envolta alguns òrgans (p. e. els músculs, la faringe o l'intestí) i que connecta amb el cervell per fer funcions similars a les del sistema nerviós autònom dels vertebrats. Pel que fa als òrgans sensorials, són gairebé microscòpics i es troben per tota la paret del cos o concentrats en zones molt sensibles com les antenes del segment frontal o les potes. Són molt variats i la majoria estan construïts amb un esquema similar que s'il·lustra amb el dels mecanoreceptors de les quetes: aquests contenen una neurona sensorial bipolar envoltada per quatre cèl·lules accessòries de

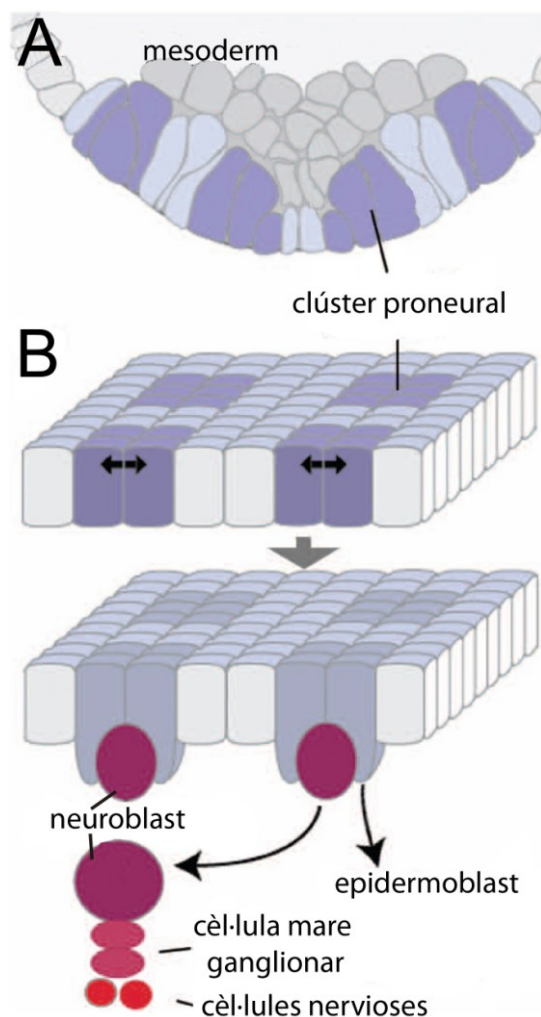
les quals dues són internes i formen una beina al voltant de la dendrita, i l'altre parell adopta una posició concèntrica respecte d'aquelles i forma processos que secreten la cutícula en forma de pèl (Hartenstein i Wodarz, 2013). Destaquen, a més, els ulls que cobreixen una gran superfície del cap i que estan organitzats en 800 unitats fotoreceptores hexagonals anomenades ommatidis. En cada ommatidi hi ha vuit cèl·lules nervioses fotoreceptores -els fotoreceptors R1-R8- acompanyades per cèl·lules de suport i per cèl·lules pigmentàries, i la seva part exterior es cobreix amb una còrnia transparent. Un feix d'axons innerva l'estructura i condueix les senyals cap al cervell per proporcionar un sol element de la imatge que es completa amb les imatges provinents dels altres 799 ommatidis.

Desenvolupament embrionari i neurogènesi: L'embriogènesi es produeix a partir d'un oòcit que ha estat polaritzat amb factors materns abans de la fecundació, i l'embrió es forma des d'un zigot que es sotmet a una segmentació incompleta en que només es divideixen el nucli (Gilbert, 2010). Per tant, l'embrió primerenc conforma un sincici multinucleat que ja està determinat en els principals eixos de coordenades de l'animal. Més endavant, quan finalitza la tretzena divisió, la membrana plasmàtica del sincici es tanca cap endins i cel·lularitza els nuclis, que havien migrat des de la zona central cap a la perifèria creant un blastoderm; amb aquest procés també s'internalitza el territori propi de proteïnes i de citoesquelet de cada nucli del blastoderm. La gastrulació comença poc després i amb un seguit de moviments cel·lulars es segreguen el solc ventral (o mesoderma), dues concentracions d'endoderma als extrems de l'embrió, i l'ectoderma per tota la resta. Posteriorment, es dona la formació dels segments amb els que es divideix el mesoderma i l'ectoderma, i s'inicia l'organogènesi. A més, durant l'embriogènesi tardana algunes de les cèl·lules embrionàries no es diferencien i es segreguen en peces de teixit -els discs imaginals i els histoblasts- amb les quals s'originarà algunes estructures adultes quan hi hagi la metamorfosi (p. e. el sistema traqueal, les glàndules salivaries i gran part del tegument; Brody, 1999). Després de l'eclosió, el pla general del primer estadi de larva és el mateix que el de l'adult.

El neuroectoderma de *Drosophila* s'especifica durant l'estadi de gàstrula i consisteix en un domini gran que es pot reconèixer per característiques estructurals i moleculars pròpies (Hartenstein i Wodarz, 2013). Abasta una regió anterior, la regió procefàlica o del cap, que dona lloc al cervell, i una regió ventral de la qual sorgeixen els cordons nerviosos ventrals. La majoria de cèl·lules nervioses del sistema nerviós central es diferencien a partir de progenitors amb característiques de cèl·lules mare, els neuroblasts, que es determinen en aquell teixit. En concret, els neuroblasts s'originen en grups de 4 a 6 cèl·lules ectodèrmiques anomenats clústers proneurals en que mitjançant interaccions cèl·lula a cèl·lula se n'especifica una d'elles a llinatge neural i la resta a llinatge epidèrmic (Figura 5). Així, al final de la neurogènesi primerenca només un 25% del total del neuroectoderma acaba esdevenint en neuroblasts.

Els neuroblasts es separen d'aquesta capa epitelial amb la delaminació, que es produeix en un ordre temporal estricte i en cinc onades; al final, aquestes cèl·lules s'ordenen en una retícula ortogonal de 3 columnes -medial, intermèdia i lateral- en que hi ha fins a 60 cèl·lules progenitores per segment d'embrió (Egger i altres, 2008). En els primers moments

de la delaminació, quan el neuroblast perd la connexió amb la superfície apical, s'inicia una divisió asimètrica amb el fus mitòtic orientat perpendicular al pla del neuroectoderma que resulta en la generació de dues cèl·lules de mides diferents: una de més petita, que roman activa com a neuroblast a la part apical de la columna, i una de més gran i basal, l'anomenada cèl·lula mare ganglionar, que es divideix un sol cop abans de diferenciar-se (Figura 5B; Goodman i Doe, 1993; Egger i altres, 2008; Hartenstein i Wodarz, 2013). Diversos estudis de llinatges cel·lulars dels neuroblasts han demostrat que amb aquest mecanisme es desenvolupa una progènie que és gairebé invariant i que generalment conté diferents tipus de neurones i de cèl·lules de la glia (Bossing i altres, 1996; Schmid i altres, 1997). També s'ha observat que la progènie té poca capacitat de migració i, per tant, es posicionarà al sistema nerviós en formació d'acord amb el seu ordre de naixement, que habitualment és fix (p. e. les neurones més "primerenques" es trobaran en les capes més profundes dels ganglis), i també d'acord amb el lloc que ocupava el neuroblast a la columna (Kambadur, 1998; Harris, 2001; Egger i altres, 2008).



**Figura 5. Clústers proneurals i especificació dels neuroblasts de *Drosophila*.** **A** Secció transversal esquemàtica del neuroectoderma, indicant el patró de clústers proneurals (en violeta fosc). **B** Generació dels neuroblasts i la seva progènie. El procés es dona en dues etapes: primer s'ha de definir el clúster proneural a la regió del neuroectoderma ventral (en violeta fosc a la imatge superior), i, més tard, s'ha de seleccionar una de les cèl·lules del clúster per a la seva ingressió amb la identitat de neuroblast (en magenta a la imatge inferior); la resta de cèl·lules del clúster esdevenen epidermoblasts, o cèl·lules progenitores de l'epidermis. Un cop internalitzats, els neuroblasts es divideixen asimètricament per produir cèl·lules mare ganglionars (en magenta clar), i aquestes ho fan simètricament per generar dues neurones, o una neurona i una cèl·lula de la glia, o dues cèl·lules de la glia (en vermell; modificat de Hartenstein i Wodarz, 2013). Tots els dibuixos mostren una visió lateral de la regió de l'ectoderma ventral, i a A el futur dorsal és la part superior del dibuix mentre que a B és a la part inferior.

El neuroectoderma, però, no és la única font de cèl·lules progenitores neurals de l'embrió de *Drosophila*. En les etapes més tardanes de la neurogènesi s'adverteix la

generació de cèl·lules nervioses des de l'ectoderma de la línia mitja ventral, el conegut com a mesectoderma, que es col·loca entre els extrems interns de les columnes medials dels neuroblasts (Hartenstein i Wodarz, 2013). Les cèl·lules del mesectoderma destaquen perquè no passen per l'estat de neuroblast ni formen cèl·lules epitelials, i es sotmeten a una sola divisió en el pla horitzontal abans de ser internalitzades com un grup amb la seva invaginació. El mesectoderma exerceix un paper fonamental en el desenvolupament del sistema nerviós central ja que dóna lloc a estructures de la línia mitja que intervenen en la connexió axonal dels segments (Brody, 1999; Lüer i Technau, 2009).

A més, un cop finalitzada l'embriogènesi, es dóna una segona fase de neurogènesi en que es desenvolupen els òrgans sensorials i un gran nombre de cèl·lules del sistema nerviós central des de dues poblacions de progenitors, la dels neuroblasts i la dels progenitors sensorials. Ambdós tipus de cèl·lules es formen durant la neurogènesi embrionària, en concret des d'una petita fracció dels neuroblasts embrionaris -la resta havien estat eliminats per un procés d'apoptosi regulada- (Egger i altres, 2008) o des de cèl·lules de l'ectoderma epidèrmic que s'especifiquen després de la formació dels neuroblasts (Hartenstein i Wodarz, 2013), i s'havien mantingut quiescents fins a l'inici de la metamorfosi. Aquest procés coincideix amb la remodelació del sistema nerviós preexistent que també es dóna durant la metamorfosi de la larva i la pupa, i serveix en la construcció del sistema nerviós de l'adult. (Singh i Singh, 1999; Egger i altres, 2008; Izergina i altres, 2009). En aquesta etapa també comença el desenvolupament dels ulls al disc imaginal d'ull i ala. Així, dins del disc es forma un solc morfogènètic que el travessa de posterior a anterior i s'inicia la diferenciació en forma de columna de les cèl·lules que formaran els ommatidis (Sprecher i Desplan, 2009). La primera cèl·lula diferenciada serà el fotoreceptor R8 i serà l'encarregada d'induir les cèl·lules veïnes a formar la resta de l'ommatidi. Ja en l'estat de pupa, l'estructura final de l'ull adult es refina eliminant per apoptosi les cèl·lules sobrants que hagin quedat entre els ommatidis (Freeman, 1996).

### **Ecdysozoa. *Caenorhabditis elegans***

*Biologia i estructura de sistema nerviós:* *C. elegans* és un nematode no segmentat de vida lliure i mida petita que es distingeix per tenir una cavitat pseudocelomada transparent i per l'eutèlia, és a dir, per la constància cel·lular. És predominantment hermafrodita i es reproduïx amb l'autofecundació o, rarament, amb la fecundació creuada d'un individu mascle i un d'hermafrodita. El seu temps de generació és molt curt, de tan sols 3 dies, i en cada posta allibera un gran nombre d'embrions que, de manera semblant a *Drosophila*, han de passar per quatre estadis larvaris (o larva L1-L4) abans d'arribar a la maduresa. El final de cada un dels estadis de larva està marcat per un breu període de letargia i per la muda de la cutícula.

El sistema nerviós és, sense cap mena de dubte, el teixit més complex de l'animal, tant en termes de nombre de cèl·lules -302 neurones i 56 cèl·lules de suport d'un total de 959 en un individu hermafrodita- com de diversitat -118 classes de neurones (Hobert, 2010). Presenta l'avantatge de que el llinatge i la morfologia de cada tipus neuronal s'ha descrit al detall i existeixen marcadors moleculars en forma de gens reporters fluorescents per cada un

d'ells (Maduro, 2010). També se n'ha caracteritzat a fons el "connectoma", és a dir, el mapa de totes les connexions sinàptiques que s'hi estableixen (White i altres, 1986; Emmons, 2015). Tots aquests trets fan de *C. elegans* un model de primer nivell per analitzar la naturalesa dels programes reguladors encarregats de la construcció del sistema nerviós.

A l'adult, les cèl·lules nervioses s'agrupen en ganglis que es concentren al cap i a la cua o que es distribueixen al llarg d'un cordó nerviós ventral; també desenvolupen un cordó nerviós dorsal més simple integrat només per axons, i neurones motores a les comissures que uneixen els dos cordons. A la vegada, els ganglis del cap s'organitzen en un cervell en forma d'anell al voltant de la faringe que està connectat per un costat a una corona de nervis motors i òrgans sensorials que s'estén cap endavant, i per l'altra amb els cordons nerviosos. Les 56 cèl·lules de suport s'associen únicament amb els elements del sistema nerviós que fan funcions somàtiques (p. e. els cordons nerviosos o part de l'anell cefàlic). Els òrgans sensorials poden captar un rang ampli de sensacions (p. e. senyals químiques, lluminoses, de temperatura o de pressió, etc.) i estan compostos per neurones sensorials aïllades o per una cèl·lula nerviosa ciliada que s'acompanya de dues cèl·lules de la glia. El sistema nerviós de les larves L1 i L2 té una estructura semblant però sense algunes poblacions neuronals (p. e. algunes categories de neurones motores) i amb un patró de connexions lleugerament alterat respecte del de l'adult.

*Desenvolupament embrionari i neurogènesi:* L'embriogènesi dels nematodes és molt diferent de l'observada en altres organismes model establerts, com *D. melanogaster* o els vertebrats. En general, podem definir-la com a autònoma -la identitat dels blastòmers depèn principalment de la localització asimètrica de determinants materns- i en mosaic -no es compensa la possible pèrdua de cèl·lules-, tot i que també requereix d'esdeveniments d'inducció cel·lular per especificar llinatges concrets a l'embrió primerenc. Es completa en tan sols 14 hores i es divideix en dues grans etapes, l'etapa de proliferació, i l'etapa d'organogènesi i morfogènesi. En la primera es generen a partir del zigot sis cèl·lules embrionàries fundadores i, posteriorment, unes 550 cèl·lules progenitores indiferenciades. Aquesta etapa també es caracteritza per una reordenació considerable de les cèl·lules a causa de la gastrulació i, sobre tot, de processos de migració extensius. Per contra, en l'etapa d'organogènesi es diferencien les cèl·lules dels teixits sense moltes divisions cel·lulars addicionals i s'adopta el pla corporal de la larva L1, que ja és molt semblant al del juvenil (Maduro, 2010). Abans de l'eclosió, l'embrió es capaç de moure's de manera coordinada i ha desenvolupat els òrgans sexuals i una faringe funcional.

A *C. elegans* trobem una primera fase de neurogènesi embrionària en que es dona la producció de neuroblasts (o cèl·lules progenitores neurals) durant l'etapa de proliferació, però el sistema nerviós acaba de desenvolupar-se del tot durant les dues primeres fases de larva gràcies a l'activitat d'altres progenitors que s'havien mantingut indiferenciats. Tots aquests neuroblasts provenen de la descendència d'algunes cèl·lules fundadores que s'havia internalitzat amb l'epibòlia de l'ectoderma dorsal en el moment de formació de l'epidermis. Addicionalment, algunes cèl·lules del mesoderma també donen lloc a cèl·lules de suport, la glia GLR (Shaham, 2015). A l'embrió, els neuroblasts es localitzen a la regió ventral i allà es

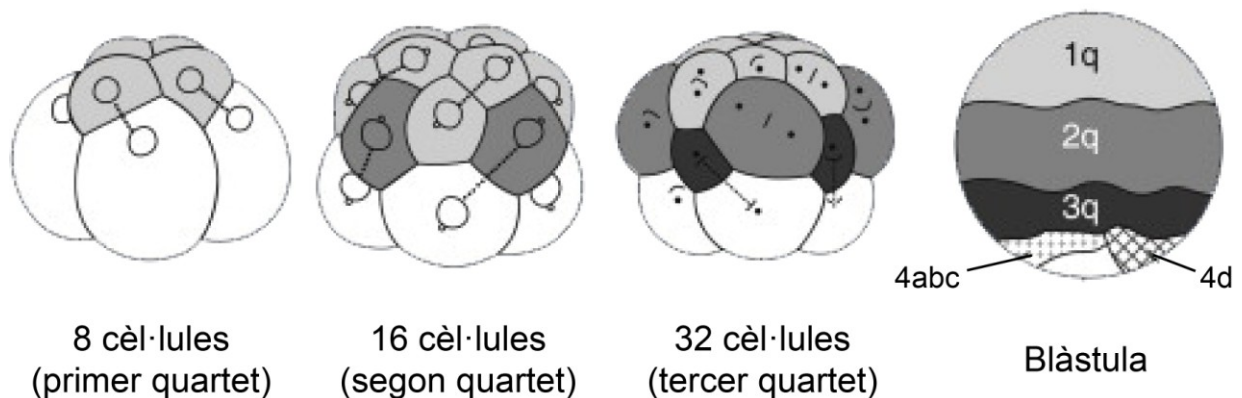
sotmeten a unes poques divisions asimètriques en que es reparteixen determinants moleculars que en controlen la seva diferenciació (Sulston i altres, 1983; Wadsworth i Hedgecock, 1992). Així, com amb d'altres teixits de *Caenorhabditis*, generen amb un patró de llinatges pràcticament invariant la diversitat cel·lular del futur sistema nerviós. En concret, al final de l'embriogènesi neuroblasts provinents de la cèl·lula fundadora AB diferencien en cèl·lules de la glia, mentre que les neurones s'originen en cèl·lules filles d'aquella fundadora i també de les cèl·lules MS i C (Altun i Hall, 2011). En alguns casos, però, la decisió d'esdevenir neurona o un altre tipus de cèl·lula es produeix relativament tard en els llinatges. Per exemple, alguns músculs es formen en llinatges que són principalment generadors de neurones el que indica que o bé les cèl·lules precursors no es comprometen amb una destinació específica fins a la última divisió del precursor, o bé que el procés d'especificació pot ser reversible (Sawa, 2010). Una altra particularitat de la neurogènesi d'aquests animals és que hi ha cèl·lules que es poden sotmetre a un procés de transdiferenciació postmitòtica des d'un tipus no neuronal cap a un que sí que ho és (Jarriault i altres, 2008). Per últim, indicar que abans que finalitzi el desenvolupament un percentatge considerable de la descendència de la cèl·lula fundador AB mor degut a un procés d'apoptosi. Aquests esdeveniment té lloc sobre tot durant els primers moments de la fase d'organogènesi i és utilitzat per suprimir cèl·lules que s'havien produït durant l'etapa de proliferació i que finalment no seran necessàries per la construcció del sistema nerviós (Yeo i Gautier, 2004).

## **Spiralia**

El clade dels Spiralia inclou 14 dels aproximadament 36 fílums de metazous, entre els quals hi ha grups com els anèlids, mol·luscs, nemertins i platihelminths. És, per tant, un grup molt divers tant a nivell morfològic com ecològic i del desenvolupament, i presenta tots els graus d'organització dels animals (Brusca i Brusca, 2003). Tot i ser un grup potencialment interessant per explicar quins són els mecanismes subjacents a la gènesi de la seva diversitat ha rebut relativament poca atenció, especialment en les àrees de genètica, així com la biologia cel·lular i del desenvolupament. Això es degut en part al predomini dels models experimentals clau dels Ecdysozoa i Deuterostomia que acabem de tractar en la secció anterior.

El caràcter ancestral que defineix a la majoria dels Spiralia és un patró de segmentació del zigot anomenat espiral que és altament estereotípic i amb el qual es dona l'adquisició conservada d'un seguit de llinatges a l'embrió primerenc (Figura 6; Giribert i altres, 2000; Hejnal i altres, 2009). Aquest patró es fonamenta en conjunts alterns de divisions cel·lulars obliqües en quatre cèl·lules grans, els macròmers, que generen quartets escalonats de cèl·lules filles més petites, els micròmers, cap al pol animal. En total s'acostumen a formar quatre quartets i, llavors, la segmentació s'interromp amb l'ocurrència de divisions bilaterals en les cèl·lules del quadrant del futur pol dorsal (Lambert, 2010; Henry, 2014). La nomenclatura que segueixen les cèl·lules de l'embrió durant les successives divisions va ser estandarditzada i ve codificada amb un xifra, que indica el número de divisió i/o del quartet, i una lletra, que fa referència als macròmers i la seva descendència. Per exemple, la primera

divisió dóna lloc als macròmers AB i CD, la segona als quatre macròmers A, B, C i D, i amb la tercera divisió s'origina el quartet de micròmers 1a-d on la cèl·lula 1a correspon a la descendent del macròmer A. El destí de cada un d'aquests macròmers i micròmers es defineix en els estadis posteriors i sembla ser homòleg entre diferents grups d'animals espirals (Lambert, 2010; Henry, 2014). Així, generalment els teixits d'origen ectodèrmic anterior com el cervell o els ulls provenen del primer quartet de micròmers, mentre que l'ectoderma de la boca i de la regió posterior provenen del segon i tercer quartets. Combinacions específiques de cèl·lules derivades d'aquests quartets també generen part dels teixits mesodèrmics, l'anomenat ectomesoderma. Finalment, les cèl·lules del quart quartet típicament produeixen teixits endodèrmics del sistema digestiu, i la cèl·lula del mesentoblast (o cèl·lula 4d) també serveix com a progenitora del mesoderma (o endomesoderma); en molts casos aquesta cèl·lula també contribueix a la formació de l'intestí posterior.



**Figura 6. Segmentació espiral.** Representació dels estadis de 8, 16 i 32 cèl·lules i de la blàstula d'un embrió prototípic espiral. S'hi indica amb una escala de grisos els macròmers i els diferents quartets de micròmers, així com la distribució de la seva progènie a la blàstula. Als estadis de 8 i 16 cèl·lules també s'hi marca el sentit de les divisions de les cèl·lules embrionàries que és altern en cada cicle mitòtic amb patró espiral (modificat de Lambert, 2010). Tots els dibuixos mostren una visió lateral de l'embrió on el pol animal és a la part superior del dibuix i el vegetal a la inferior; el pol animal de la blàstula es correspon amb el futur anterior, i el pol vegetal amb el futur ventral-posterior.

Els estudis sobre la neurogènesi embrionària dels Spiralia han tendit a centrar-se en espècies dels grups dels anèlids, mol·luscs i braquiòpodes, en concret en els poliquets *Platynereis dumerilii* i *Capitella teleta*, en alguns gasteròpodes i cefalòpodes i, més recentment, en el braquiòpode *Terebratalia transversa*. Totes aquestes espècies menys *T. transversa* segueixen el patró espiral canònic i desenvolupen l'adult passant per una etapa de larva trocòfora; els mol·luscs, a més, metamorfosen en un segon estadi de larva, la larva velígera, després de la trocòfora (Hickman Jr. i altres, 2006). La larva trocòfora no és exclusiva d'aquests grups i també apareix en la majoria d'espirals amb desenvolupament indirecte, i es caracteritza per diferenciar dues bandes ciliades a la regió equatorial -la prototroca- i posterior -la telotroca-, i algunes estructures nervioses anteriors com un òrgan i un serrell apicals, i un parell d'ulls que participen en el desplaçament i l'assentament al



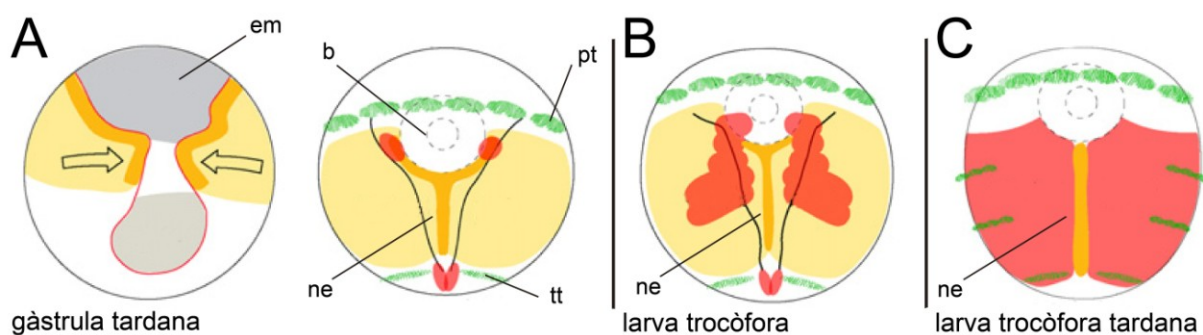
substrat. Els braquiòpodes, en canvi, presenten una segmentació radial al final de la qual emergeix una larva que també desenvolupa un òrgan i serrell apicals (Santagata i altres, 2012), però amb una organització, a *T. transversa*, en tres lòbuls -un d'apical (o anterior), un al mantell (la regió medial) i el del pedicle (o posterior)- que és diferent a la trocòfora. En quant al sistema nerviós adult, en tots aquests animals està constituït per ganglis que adopten una organització més o menys semblant a la d'un sistema nerviós central amb un cervell anterior-dorsal i un (o més d'un) cordó nerviós ventral. Tots ells també desenvolupen ulls cerebrals a la superfície dorsal del cap i nervis sensorials epitelials o subepitelials, i, a més, alguns braquiòpodes i els mol·luscs diferencien estatocists amb qui detecten canvis en la posició de l'organisme. El cordó nerviós ventral és probablement el caràcter més variable, i en els anèlids adopta un patró ortogonal i està segmentada, mentre que en els mol·luscs està integrada per més d'un parell de connectius i en els braquiòpodes semblar ser absent (Schimdt-Rhaesa; 2007).

### **Neurogènesi als Annelida: *Platynereis dumerilii* i *Capitella teleta***

La neurogènesi de *P. dumerilii* s'inicia al final de la gastrulació i es dona en un neuroepiteli que està regionalitzat en una porció anterior i apical que produeix gran part del cervell, i una porció més posterior i ventral que també genera algunes cèl·lules del cervell i el cordó nerviós ventral (Denes i altres, 2007; Steinmetz i altres, 2010). Aquests dominis es corresponen en part amb la descendència dels micròmers del primer quartet i del micròmer 2d (Ackerman i altres, 2005). A *Platynereis* s'hi ha caracteritzat amb especial atenció la dinàmica cel·lular i d'organització del neuroectoderma del tronc entre els estadis de gàstrula i de larva trocòfora (Denes i altres, 2007; Simionato i altres, 2008; Kerner i altres, 2009; Demilly i altres, 2013). Aquest procés es podria resumir en 3 punts: establiment del neuroectoderma, organització primordial, i expansió del neuroectoderma. Així, l'establiment del neuroectoderma s'identifica amb els moments finals de la gastrulació, en que es dona la fusió a la futura línia mitja ventral dels marges en proliferació de l'ectoderma. Aquesta fusió sempre té lloc en un sentit de posterior a anterior i en un patró en cremallera, i dota momentàniament d'una forma de "Y" al neuroectoderma (Figura 7A). L'etapa d'organització primordial la trobem un cop finalitzada la gastrulació, quan els putatius progenitors neurals proliferen amb un patró homogeni i es concentren a ventral amb només una o dues capes de profunditat (Figura 7B). Finalment, l'expansió del neuroectoderma es correspon amb l'engruiximent per la incorporació progressiva de cèl·lules que han sortit del cicle cel·lular (o neurones en diferenciació) en regions basals i laterals a l'estadi de larva (Figura 7C). A més, a partir d'aquesta etapa els progenitors mitòtics es restringeixen principalment a una zona que envolta la línia mitja ventral i en alguns dominis laterals. En aquest estadi també s'aprecia la regionalització del neuroectoderma en l'eix medio-lateral, fet que s'associa amb el desenvolupament de cèl·lules nervioses des de la part més medial i de cèl·lules sensorials del sistema nerviós perifèric des dels extrems laterals.

La larva trocòfora de *Platynereis* també s'ha usat per Arendt i col·laboradors com a model per estudiar el desenvolupament dels ulls larvaris i de l'adult (Arendt i altres, 2002). En

primer lloc, aquells autors descriuen la diferent organització, composició cel·lular i diferenciació dels dos òrgans: de tipus invers, formats per una sola cèl·lula fotoreceptora i pigmentària, i exclusius de la larva trocòfora en el cas dels ulls larvaris; per contra, eversos, que incorporen com a mínim dues cèl·lules de cada tipus i també cèl·lules accessòries, i aparició a partir de l'inici de la segmentació pels ulls de l'adult. També conclouen que, d'acord amb la seva naturalesa, els ulls larvaris innerven amb centre nerviosos típics de l'estadi de larva trocòfora (p. e. amb la banda ciliar de la prototroca), i que els ulls adults ja connecten amb elements del sistema nerviós definitiu (p. e. la comissura dorsal del cervell). Malgrat totes aquestes diferències, observen que l'origen de les dues estructures sembla ser compartit, en unes masses de cèl·lules laterals anomenades el primordi òptic que són properes al cervell, i que fins i tot les cèl·lules fotoreceptores podrien emergir del mateix tipus de progenitors.

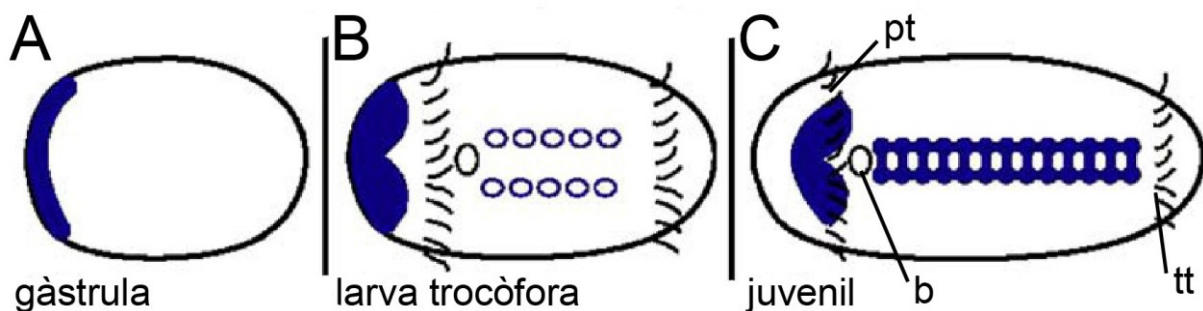


**Figura 7. Establiment del neuroectoderma del tronc de *Platynereis dumerilii*.** S'hi mostren els estadis més representatius del procés (modificat de Denes i altres, 2007). **A** Finalització de l'epibòlia de la gastrulació (les fletxes indiquen el moviment de l'ectoderma) i constitució de l'ectoderma neurogènic a la zona de la línia mitja ventral (en groc fosc), just a posterior del futur lloc de formació de la boca. **B** El neuroectoderma en proliferació, que ocupa una part important de la superfície ventral, es comença a estratificar en el sentit apical-basal i s'inicia la diferenciació de cèl·lules nervioses (en vermell). **C** Les cèl·lules progenitores mitòtiques es limiten al voltant de la línia mitja ventral i les poblacions de precursors i cèl·lules nervioses s'expandeixen per tot el tronc (en vermell). Altres colors: groc, ectoderma; verd, bandes ciliars. Tots els dibuixos mostren una visió ventral on el futur anterior és a la part superior del dibuix. b, boca; em, estomodeu; ne, neuroectoderma; pt, prototroca; tt, teletroca.

*Capitella teleta* té força punts en comú amb *Platynereis*, tant en el mode de desenvolupament com amb els llinatges cel·lulars del sistema nerviós (Werbrock i altres, 2001; Meyer i altres, 2010). La principal diferència és que el seu estadi de trocòfora no diferencia l'òrgan apical (Werbrock i altres, 2001; Meyer i altres, 2010; Meyer i altres, 2015). A més, durant la metamorfosi la larva perd poques cèl·lules i sofreix poques reorganitzacions internes i, per tant, els seus teixits es corresponen en gran mesura amb els definitius (Meyer i altres, 2010; Meyer i altres, 2015). Per exemple, el cervell i el cordó ventral de l'etapa més tardana són molt similars en aparença amb els del juvenil d'una setmana d'edat (Meyer i altres, 2015). Com a *Platynereis*, aquests òrgans nerviosos desenvolupen des dels micròmers del primer quartet i des del micròmer 2d (Meyer i altres, 2010; Meyer i Seaver, 2010). Altres fonts de neurones són el micròmer 3a del tercer quartet que origina un parell de neurones en associació amb la boca (Meyer i altres, 2010), i el micròmer 1a que dona lloc a l'ull de la

banda dreta de la larva, i el micròmer 1c que forma el de la banda esquerra (Meyer i altres, 2010; Yamaguchi i Seaver, 2013).

A *Capitella* ha estat descrita la neurogènesi del cervell (Meyer i Seaver, 2009; Meyer i altres, 2015) i dels ulls (Yamaguchi i Seaver, 2013), i, a més, l'organogènesi del sistema nerviós central i d'alguns nervis perifèrics (Meyer i altres, 2015). La neurogènesi del cervell procedeix amb la formació d'un epitel·li estratificat a l'ectoderma anterior i la delaminació de cèl·lules aïllades que contribueixen entre l'estadi de gàstrula i, com a mínim, fins a l'estadi de larva a l'elaboració de l'òrgan. Aquesta contribució, però, és menor com més avançat està el desenvolupament de l'embrió. Meyer i Seaver (2009) determinen que l'epitel·li neurogènic es limita externament amb una capa de cèl·lules progenitores en divisió, tot i que també s'observa alguna mitosi en cèl·lules de dins del cervell, i que a la capa més basal s'hi localitzen les cèl·lules en diferenciació. Basant-se amb dades moleculars suggereixen que l'adquisició de la identitat de cada subpoblació neuronal tindria lloc a l'ectoderma després de la internalització dels progenitors. A l'estadi de gàstrula tardana, l'estratificació de l'epitel·li produeixen un engruiximent en dos lòbuls que són els primordis del cervell (Figura 8A; Meyer i altres, 2015). Poc després es formen les bandes ciliars de la larva i s'inicia la diferenciació de les neurones. A la larva lecitotròfica la tendència general és la progressió des del centre cap a la perifèria i d'anterior cap a posterior dels òrgans nerviosos: les primeres neurones del cervell projecten axons al llarg de les vores de l'ectoderma neurogènic ventral i, amb el temps, augmenta el nombre de connectius i de ganglis del futur cordó nerviós (Figura 8B). També es desenvolupen nervis perifèrics en alguns segments. En comparació, el cervell del juvenil és força més complex i els connectius de la regió ventral s'han concentrat en un cordó ventral de patró ortogonal a la línia mitja (Figura 8C).



**Figura 8. Organogènesi del sistema nerviós de *Capitella teleta*.** S'hi indiquen els tres principals estadis del procés (estructures nervioses en blau fosc; modificat de Dill i altres, 2007). **A, B** La neurogènesi del cervell s'inicia en l'ectoderma de la regió anterior, i la del cordó nerviós a l'ectoderma ventral del tronc (Meyer i Seaver, 2009; Meyer i Seaver, 2010). L'organogènesi del sistema nerviós central segueix un patró estricte d'anterior a posterior, de manera que entre els estadis de gàstrula i larva trocòfora els ganglis del cordó nerviós apareixen primer a les regions més anteriors; el cordó nerviós sempre es limita per les dues bandes ciliars de la larva. **C** Estructura del sistema nerviós del juvenil. Tots els dibuixos mostren una visió ventral on l'anterior és a l'esquerra del dibuix. b, boca; pt, prototroca; tt, teletroca.

Per una altra banda, la investigació sobre l'organogènesi dels ulls de la larva i de l'adult va permet a Yamaguchi i Seaver (2013) resoldre que: els dos tipus d'ull no tenen la

mateixa morfologia -amb una cèl·lula pigmentària, fotoreceptora i de suport als larvaris, i amb 2-3 pigmentàries i una fotoreceptora als adults-; que no són coetanis en el temps; i que només les cèl·lules pigmentàries provenen dels mateixos micròmers embrionaris. A més, amb experiments d'ablació amb làser demostren que els ulls larvaris són necessaris per la fototaxi positiva de la trocòfora però no pel seu assentament al substrat.

### **Neurogènesi als Mollusca**

Per bé que en els darrers anys s'ha començat a estudiar l'estructura i el desenvolupament del sistema nerviós d'un grapat d'espècies dels grups Gasteropoda i Cephalopoda (Tessmar-Raible i Arendt, 2003; Henry, 2014), nosaltres només tractarem els resultats obtinguts per les espècies de gasteròpode *Patella vulgata* i *Aplysia californica*, ja que són els que estan més focalitzats en les descripcions de les primeres etapes de la neurogènesi. A més, els treballs que s'han publicat amb aquests dos organismes són fins a cert punt complementaris i permeten exemplificar d'una manera bastant entenedora el possible mode de desenvolupament nerviós dels mol·luscs.

Jacob (1984) analitza el patró de neurogènesi del sistema nerviós central entre els estadis de gàstrula i juvenil d'*A. californica* amb la tècnica d'autoradiografia de timidina fluorescent. Sorprenentment, observa que aquest patró s'assembla més al que s'esdevé durant la neurogènesi dels vertebrats que en la d'altres espècies de protòstoms, com els nematodes o els insectes. Així, durant o poc després de la gastrulació *Aplysia* especifica un ectoderma neurogènic de morfologia columnar en parts de la paret del cos adjacents a cèl·lules del mesoderma. També troba que les cèl·lules d'aquest ectoderma fan mitosis freqüentment i, amb el temps, poden engruixar en zones proliferatives pseudoestratificades anomenades placodes ectodèrmics. En un moment donat, els precursors de les cèl·lules nervioses que provenen tant de les cèl·lules columnars com dels placodes abandonen sols o en petits clústers l'epiteli per migrar cap al seu lloc de diferenciació. Els resultats d'aquest autor també suggereixen que aquesta població de precursors es pot dividir en els de tipus neuronal que es divideixen abans d'integrar-se als ganglis, i en els de les cèl·lules de la glia que possiblement continuïn dividint-se dintre dels ganglis durant algun temps. El creixement del sistema nerviós, però, sempre es dona en un sentit rostro-caudal i, en el cas dels ganglis, des del centre cap a la perifèria.

La neurogènesi a *Patella* s'ha analitzat amb l'expressió de gens neurals durant l'embriogènesi primerenca i a l'estadi de larva trocòfora. Aquest tipus d'aproximació ha permès hipotetitzar que la neurogènesi es produiria en un putatiu neuroectoderma que ja estaria especificat en les primeres divisions del zigot, en concret en les cèl·lules descendents del primer i segon quartet de micròmers (LeGouar i altres, 2004). Durant la gastrulació, aquestes cèl·lules es veurien regionalitzades en un domini anterior i dorsal, que coincidiria amb el futur neurectoderma del cap, i en un domini ventral que es localitzaria per darrere de la prototroca i que esdevindria el neuroectoderma del tronc. En aquest domini ventral, les cèl·lules progenitores s'absentarien de la regió de la línia mitja, que podria tenir funcions d'organitzador. L'especificació de cèl·lules nervioses i dels ulls tindria lloc en la transició entre

gàstrula i larva trocòfora (Lespinet i altres, 2002; Naderbragt i altres, 2002a; Naderbragt i altres, 2002b).

### **Neurogènesi als Brachiopoda: *Terebratalia transversa***

Els estudis sobre la neurogènesi a *T. transversa* es redueixen a la caracterització morfològica i molecular dels ulls de la larva. Passamaneck i col·laboradors (2011) descriuen l'anatomia de les taques oculars de la regió dorsal-anterior del lòbul apical de la larva, que està integrada per pigment i per dues cèl·lules fotoreceptores, una de les quals conté una estructura apical intracel·lular semblant a una lent i l'altra més grànuls de pigment. També validen la presència de característiques de fotoreceptors ciliats en les cèl·lules sensorials. Finalment, suggereixen l'origen dels ulls en una població de cèl·lules ectodèrmiques del pol animal -i oposat al blastòpor- de l'estadi de gàstrula, on hi hauria el presumptiu neuroectoderma. Aquesta dada sobre l'epiteli neurogènic també es veuria recolzada per un treball posterior on s'analitza el desenvolupament de l'òrgan apical amb una bateria de marcadors específics del sistema nerviós (Santagata i altres 2012).

#### **1.2.4 Un programa comú de neurogènesi als bilaterals?**

La comparació de les arquitectures neuronals i dels mecanismes del desenvolupament entre els clades animals que hem exposat en la secció anterior (resumit a la Taula 1) ha conduït a diversos autors a suggerir que l'ancestre comú dels animals bilaterals ha d'haver posseït una "caixa d'eines" ben establerta de la neurogènesi primerenca (Yeo i Gautier, 2004; Hirth i Reichert, 2007; Arendt i altres, 2008; Hartland, 2011; Hartenstein i Stollewerk, 2015).

Així doncs, sembla evident que la majoria d'animals amb un SNC tenen com a plesiomorfia un domini ectodèrmic especialitzat designat com a neuroectoderma. Aquest neuroectoderma es troba dividit en una fracció anterior des d'on desenvoluparà el cervell i els òrgans sensorials associats (p. e. els ulls), i en una porció del tronc que formarà els cordons nerviosos i que es localitza a ventral a la majoria dels protòstoms i a dorsal als cordats a causa de la inversió de l'eix dorsoventral (Arendt i altres, 2008). Els animals amb un sistema nerviós difús, en canvi, diferencien les cèl·lules nervioses des d'un epiteli amb un potencial neurogènic generalitzat. L'origen ectodèrmic de les cèl·lules nervioses probablement va quedar fixat en algun moment de la transició entre la diplo- i triploblastia, ja que els Cndiaria també presenten un endoderma amb aquestes propietats (Nakanishi i altres, 2012).

Però la neurogènesi dels organismes que formen un SNC no sembla limitar-se al neuroectoderma i altres teixits ectodèrmics o el mesoderma embrionari també són responsables de produir cèl·lules nervioses. En concret algunes poblacions de cèl·lules de la glia es deriven des de la cresta neural a vertebrats (Gilbert, 2010), i des del mesectoderma a *Drosophila* (Lüer i Techanu, 2009), o des de descendents mesodèrmics de cèl·lules fundadores a *C. elegans* (Shaham, 2015). En aquests animals també hi ha una certa variabilitat en quant a l'ontogènia del SNP, i les cèl·lules sensorials o bé desenvolupen directament des d'aquell ectoderma neurogènic (p. e. des dels dominis més laterals a

*Platynereis*; Demilly i altres, 2013), o bé des de progenitors neurals que tenen una identitat diferent al neuroectoderma i que, en ocasions, s'especifiquen més tard durant l'embriogènesi (p. e. teixits com la cresta neural de vertebrats o les cèl·lules SOP de l'epiteli embrionari de *Drosophila*; Gilbert, 2010; Hartenstein i Wodarz, 2013). Alguns òrgans com els ulls, a més, poden requerir de l'aportació de cèl·lules des de teixits que no són epitelials (Gilbert, 2010; Zagowski i altres, 2014).

	DEUTERÒSTOMS			PROTÒSTOMS			
	Cnidaria <i>N. vectensis</i>	Hemichordata <i>S. kowalevskii</i>	Vertebrata	ECDYSOZOA		SPIRALIA	
			Nematoda <i>C. elegans</i>	Arthropoda <i>D. melanogaster</i>	Annelida	Mollusca Gasteropoda	
Sistema Nerviós	Difús (endo. i ectod.) + Anells nerviosos	Difús + SNC dorsal rudimentari	SNC dorsal	SNC ventral	SNC ventral	SNC ventral	SNC ventral
Ulls	-	-	Ull en càmera i inversos	-	Compostos amb ommatidis i eversos	Copa pigmentària inversa o eversa	Copa pigmentària amb lent i eversa
Fotoreceptor	-	-	Ciliar	-	Rabdomèric	Rabdom. o ciliar	Rabdom. o ciliar
Desenv. embrionari	Indirecte (larva plànula)	Directe	Directe o indirecte	Indirecte	Indirecte	Indirecte (larva trocòfora)	Indirecte (larva trocòfora i veligera)
Segmentació zigot	Irregular	Holoblàstic radial	Diversos (holoblàstic o meroblàstic)	Holoblàstic rotacional	Meroblàstic superficial	Holoblàstic espiral	Holoblàstic espiral
Potencial neurogènic	Ectod. neurog. generalitzat + Endoderm	Ectod. neurog. generalitzat + Presumptiu neuroect. dorsal	Neuroectod. dorsal	Neuroectod. ventral	Neuroectod. ventral	Neuroectod. ventral	Neuroectod. ventral
Especificació ectoderm neurogènic	¿?	Factors materns	Inducció des del mesoderm	Derivats dels fundadors AB, MS, C + Factors materns i inducció des de blastòmers	Factors materns	Derivats del 1er quartet, i del micròmer 2d + Inducció des del somatoblast (2d) <sup>1</sup>	Derivats del 1er i 2on quartet + Inducció des del mesoderm (¿?) <sup>2</sup>
Internalitz. progenitors	Delaminació o permaneixen a l'epiteli	Invaginació (tub dorsal)	Invaginació (tub dorsal) + Delaminació (prog. neurals)	Epibòlia (ectod. dorsal)	Delaminació (neuroblasts)	Delaminació (¿?) <sup>3</sup>	Delaminació i ingressió
Inici diferenciació	Dins epiteli + Precursors separats de l'epit. neurogènic	Dins epiteli	Precursors separats de l'epit. neurogènic	Precursors internalitzats	Precursors separats de l'epit. neurogènic	Precursors separats de l'epit. neurogènic	Precursors separats de l'epit. neurogènic

**Taula 1. Resum neurogènesi a metazous.** Les dades de les fileres "Sistema Nerviós" i "Ulls" es refereixen només als òrgans adults. (veure el text per les referències de cada cas, o també Gilbert, 2010; Hickman Jr. i altres, 2006; o bé 1: Amiel i altres, 2013; 2: Jacob, 1984; 3: Meyer i Seaver, 2009).

Una altra tendència destacable és que els dos grups de bilaterals sovint manifesten maneres diferents d'internalitzar i especificar les cèl·lules del futur SNC. Així, als protòstoms els progenitors es desprenen del neuroectoderma amb mecanismes de delaminació o d'ingressió (Hartenstein i Wodarz, 2013; Meyer i Seaver, 2009), mentre que als vertebrats deuteròstoms el neuroectoderma es plega cap endins amb la invaginació i, posteriorment, els progenitors basals delimiten del teixit (Götz i Huttner, 2005; Harrington i altres, 2009).

L'especificació d'aquella regió és un procés resultat de la combinació dels llinatges esterotipats de l'embrió i dels determinants materns que es reparteixen entre les cèl·lules als Ecdysozoa (Hobert, 2010; Hartenstein i Wodarz, 2013). La influència dels determinants materns també sembla ser decisiva per la formació de l'ectoderma neurogènic de l'hemicordat *S. kowalevskii* (Cunningham i Casey, 2014), però, per contra, el desenvolupament del neuroectoderma dels vertebrats depèn en gran mesura de la inducció des de centres organitzadors d'origen mesodèrmic (Stern, 2006; Gilbert, 2010). Alguns autors suggereixen que els dos mecanismes d'internalització -delaminació/ingressió o invaginació- serien una altra plesiomorfia, en aquest cas de l'ancestre més immediatament anterior dels Bilateria; aquest fet es recolzaria en la coexistència d'aquells mecanismes en més d'un dels clades existents que han estat investigats (Hartenstein i Stollewerk, 2015). Segons aquesta hipòtesi el mètode d'internalització basat en la invaginació hauria estat una innovació que permetria augmentar el nombre de cèl·lules nervioses i, per tant, la construcció de sistemes nerviosos més complexos. En aquell organisme també s'hi podria presentar una barreja de mecanismes d'inducció i determinatius per a l'especificació dels progenitors neuronals, ja que, entre d'altres, membres dels Spiralia mostren ambdós tipus de processos durant la neurogènesi primerenca (Jacob, 1984; Amiel i altres, 2013).

Hartenstein i Stollewerk (2015) també prediuen que ancestralment la diferenciació de les neurones sensorials es produiria dins de l'epiteli neurogènic, mentre que les cèl·lules del sistema nerviós ho farien a partir de progenitors separats de l'ectoderma. En qualsevol cas, avui en dia s'observa que només els organismes amb un sistema nerviós difús procedeixen amb un mode similar (Galliot i Quiquand, 2011; Nakanishi i altres, 2012; Cunningham i Casey, 2014), i que, en canvi, els progenitors neurals dels organismes amb un SNC inicien la destinació cap a cèl·lula nerviosa un cop han estat separats de l'epiteli (p. e. Simionato i altres, 2008; Meyer i Seaver, 2009; Hartenstein i Wodarz, 2013). La barreja de mecanismes de divisió simètrica i asimètrica en aquells progenitors, i el desenvolupament de subpoblacions de progenitors i precursors dedicats a llinatges específics també sembla haver estat clau en l'evolució de sistemes nerviosos elaborats (Hartenstein i Stollewerk, 2015). Finalment, Yeo i Gautier (2004) suggereixen que la mort cel·lular programada, un fenomen descrit en el desenvolupament primerenc d'un rang ampli de bilaterals, també formaria part d'aquella "caixa d'eines" de la neurogènesi (Yeo i Gautier, 2004).

### **1.3 Mecanismes moleculars de control de la neurogènesi.**

En paral·lel a les descripcions que acabem de revisar en la secció anterior, estudis moleculars en alguns d'aquells organismes model han demostrat que molts dels factors genètics que especifiquen el neuroectoderma i que posteriorment guien les cèl·lules d'aquell teixit a través de la fase proliferativa i cap a la diferenciació semblen estar altament conservats en tot el regne animal, incloent-hi els cnidaris (Taula 2). Com ja s'ha dit, aquests gens poden actuar amb propietats intrínseques o extrínseques, i només la combinació de diversos d'ells permet fabricar la enorme variabilitat de cèl·lules del sistema nerviós.



En general, els primers esdeveniments de la neurogènesi es relacionen amb l'acció dels gens *soxB*, que habitualment es detecten en l'ectoderma de l'embrió primerenc on hi especifiquen les poblacions de cèl·lules progenitores neuronals. Els factors de transcripció *soxB* acostumen a activar-se per primer cop al voltant de l'etapa de la gastrulació, que és quan a la majoria d'animals s'estableix el neuroectoderma, i proporcionen potencial neurogènic però al mateix temps inhibeixen la diferenciació neuronal i, alhora, mantenen el neuroectoderma en un estat proliferatiu (Guth i Wegner, 2008; Sarkar i Hochedlinger, 2013). Recentment se n'ha identificat dues subfamílies a vertebrats, la dels *soxB1* i la dels *soxB2*, que tenen funcions oposades: la dels *soxB1* s'adiu amb aquells rols de promoure la formació del neuroectoderma, mentre que la dels *soxB2* desencadena la diferenciació als progenitors nerviosos (Guth i Wegner, 2008).

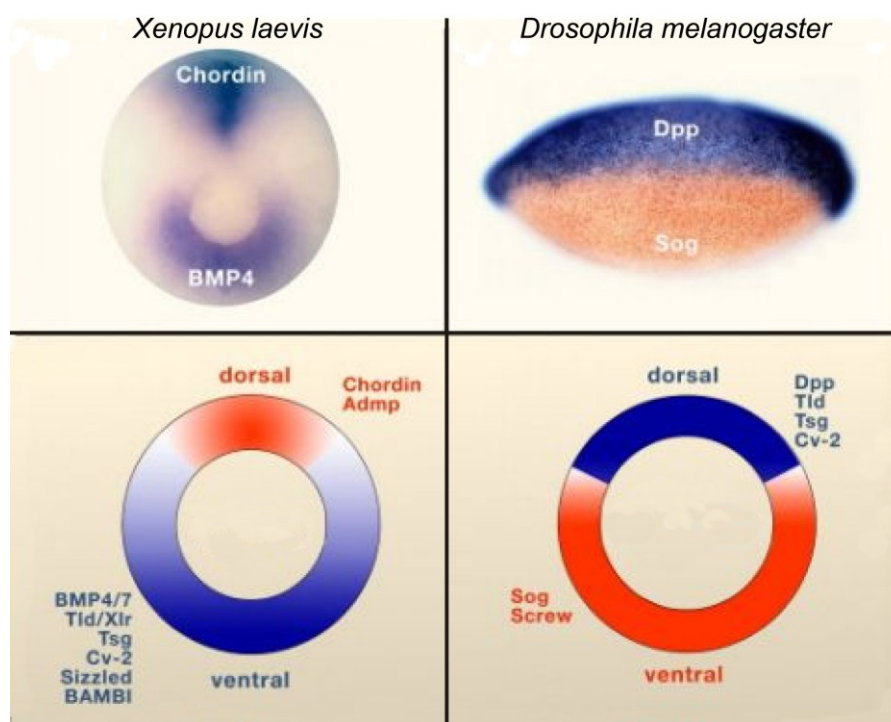
	Funció durant la neurogènesi	Gens
Neurogènesi primerenca	Especificació d'ectoderm neurogènic o epidèrmic	<i>BMP2/4, Dpp, chordin, sog, Wnt</i>
	Competència del neuroectoderm	<i>soxB</i>
	Regionalització mediolateral	<i>Msx, Gsx, Nk2-6</i>
	Regionalització anteroposterior	<i>six3, otp, otx, Emx, gens Hox</i>
	Inhibició lateral	<i>Delta/Notch</i>
Neurogènesi tardana	Manteniment de l'estat proliferatiu	<i>musashi, snail, E(spl)/HES</i>
	Especificació de progenitors neurals	gens <i>bHLH</i> proneurals
	Diferenciació neuronal	<i>numb, prox, elav</i>
	Morfogènesi de l'ull	<i>pax6, eya, six, dach, otx, rx</i>
	Guia d'axons	<i>netrin, robo/slit</i>

**Taula 2. Gens evolutivament conservats durant el procés de neurogènesi.** (veure el text per les referències de cada cas).

La transcripció dels membres dels *soxB*, i, per extensió, la mida i la forma del neuroectoderma, està controlada per diverses vies de senyalització, en particular per la via BMP (Arendt i altres, 2008; Mizutani i Bier, 2008) i la via Wnt (Niehrs, 2010). S'ha observat que alts nivells de *BMP* i *Dpp* reprimeixen l'expressió d'aquells gens i activen els propis del llinatge ectodèrmic epitelial. La unió d'aquests lligands amb els seus receptors en les cèl·lules del presumptiu neuroectoderma es prevé amb la interacció d'antagonistes com *chordin* o *sog* que als embrions dels Protostomia es localitzen a la regió ventral i als Deuterostomia a la dorsal (Figura 9). A més, la via BMP té una funció secundària en la formació del patró nerviós dorsoventral en les etapes més tardanes (Mizutani i Bier, 2008). Per exemple, hi ha evidències que nivells baixos de *BMP* poden difondre al domini neural i contribuir en la subseqüent divisió d'aquell territori en tres zones confrontades on, a la vegada, s'hi detecten els gens homeobox *msh/Msx*, *ind/Gsx* i *vnd/Nk2-6* que regularan el patró mediolateral del sistema nerviós (Hirth i Reichert, 2007; Mizutani i Bier, 2008). Per una altra banda, la via Wnt



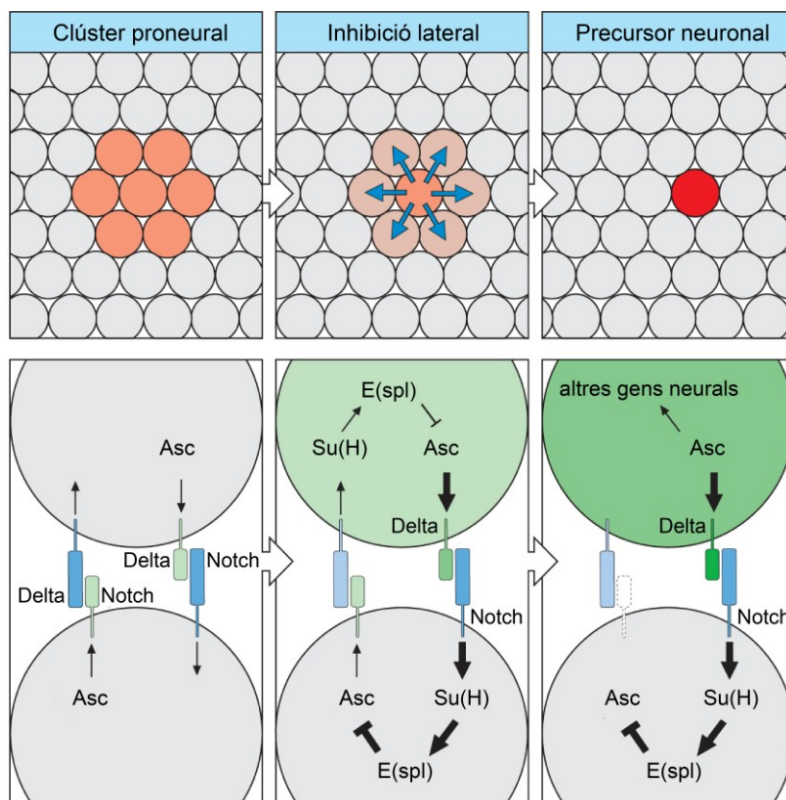
te un rol similar d'inhibir la neurogènesi a través de la  $\beta$ -catenin (Guth i Wegner, 2008; Kormish i altres, 2010; Sarkar i Hochedlinger, 2013), i, en canvi, instrueix la identitat posterior en la porció neurogènica de l'ectoderma (Niehrs, 2010): el punt més anterior del futur sistema nerviós representa el lloc de màxima concentració d'antagonistes d'aquesta via mentre que a la porció caudal s'hi concentren els seus lligands; ambdues regions estaran demarcades per la presència d'un altre codi de factors de transcripció homeobox integrat per *six3*, *otp*, *otx*, *ems/Emx* i els gens *Hox*. (Hirth i Reichert, 2007; Fröbius i altres, 2008; Niehrs, 2010; Steinmetz i altres, 2010; Steinmetz i altres, 2011; Holland i altres, 2013). En animals que no mostren un sistema nerviós centralitzat les funcions de la via Wnt però no de la via BMP també estan presents a l'ectoderma (Holland, 2000; Mizutani i Bier, 2008; Darras i altres, 2011).



**Figura 9. La xarxa de senyalització integrada per BMP i Chordin regula l'especificació del neuroectoderma.** La xarxa reguladora està conservada en un espectre ampli d'animals però actua en regions dorsoventrals diferents de l'embrió degut a la inversió de l'eix entre protòstoms i deuteròstoms (Arendt i Nübler-Jung, 1994; De Robertis i Sasai, 1996). Així, a *Xenopus* *Chordin* s'expressa al cantó dorsal i *BMP4* al cantó oposat ventral, mentre que a *Drosophila* *Dpp*, l'ortòleg de *BMP4*, ho fa al dorsal i *Sog*, el de *Chordin*, al ventral. Els dibuixos mostren, a més, altres proteïnes de secreció que intervenen en l'establiment de l'eix dorsoventral (modificat de De Robertis, 2008). Els dibuixos i les imatges de les hibridacions *in situ* mostren una visió lateral on el dorsal és a la part superior de l'embrió.

La formació del l'epiteli neurogènic dona pas a l'expressió dels membres *bHLH* de les famílies *Achaete-Scute* (o *Asc*) i *Atonal*, coneguts popularment com a gens proneurals, que defineixen progenitors i cèl·lules nervioses amb destinacions més restringides (Bertrand i altres, 2002; Guillemot, 2007). Al neuroectoderma de *Drosophila* i diversos vertebrats aquests gens actuen en subdominis anomenats clústers proneurals formant un patró altament

invariant (Bertrand i altres, 2002). En últim terme, els gens *bHLH* s'encarreguen de promoure la sortida de l'estat de progenitor i desencadenar la diferenciació neuronal, i, més endavant, d'actuar en l'especificació dels llinatges tant en cèl·lules del sistema nerviós central com perifèric. Alhora, el patró espacial i temporal de naixement dels progenitors es controla localment amb la via de senyalització Delta/Notch (Beatus i Lendahl, 1998; Cau i Blader, 2009). D'aquesta manera, els gens proneurals desencadenen un bucle de retroalimentació inhibidòria, el procés d'inhibició lateral, dins o al límit de grups proneurals activant transcripcionalment els lligands de *Notch* com la molècula *Delta* (Figura 10). Les cèl·lules que reben nivells alts de l'activitat de *Notch* inhibeixen l'expressió dels gens proneurals i expressen una altra classe de gens bHLH, els *E(spl)/HES*, que reprimeixen la diferenciació neuronal (Fischer i Gessler, 2007; Kageyama i altres, 2008). Les cèl·lules positives per *E(spl)/HES* romanen indiferenciades i conserven el seu potencial neurogènic per les rondes posteriors de la producció de progenitors o esdevenen cèl·lules epitelials. En canvi, les cèl·lules amb baixos nivells d'activitat de *Notch* progressen cap a un estat de progenitor o precursor neuronal determinat.



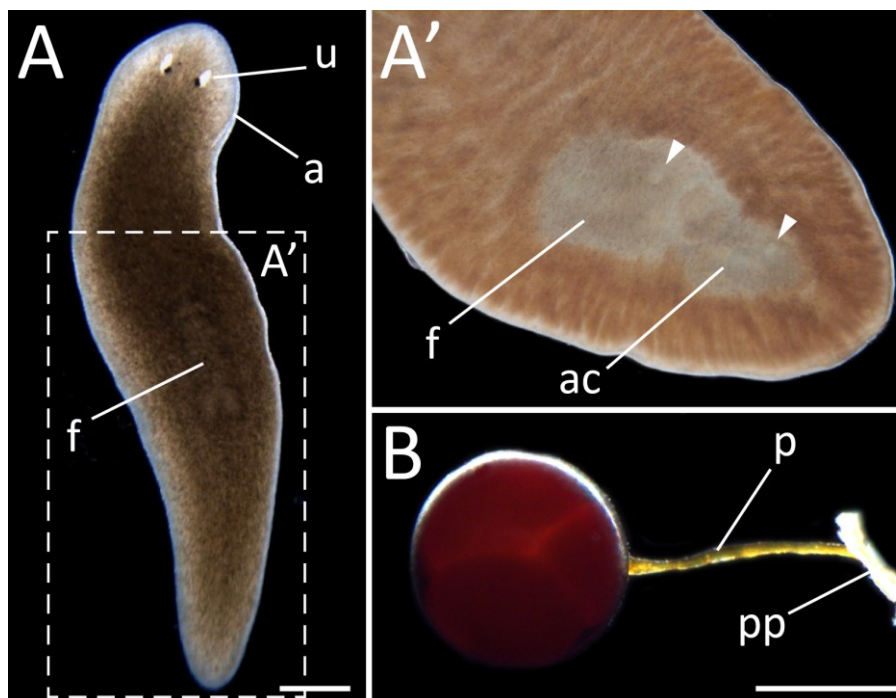
**Figura 10. Gens proneurals i inhibició lateral a *Drosophila*.** Inicialment, totes les cèl·lules del clúster proneural són equivalents. En un moment donat, una de les cèl·lules incrementa lleugerament l'activitat dels gens proneurals i, mitjançant la senyalització de la via Notch, reprimeix la neurogènesi en les cèl·lules del voltant. En darrer lloc, aquest gen proneural inicia un programa molecular que condueix a la diferenciació de la cèl·lula (modificat de <http://www.mun.ca/biology>)

Els progenitors determinats surten de la fase de proliferació guiats per un altre grup de factors conservats on s'hi inclou *prospero* (Choksi i altres, 2006; Southall i Brand, 2009; Stergiopoulos i altres, 2015) i *pumb* (Cayouette i Raff, 2002; Gulino i altres, 2010), i, subseqüentment, membres de famílies com *elav* implementen els programes genètics que inicien la diferenciació d'aquestes cèl·lules en neurones (Pascale i altres, 2008; Colombrita i altres, 2013). Als ulls, la diferenciació es controla finalment amb una xarxa gènica reguladora

conformada per *pax6-six-eya-dach*, i també per altres factors de transcripció com *otx*, *rx* i *mitf* (Vopalensky i Kozmik, 2009). Per contra, gens com *musashi* o *snail* s'encarreguen de mantenir l'estat de proliferació als progenitors, i també de regular aspectes de la seva biologia com l'orientació de fus mitòtic o els gens del cicle cel·lular (Ashraf i Ip, 2001; Okano i altres, 2002; Zander i altres, 2014). Un cop diferenciades, les neurones han de començar a establir l'arquitectura típica del sistema nerviós. Aquest procés està controlat per molècules de secreció com les *netrins* i el sistema *robo/slit*, que funcionen atraient o repel·lint la migració neuronal i el creixement dels axons (Killeen i Sybingco, 2008; Rajasekharan i Kennedy, 2009; Ypsilanti i altres, 2010).

## 2. Les planàries

Les planàries, nom amb el que es coneix comunament als organismes de l'ordre Tricladida, són animals invertebrats d'aspecte vermiforme que poden habitar ambients terrestres, marins o d'aigües dolces. L'espècie de treball d'aquest estudi, *Schmidtea polychroa* (Schmidt, 1861), és típica de rius i llacs de la regió central d'Europa, i a la Península Ibèrica es pot recol·lectar amb facilitat a la conca de l'Ebre i prop de la costa de la Comunitat Valenciana. Els individus adults acostumen a fer un centímetre de llargària i presenten una coloració marró fosc que és més intensa a la part dorsal que a la ventral; la seva morfologia externa és relativament simple: s'observen dos ulls a la regió dorsal i dues aurícules sensorials en posició lateral a la part anterior, o cefàlica, i una faringe a la zona central que s'evagina per una obertura ventral, la boca, en el moment de la captura de l'aliment (Figura 11A). En espècies sexuades, trobem, a més, una segona obertura en una posició post-faríngia, el gonopor, que connecta l'aparell reproductor amb l'exterior (Figura 11A').



**Figura 11. La planària *Schmidtea polychroa*.** **A** Morfologia externa d'un individu adult de *S. polychroa*. Mostra una visió dorsal on l'anterior es troba cap a la part superior de la imatge. **A'** Visió ventral de la regió postfaríngia i la cua d'un animal sexuat; la localització de la boca i el gonopor estan assenyalats amb un cap de fletxa. **B** Aspecte extern d'una càpsula embrionària amb tres embrions en desenvolupament; el peu del peduncle fixa la càpsula al substrat. a, aurícula; ac, aparell copulador; f, faringe; p, peduncle; pp, peu del peduncle; u, ull. Escala de barres, 1mm.

*S. polychroa* és hermafrodita, és a dir, cada animal disposa d'òrgans sexuals masculins i femenins, i es reproduïx mitjançant la deposició de càpsules embrionàries (*cocoons*) al medi durant les èpoques més càlides de l'any. Els *cocoons* estan formats per una coberta dura i opaca que els embolcalla, i per un peduncle flexible que els adhereix al

substrat; dins de cadascun d'ells hi ha entre 3 i 5 embrions i milers de cèl·lules vitel·lines (Figura 11B). Darrerament se n'ha optimitzat les condicions d'establació per tal de maximitzar-ne la producció de càpsules embrionàries durant tot l'any (Martín-Durán i altres, 2008).

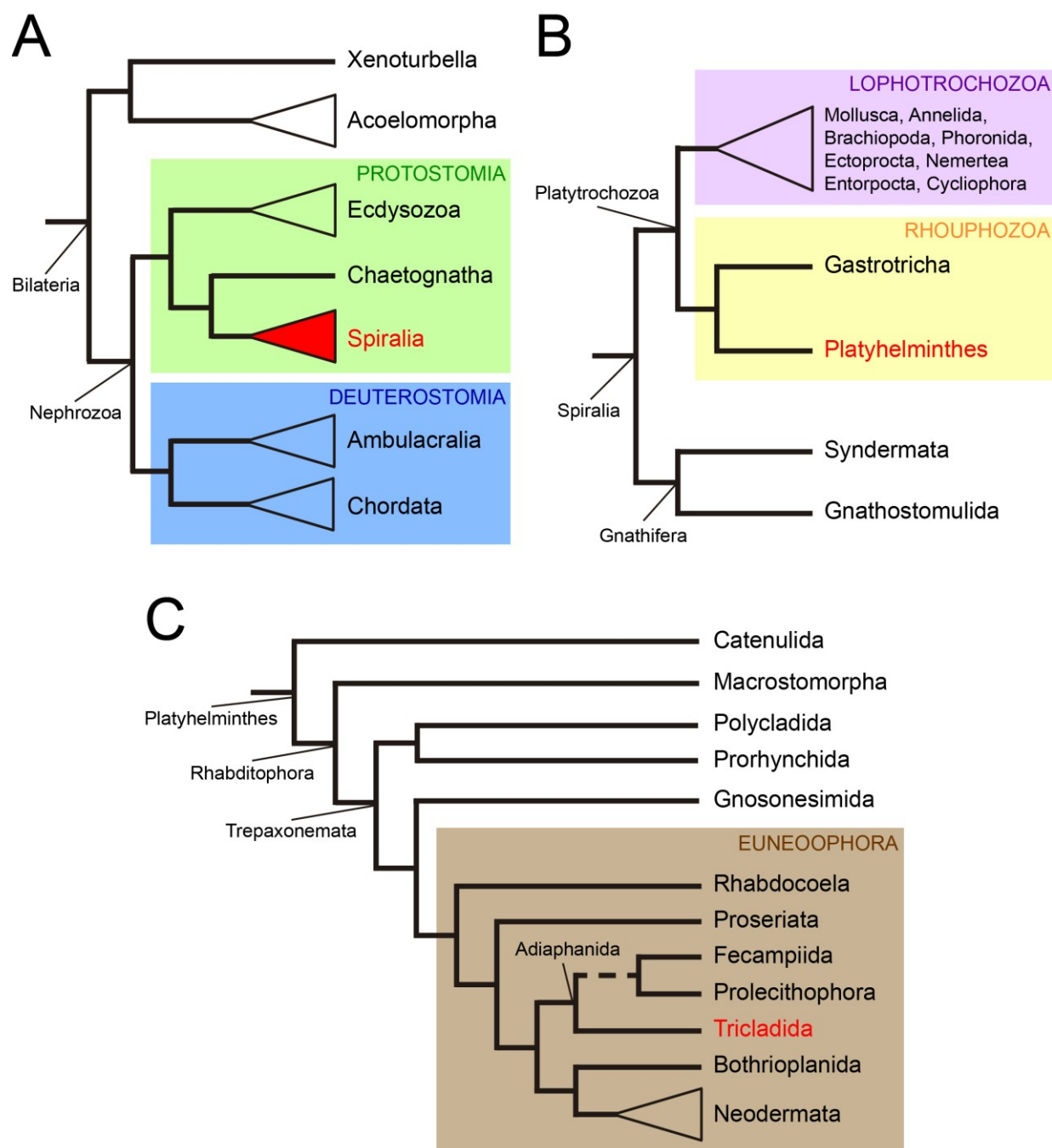
Les planàries d'aigua dolça han estat objecte d'estudi per la seva increïble capacitat per regenerar un animal complet a partir de gairebé qualsevol fragment del seu cos en un període de temps breu, d'entre 10 i 15 dies (Handberg-Thorsager i altres, 2008). Aquesta habilitat està sustentada en una població de cèl·lules mare, els neoblasts, que poden donar lloc a tots els tipus cel·lulars diferenciats de l'adult (Shibata i altres, 2010; Baguñà 2012; Rink, 2013). Les planàries, però, presenten diversos trets morfològics (p. e. un sistema digestiu cec, un sistema nerviós central i un sistema visual simple, etc.) que fan que també siguin interessants per estudiar l'evolució animal des d'un punt de vista embriològic.

## 2.1 Posició filogenètica

La planàries pertanyen al fílum dels Platyhelminthes. Aquests són organismes de simetria bilateral, no segmentats, acelomats i que estan aplanats dorsoventralment, amb una única obertura digestiva, i sense aparell circulatori, respiratori ni esquelètic (Hyman, 1951). Tradicionalment els Platyhelminthes també incloïen els acels i els nemertodermàtides, i, en conjunt, eren considerats els bilaterals més basals ja que mostraven caràcters com l'absència de celoma i un sistema digestiu cec que eren interpretats com ancestrals durant l'evolució animal (Hyman, 1951). Les filogènies moleculars han revolucionat aquest paradigma i han separat el clade en dos subgrups: el dels acelomorfs, amb una posició filogenètica encara avui discutida (Figura 12A; Philippe i altres, 2011; Ruíz-Trillo i altres, 1999), i el que ha mantingut el nom de Platyhelminthes que s'ha vist desplaçat dins d'un del superfílum dels Spiralia (Giribert i altres, 2000; Laumer i altres, 2015a).

Com hem vist a la primera part de la introducció, Spiralia conté aquells animals invertebrats que tenen com a caràcter ancestral la presència d'un patró de segmentació espiral en quartets durant el seu desenvolupament embrionari (Giribert i altres, 2000; Hejnol i altres, 2009). Les relacions internes dels Spiralia també han estat motiu de controvèrsia i s'han començat a resoldre amb un cert grau de confiança gràcies a l'aplicació de mètodes de seqüenciació massiva de transcriptomes i genomes a tàxons que fins ara havien estat oblidats. En els primers estudis d'aquest tipus els animals de mida petita i amb una organització corporal simple com els platihelminths, els gastròtrics o els gnatostomúlids s'havien agrupat junts en el clade dels Platyzoa, un dels tres principals grups d'espirals (Hejnol i altres, 2009). Altres autors, però, havien dubtat de l'existència real d'aquesta classificació argumentant l'absència d'apomorfies que definissin els Platyzoa, i el baix suport i la relació inestable que obtenien els fílums en anàlisis alternatius (Edgecombe i altres, 2011). Els treballs més recents demostren la parafília filogenètica dels Platyzoa i situen el clade Gnathifera (Gantostomulida + Rotifera) a la base del superfílum Spiralia i com a grup germà dels Platyrochozoa, que inclou Rhouphozoa (Platyhelminthes + Gastrotricha) i

Lophotrochozoa (Figura 12B; Struck i altres, 2014; Laumer i altres, 2015a). Fins fa poc, Lophotrochozoa és el nom que s'assignava als Spiralia en general, però que a dia d'avui fa referència només als organismes anteriorment anomenats Trochozoa i que inclou grups importants en l'estudi comparatiu del desenvolupament embrionari com els mol·luscs i els anèlids.



**Figura 12. Relacions filogenètiques dels tricladis.** **A** Filogènia dels principals grups d'animals bilaterals (segons Hejnol i altres, 2009). Els animals amb un desenvolupament embrionari espiral en quartets (Spiralia, en vermell) formen part del grup Protostomia. **B** Posició filogenètica dels platihelmints (Platyhelminthes, en vermell) dintre de superflum dels Spiralia (segons Struck i altres, 2014). L'estudi en que es basa aquesta filogènia estableixen amb una alt suport la monofília del clade Lophotrochozoa però no aconsegueix resoldre les seves relacions internes. **C** Filogènia interna dels Platyhelminthes (segons Laumer i altres, 2015b). La



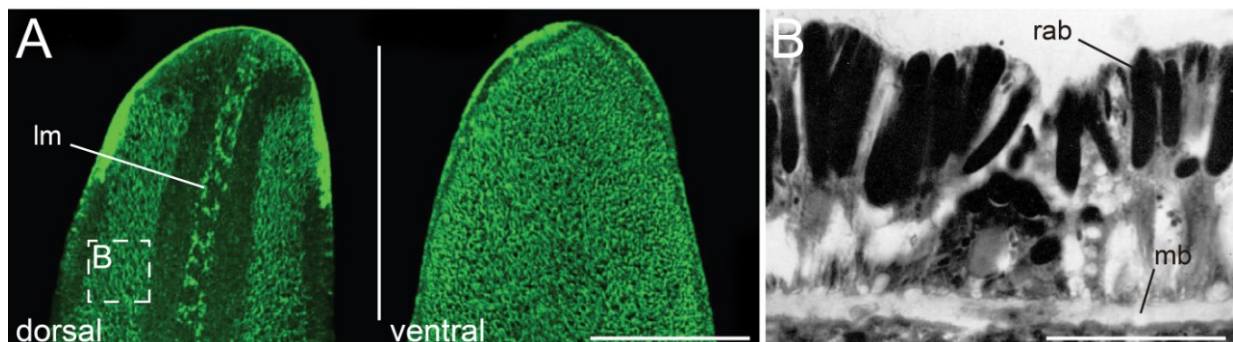
relació interna del clade Adiaphanida, al qual pertanyen els triclads (Tricladida, en vermell), és encara incerta (indicat amb ratlla discontinua). El clade Euneophora (en marró) inclou tots aquells grups d'animals amb ous ectolecífics.

A nivell intern els platihelminths es divideixen en Catenulida i Rhabditophora. En els Rhabditophora hi trobem, entre d'altres, l'ordre Macrostomoprha, al qual pertany l'espècie model *Macrostomum lignano*, i els Trepaxonemata, que inclou l'ordre Polycladida i el grup dels Neophora. Aquests últims es caracteritzen per formar oòcits sense vitel i en els que el material nutricional és aportat per cèl·lules vitel·lines que la mare incorpora a l'ou en el moment de la deposició (ectolecífics; Westblad, 1948). Les planàries formen part d'aquest grup i, en concret, pertanyen als Adiaphanida, en una posició filogenètica entre els Proseriata i els Neodermata (Figura 12C; Laumer i altres, 2015b). A la vegada, l'ordre Tricladida es divideix en tres subordres, Maricola, Cavernicola i Continenticola (Riutort i altres, 2009); les sinapomorfies que els caracteritzen són la presència d'una faringe transitòria durant el seu desenvolupament embrionari i la presència d'una zona glandular adhesiva anular al voltant de la superfície ventral de l'animal (Sluys, 1989). *S. polychroa*, a l'igual que la seva espècie germana *Scmidtea mediterranea* i els membres dels gèneres *Dugesia* i *Girardia*, pertany al subordre Continenticola, superfamília Geoplanoidea, família Dugesiidae.

## 2.2 Anatomia general

### Epidermis

L'epidermis de les planàries està formada per una capa monoestratificada de cèl·lules multiciliades que es recolza sobre una membrana basal que la separa dels òrgans interns (Figura 13B, Rieger i altres, 1991). En alguns casos, aquestes cèl·lules estan travessades per conductes de cèl·lules glandulars que descansen al parènquima (Skaer, 1965).



**Figura 13. Anatomia de l'epidermis de la planària.** **A** Immunotinció específica dels cilis de l'epidermis amb l'anticòs anti- $\alpha$ -tubulina. Els cilis són més abundants i es distribueixen de manera homogènia a la part ventral, i dorsalment es concentren al voltant de la línia mitja i en dues bandes laterals. L'anterior de l'animal es troba cap a la part superior de les imatges (modificades de Molina, 2011). **B** Tinció amb galat òsmic d'una secció transversal de la superfície dorsal-lateral de l'epidermis. S'hi poden observar dues cèl·lules epidèrmiques, una tercera que s'està inserint des del parènquima, i els rabdits (en negre; modificat de Skaer, 1965). lm, línia mitja; mb, membrana basal; rab, rabdits. Escala de barres, A, 750 $\mu$ m; B, 10  $\mu$ m.

Les cèl·lules de l'epiteli adult adopten una forma columnar i formen un tapís que està polaritzat: a la regió més apical hi trobem cilis i microvillis, a les regions laterals unions estretes i septades, i a la superfície basal hemidesmosomes. (Rieger i altres, 1991). La regió apical conté, a més, inclusions secretòries anomenades rabdits (Figura 13B). La ciliació epidèrmica sol ser més abundant a la superfície ventral que a la dorsal, i ajuda a la mobilitat de l'animal pel medi (Figura 13A). Els rabdits epitelials i les cèl·lules glandulars parenquimàtiques alliberen substàncies mucoses que també poden ajudar a la locomoció i la defensa de l'individu.

## Musculatura

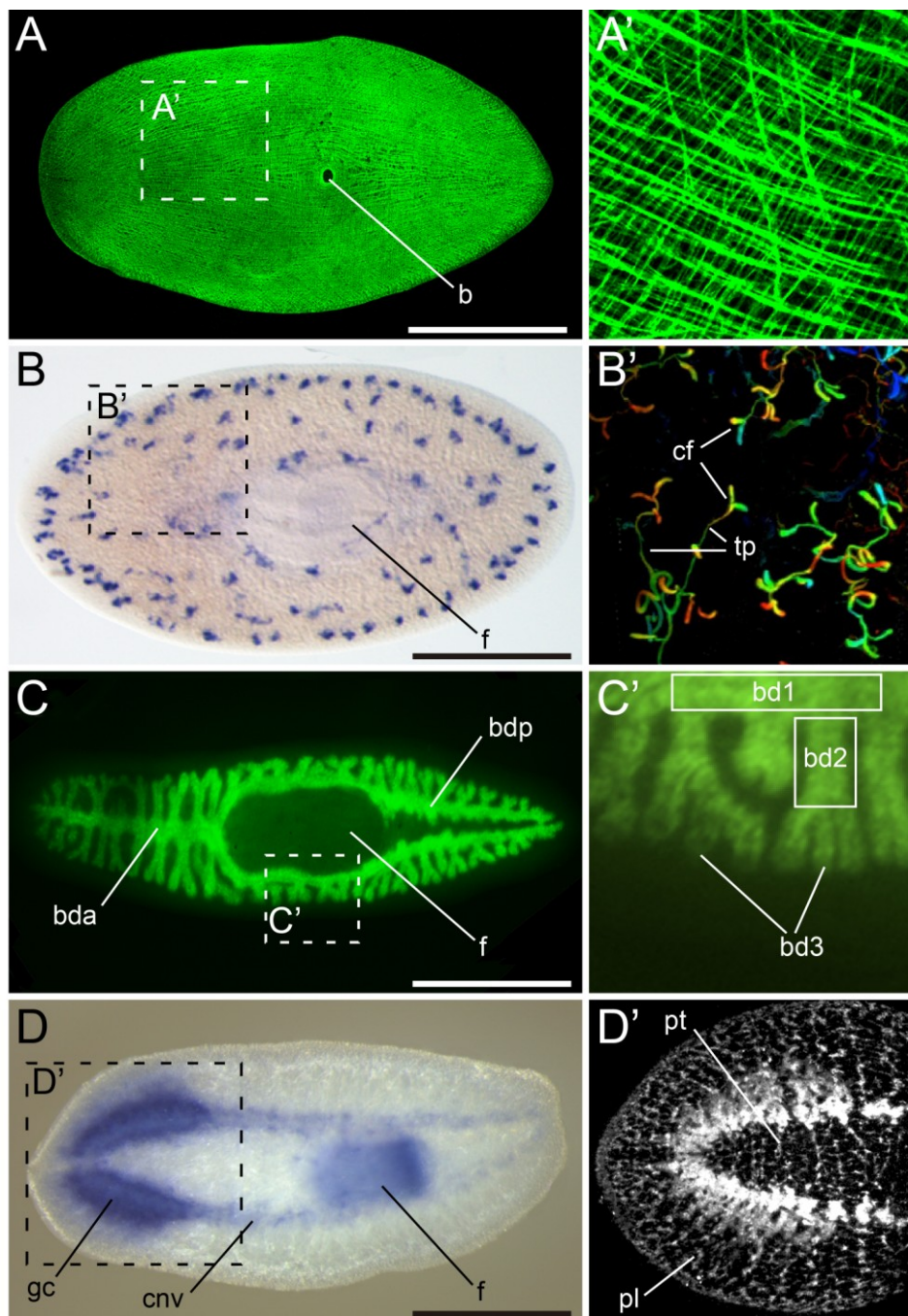
El sistema muscular de les planàries d'aigua dolça està compost per la musculatura corporal i els plexes associats a diferents òrgans, com ara la faringe, el sistema digestiu i, en espècies sexuades com *S. polychroa*, l'aparell reproductor (Cebrià i altres, 1997; Kobayashi i altres, 1998, Orii i altres, 2002). El parènquima de l'animal també està travessat per fibres més fines que s'orienten en sentit dorsoventral, transversal i longitudinal (Bueno i altres, 1997). La musculatura corporal s'organitza en quatre capes subepidèrmiques que es situen sota la làmina basal de la següent manera: de més extern a més intern trobem una capa de fibres circulars, seguida d'una primera capa de fibres longitudinals, que és més fina que l'anterior, fibres diagonals i, finalment, la segona capa de fibres longitudinals (Figura 14A, 14A'). Les fibres longitudinals externes són un sinapomorfia de les planàries d'aigua dolça i no estan presents en altres espècies de platihelminth (Cebrià i altres, 1997). Les cèl·lules musculars són allargades i s'empaqueten en tàndem per formar les fibres musculars (Baguñà i Romero, 1981). La naturalesa d'aquestes fibres és, a dia d'avui, discutida ja que a nivell ultraestructural mostren característiques tant de tipus llis (p. e. absència d'estriació) com estriat (p. e. disposició perifèrica del nucli i presència d'estructures semblants a les línies Z dels sarcòmers; Rieger i altres, 1991), i, a més, la majoria d'elles expressen miosines musculars - *MHC-A* o *B*- que són pròpies de cèl·lules estriades (Kobayashi i altres, 1998). A més, el patró d'expressió diferencial de les miosines suggereix que les cèl·lules positives per *MHC-A* s'encarreguen dels moviments peristàltics interns i que les positives per *MHC-B* ajuden a la locomoció de l'animal (Kobayashi i altres 1998).

## Sistema excretor

Els sistema excretor està format per una elaborada xarxa de túbuls anomenats protonefridis que es troben distribuïts sota la musculatura corporal i per tot l'animal, i que es connecten amb l'exterior a través de nefròpors que travessen l'epidermis (Figura 14B). Cada protonefridi consta d'una regió tubular, cèl·lules associades als túbuls i cèl·lules flamígeres ciliades en l'extrem terminal (Figura 14B'; McKanna, 1968a; Scimone i altres, 2011). Els túbuls presenten branques laterals, que també són ciliades, i una secció principal estructurada en un epiteli cuboïdal no ciliat (McKanna, 1968b). Els protonefridis faciliten l'osmoregulació de l'animal i l'expulsió de substàncies de rebuig mitjançant un mecanisme de filtratge i circulació de líquids extracel·lulars cap al medi des de les cèl·lules flamígeres i a



través del lumen dels túbuls. En aquest sistema, les cèl·lules accessorïes dels túbuls tindrien una hipotètica funció secretora (Rink i altres, 2011).



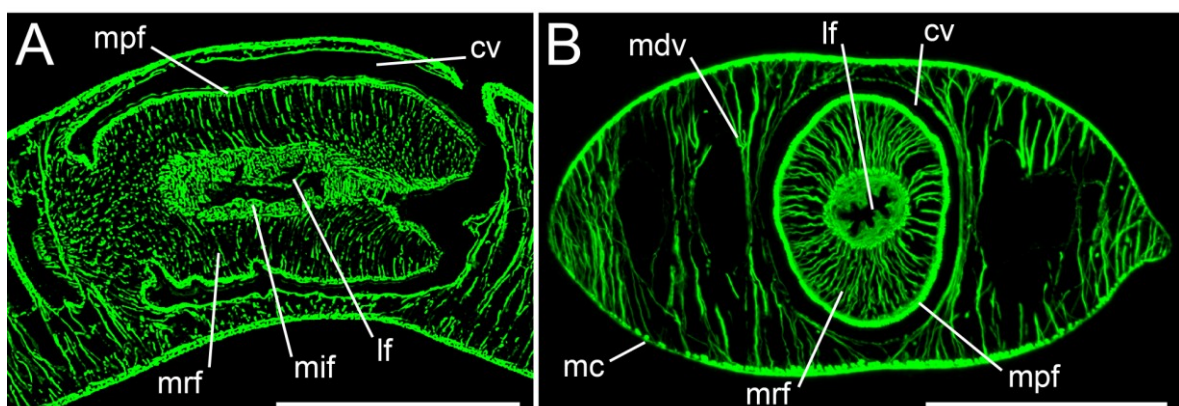
**Figura 14. Anatomia general de la planària visualitzada amb marcadors moleculars. A, A'** Immunotinció fluorescent específica del sistema muscular amb l'anticòs anti-TMUS13. **B, B'** Morfologia del sistema excretor detectada amb la hibridació *in situ* del gen *CAVII-1* (imatge de l'esquerra) i la immunotinció fluorescent amb l'anticòs anti- $\alpha$ -Tubulin (imatge de la dreta; ambdós modificats de Rink i altres, 2011). **C, C'** Marcatge específic del sistema digestiu amb la hibridació *in situ* fluorescent del gen *panthotenate kinase* (imatges proporcionades per Sara Barberan). **D, D'** Morfologia del sistema nerviós detectada amb la hibridació *in situ* del gen *synaptotagmin* (imatge de l'esquerra) i la immunotinció fluorescent amb l'anticòs anti-SYNORF-1 (imatge de la dreta). Totes les imatges mostren una visió ventral d'un animal adult intacte on l'anterior és a l'esquerra. b, boca; bda, branca del digestiu anterior; bdp, branca del digestiu posterior; bd1, branca del digestiu primària; bd2, branca del digestiu secundària; bd3, branca del digestiu terciària; cf,

cèl·lula flamígera; cnv, cordó nerviós ventral; f, faringe; gc, gangli cefàlic; pl, projeccions laterals; pt, projeccions transversals; tp, tub del protonefridi. Escala de barres, 750µm.

## Sistema digestiu

Les planàries d'aigua dolça, com la resta de trícilads, presenten un sistema digestiu cec, sense anus, i un intestí dividit en tres branques principals (o primàries) que, a la vegada, es ramifiquen en múltiples branques (o diverticles) secundàries, terciàries i quaternàries (Figura 14C, 14C'). Una de les tres rames primàries es projecta cap a la part anterior de l'animal i les altres dues cap a la posterior, i, en la regió central, un esòfag curt les uneix i les connecta amb la faringe, que és l'encarregada d'ingerir l'aliment i d'expulsar els residus de la digestió per l'orifici de la boca (Figura 14C; Forsthoefel i altres, 2011). L'embranchement de les rames intestinals permet que les partícules d'aliment arribin a tot el cos. A nivell cel·lular, l'epiteli de l'intestí conté dos tipus cel·lulars principals: els fagòcits, que absorbeixen i processen els metabòlits, i cèl·lules secretores especialitzades (cèl·lules *goblet*) que alliberen enzims al lumen (Hyman, 1951; Forsthoefel i altres, 2011). L'epiteli s'organitza en una monocapa columnar que es troba envoltada per una làmina basal, músculs entèrics (Bueno i altres, 1997; Kobayashi i altres, 1998) i també per un plexe nerviós poc especialitzat (Baguñà i Ballester, 1978).

La faringe es un òrgan complex, molt musculat i cilíndric, i que descansa a una cavitat faringia localitzada a la secció central en animals del gènere *Schmidtea* (Figura 15A, 15B). S'orienta en l'eix anteroposterior, de manera paral·lela al cos, i es pot evaginar ventralment a través de la boca per atacar la presa o les partícules d'aliment. Està formada per un epiteli intern ciliat i un d'extern que fa de protecció; entre mig trobem les diferents capes musculars (Orii i altres, 2002), dos anells nerviosos concèntrics i un plexe intermuscular (Baguñà i Ballester, 1978), i abundants cèl·lules glandulars (Bueno i altres, 1997).



**Figura 15. Anatomia de la faringe.** A, B Immunotincions fluorescents específiques del sistema muscular amb l'anticòs anti-TMUS13. La musculatura interna i de la paret de la faringe discorren, respectivament, per sota dels els epitelis intern i extern de l'òrgan. La imatge A mostra una secció longitudinal d'un adult de *S. mediterranea* on l'anterior és a l'esquerra, i la imatge B una secció transversal on el dorsal és a la part superior (imatges proporcionades per Sara Barberan). cv, cavitat de la faringe; lf, lumen de la faringe; mc, musculatura corporal; mdv, musculatura dorsoventral; mif, musculatura interna de la faringe; mpf, musculatura de la paret de la faringe; mrf, musculatura radial de la faringe. Escala de barres, 300µm.

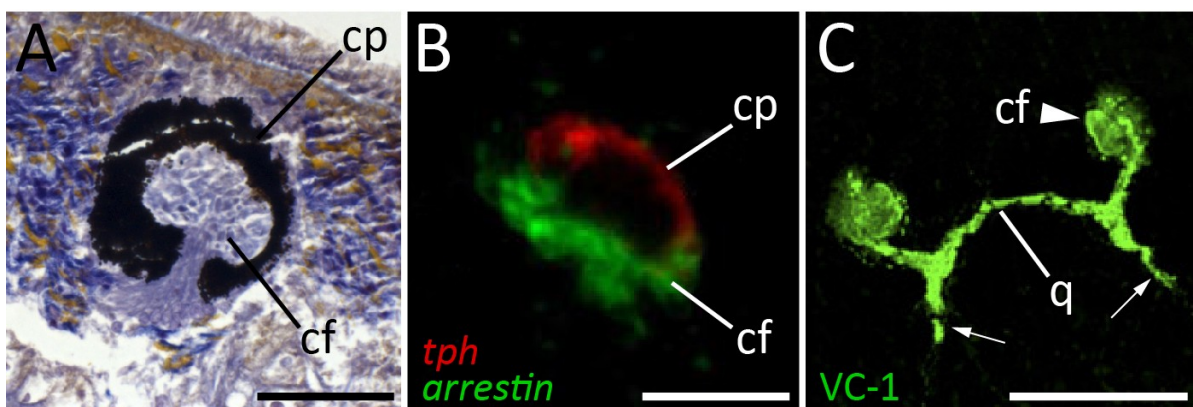
## Sistema nerviós i òrgans sensorials

Les planàries presenten un sistema nerviós central format per un cervell localitzat a la part anterior del cos i dos cordons nerviosos que recorren per la part ventral de l'animal; el cervell sempre es troba en una posició dorsal respecte dels cordons (Figura 14D; Cebrià, 2007). També disposen de diferents plexes nerviosos perifèrics que innerven òrgans específics com el plexe subepidèrmic, el submuscular, el de la faringe, i els que es troben al voltant de les rames del sistema digestiu i els òrgans sexuals (Baguñà i Ballester, 1978; Cebrià, 2007); aquests plexes i els òrgans sensorials formen part del sistema nerviós perifèric (SNP). El sistema nerviós mostra, tot i la seva aparent simplicitat morfològica, un grau de complexitat elevat tan a nivell cel·lular, com estructural i molecular, i es compon de neurones uni-, bi- i multipolars (Cebrià, 2007) que poden ser de tipus dopaminèrgic (Nishimura i altres, 2007a), serotoninèrgic (Nishimura i altres, 2007b), glutamatèrgic (Cebrià i altres, 2002b), octapaminèrgic (Nishimura i altres, 2008a), gabaèrgic (Nishimura i altres, 2008b) i colinèrgic (März i altres, 2003), o secretores de neuropèptids com la FMRFamida (Fraguas i altres, 2012), la GyrFamida, o el Neuropèptid F (Cebrià, 2008), entre d'altres.

El cervell està organitzat en dos ganglis cefàlics bilaterals que s'interconnecten per una commissura anterior. Cada gangli projecta unes branques cap al marge del cap i està travessat per nombroses fibres musculars i cèl·lules secretores (Baguñà i Ballester, 1978); la seva capa més externa conté els cossos de les neurones i la regió central el neuròpil amb els axons (Figura 14D'; Cebrià, 2007). En els cordons nerviosos ventrals trobem clústers de cèl·lules espaiats amb regularitat al llarg de l'eix anteroposterior que adopten una ultraestructura similar a la dels ganglis cefàlics i que es connecten entre sí mitjançant projeccions transversals (Cebrià, 2007). Des del cervell i els cordons nerviosos també creixen processos laterals que contacten amb els plexes sensorials. A nivell molecular el cervell es pot considerar una estructura independent dels cordons i està regionalitzat en dominis d'expressió de gens conservats evolutivament (Cebrià, 2007). Per exemple, ortòlegs de la família d'homeobox *otx* i *otp* es detecten en l'eix mediolateral de l'òrgan -*otxA* en un domini intern del cervell, *otxB* en la regió central i *otp* a les branques cefàliques- (Umesono i altres, 1997; Umesono i altres, 1999), i membres de la via de senyalització Wnt ho fan en l'eix anteroposterior -*wnt11.6* a la meitat posterior del cervell i *fzA* a la meitat anterior- (Kobayashi i altres, 2007). Aquests dominis moleculars es poden subdividir en d'altres de més concrets que es defineixen amb l'expressió d'ortòlegs de la família *noggin* i *Six/soe* a les branques cefàliques, o amb la d'ortòlegs de *pax6*, *wnt5* i *eye53* a la regió central del gangli (Cebrià, 2007).

El sistema sensorial es compon de cèl·lules de tipus mecanoreceptor, quimiorreceptor, reoreceptor i fotoreceptor que, com hem dit, es connecten amb el SNC a través de projeccions axonals (Hyman, 1951; Rieger i altres, 1991). A la zona cefàlica trobem els dos òrgans sensorials principals, les aurícules i els ulls. Les aurícules es localitzen a la base del cap i concentren un gran nombre de cèl·lules ciliars que s'estimulen amb les corrents d'aigua externes. Els ulls es troben a la regió dorsal, en una posició anterior respecte del cervell, i es situen dins el parènquima sota la musculatura subepidèrmica; en la majoria de

planàries d'aigua dolça es presenten en número parell, però algunes espècies com ara *Polycelis nigra* disposen de múltiples ocells distribuïts pel marge de la regió cefàlica. Els ulls estan formats per dos tipus cel·lulars diferenciats: cèl·lules sensorials fotoreceptores i cèl·lules pigmentàries (Figura 16A, 16B). Les cèl·lules fotoreceptores són les encarregades de captar la llum; són de tipus rabdomèric, i tenen un soma cel·lular bipolar que projecta rabdomers cap a les cèl·lules pigmentàries i axons cap al cervell i cap als fotoreceptors de l'altre ull, amb qui formen un quiasma (Figura 16A, 16C; Okamoto i altres, 2005; Carpenter i altres, 1974; Hyman, 1951). Totes aquestes connexions neurals permeten transportar la informació des de l'òrgan visual cap al SNC. La població dels fotoreceptors és molecular i anatòmicament heterogènia, i es pot subdividir en un grup de cèl·lules anteriors, dorsals i ventrals en funció de l'expressió diferencial de determinats gens (Collins i altres, 2010; González-Sastre i altres, 2012; Lapan i Reddien, 2012). Les cèl·lules pigmentàries formen una copa invertida de color fosc que embolcalla i protegeix els fotoreceptors de l'excés de llum, i també dirigeix la llum a una única direcció (Figura 16A; Okamoto i altres, 2005). L'ull de les planàries és, per tant, de tipus rabdomèric invertit.



**Figura 16. Sistema visual de les planàries del gènere *Schmidtea*.** **A** Secció de parafina d'un ull d'un adult tenyit amb la solució de Mallory. Dintre de la copa pigmentària hi ha els rabdomers de les cèl·lules fotoreceptores i a la base de l'òrgan el soma de les cèl·lules nervioses. **B** Marcatge específic de les cèl·lules fotoreceptores i les cèl·lules pigmentàries amb l'ús de sondes pels gens *Spol-tph* (en vermell) i *Spol-arrestin* (en verd). **C** Visualització del quiasma òptic i les projeccions nervioses que connecten les cèl·lules fotoreceptores amb el cervell de l'animal (indicades amb fletxes) mitjançant la immunotinció fluorescent amb l'anticòs anti-VC-1 (imatge modificada de Molina i altres, 2007). cf, cèl·lula fotoreceptora; cp, cèl·lular pigmentària; q, quiasma. Escala de les barres: A i B, 25µm; C, 100 µm.

## El parènquima

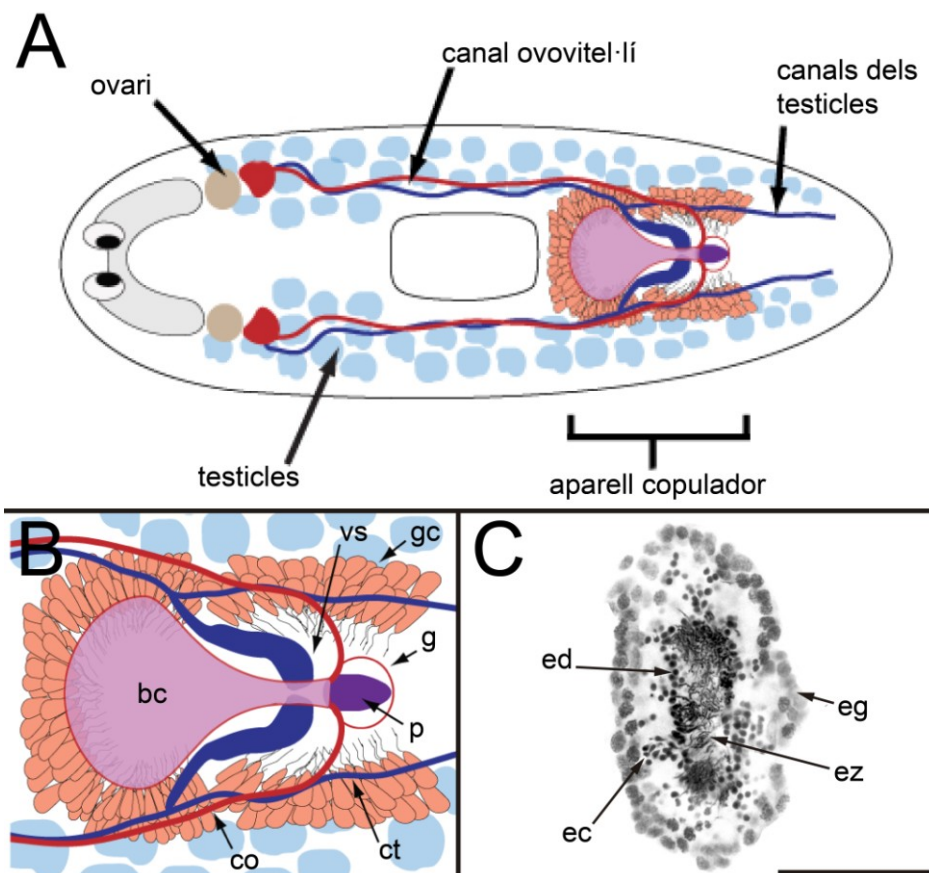
Finalment, el parènquima és el teixit connectiu que envolta tots els òrgans que hem descrit fins ara i els de l'aparell reproductor en cas de les planàries sexuades com *S. polychroa*. Hi trobem també cèl·lules glandulars, cèl·lules que contenen pigments i que donen la coloració a l'animal, i els neoblasts, que són una població de cèl·lules mare proliferatives. L'estructura de l'aparell reproductor i dels neoblasts es tractaran més endavant, a les seccions de "Reproducció" i de "Regeneració". L'extensió del parènquima està limitada externament per l'epidermis i internament pel sistema digestiu, i està format per una matriu



extracel·lular i per les cèl·lules fixes del parènquima que són molt plàstiques i poden emetre processos citoplasmàtics per ocupar l'espai que deixen les cèl·lules dels altres teixits (Hori, 1991).

## 2.3 Reproducció

Les planàries poden reproduir-se de manera sexuada, asexuala o partenogenètica: els animals asexuals es propaguen mitjançant la fissió de la cua i la regeneració dels dos fragments resultants; els animals sexuals ho fan amb la deposició de *cocoons* després de la còpula i la fecundació creuada entre dos individus; i els partenogenètics, tot i que també dipositen *cocoons*, són pseudogames, és a dir, requereixen l'esperma per iniciar l'embriogènesi però no incorporen el material genètic del pare a l'embrió. A la natura trobem espècies de planària que es reproduïxen amb només un d'aquests mètodes i d'altres que en combinen dos o més durant el seu cicle vital. Així, alguns animals són capaços d'alternar entre reproducció sexual i asexual en determinades èpoques de l'any, o poden presentar biotips sexuals o partenogenètics en funció de la ploïdia dels individus (D'Souza i Michiels, 2009).



**Figura 17. Anatomia de l'aparell reproductor i testis de les planàries.** **A** Representació esquemàtica de l'aparell reproductor en un organisme adult sexual. **B** Detall de la regió de l'aparell copulador on s'hi distingeixen el penis i de l'atri. **C** Tinció d'un testicle madur on s'hi indiquen els principals tipus cel·lulars. A

les imatges A i B l'anterior es troba cap a la part esquerra del dibuix (totes les imatges estan modificades de Chong i altres, 2011). bc, bossa copuladora; co, canal ovovitel·lí; ct, canal dels testicles; ec, espermatòcit; ed, espermàtida; eg, espermatogònia; ez, espermatozou; g, gonopor; gc, glàndules de la closca; p, penis; vs, vesícula seminal. Escala de barres, 50µm.

La planàries sexuades com *S. polychroa* són lleugerament més grans que les asexuals i presenten un aparell reproductor hermafrodita que es desenvolupa per epigènesi a partir de la diferenciació d'una població de cèl·lules mare somàtiques, els neoblasts (Chong i altres, 2011; Solana, 2013). La gònada masculina està formada per testicles en forma de sac de mida petita que es troben distribuïts en dues rengleres a la part dorsolateral del cos (Figura 17A). La seva estructura és lobulada i estratificada, i en la capa més externa hi trobem les espermatogònies que, a través d'una successió de divisions meiòtiques i mitòtiques, generen, primer, els espermatòcits primaris, després, les espermàtides i, finalment, els espermatozous (Figura 17C). La gònada femenina és heterocel·lular, com en la resta de membres dels Neophora. Està formada per un parell d'ovaris que es localitzen en una posició immediatament posterior a la del cervell i per glàndules vitel·lines que es troben distribuïdes de manera semblant als testicles (Figura 17A). Els ovaris no disposen de cèl·lules vitel·logèniques i, per tant, produeixen oòcits que són pobres en vitel. Aquesta substància es troba concentrada en les cèl·lules nodradores, o vitel·lines, que s'originen en les glàndules i que s'emmagatzemen amb el zigot en el moment de la deposició de la càpsula embrionària. El material nutricional de les cèl·lules vitel·lines serà incorporat activament per l'embrió durant el seu desenvolupament embrionari.

L'aparell copulador es troba en una posició immediatament posterior a la de la faringe i està format pel penis i l'atri, que conté les vesícules seminals i la bossa copuladora, i es connecta amb l'exterior pel gonopor (Figura 17A, 17B, Chong i altres, 2011). Dos conductes independents, els canals deferents dels testicles i els canals ovovitel·lins, connecten la gònada masculina amb les vesícules seminals i la gònada femenina amb la bossa copuladora (Figura 17A, 17B). La còpula entre dos individus s'inicia quan aquests fan un moviment per enfrontar la part ventral-posterior del seu cos, de manera que acaben tocant-se per la regió on es troben els gonopors. Llavors, insereixen el penis a l'atri de la parella i alliberen a la bossa copuladora l'esperma madur que han emmagatzemat a les vesícules seminals. Aquest esperma pot ser reabsorbit i usat com a font d'aliment o es pot alliberar cap a la regió del coll dels ovaris per a la fecundació dels oòcits (D'Souza i Michiels, 2009). Si es dona la fecundació, els ous viatgen fins la regió de l'aparell copulador pels conductes ovovitel·lins i les glàndules vitel·lines alliberen les cèl·lules nodradores. A l'atri té lloc la cariogàmia i la maduració final de l'oòcit (Benazzi Lentati, 1970), i la secreció per part d'unes altres glàndules especialitzades de les substàncies necessàries per la formació de la coberta que acabarà embolcallant les cèl·lules germinals i vitel·lines. Les càpsules embrionàries són esfèriques, es dipositen al substrat a través del gonopor i s'hi adhereixen mitjançant un peduncle. En el moment de la deposició són toves i de coloració blanquinosa, però s'endureixen i adquireixen una tonalitat taronja i, més tard, marró fosc per oxidació d'alguns dels seus components (Martín-Durán i altres, 2008).

## 2.4 Desenvolupament embrionari

El coneixement que es té de l'embriogènesi de les planàries és força limitat, sobre tot quan es compara amb altres camps com per exemple la regeneració de les planàries (Martín-Durán i altres, 2012b). Els motius principals que justifiquen aquesta situació es troben íntimament lligats a la biologia i cicle vital d'aquests organismes ja que:

- La fertilització és estrictament interna en totes les planàries de vida lliure
- Els embrions es troben envoltats d'una coberta que és opaca i impermeable, i per tant, són difícils d'accedir i manipular
- Els embrions són difícils de mantenir en cultius *in vitro* perquè necessiten incorporar durant el desenvolupament el material nutricional de les cèl·lules vitel·lines que subministra la mare.

Malgrat això, des de finals del segle XIX fins al moment actual s'ha produït un continu degoteig de treballs que tracten aquesta qüestió i que culminen amb les descripcions generals que ofereix Le Moigne a l'espècie *Polycelis nigra* (1963, 1966), i Cardona i col·laboradors a *S. polychroa* (2005a, 2005b, 2006). Le Moigne fou el pioner en l'estudi sistemàtic de l'embriologia de les planàries i proposà per primer cop la idealització del procés en estadis morfològicament definits. Aquest tipus de classificació s'ha estès a la resta de platihelminths en els darrers anys (Hartenstein i Ehlers, 2000; Morris i altres, 2004; Cardona i altres, 2005b).

### 2.4.1 Els 8 estadis embrionaris de *S. polychroa*

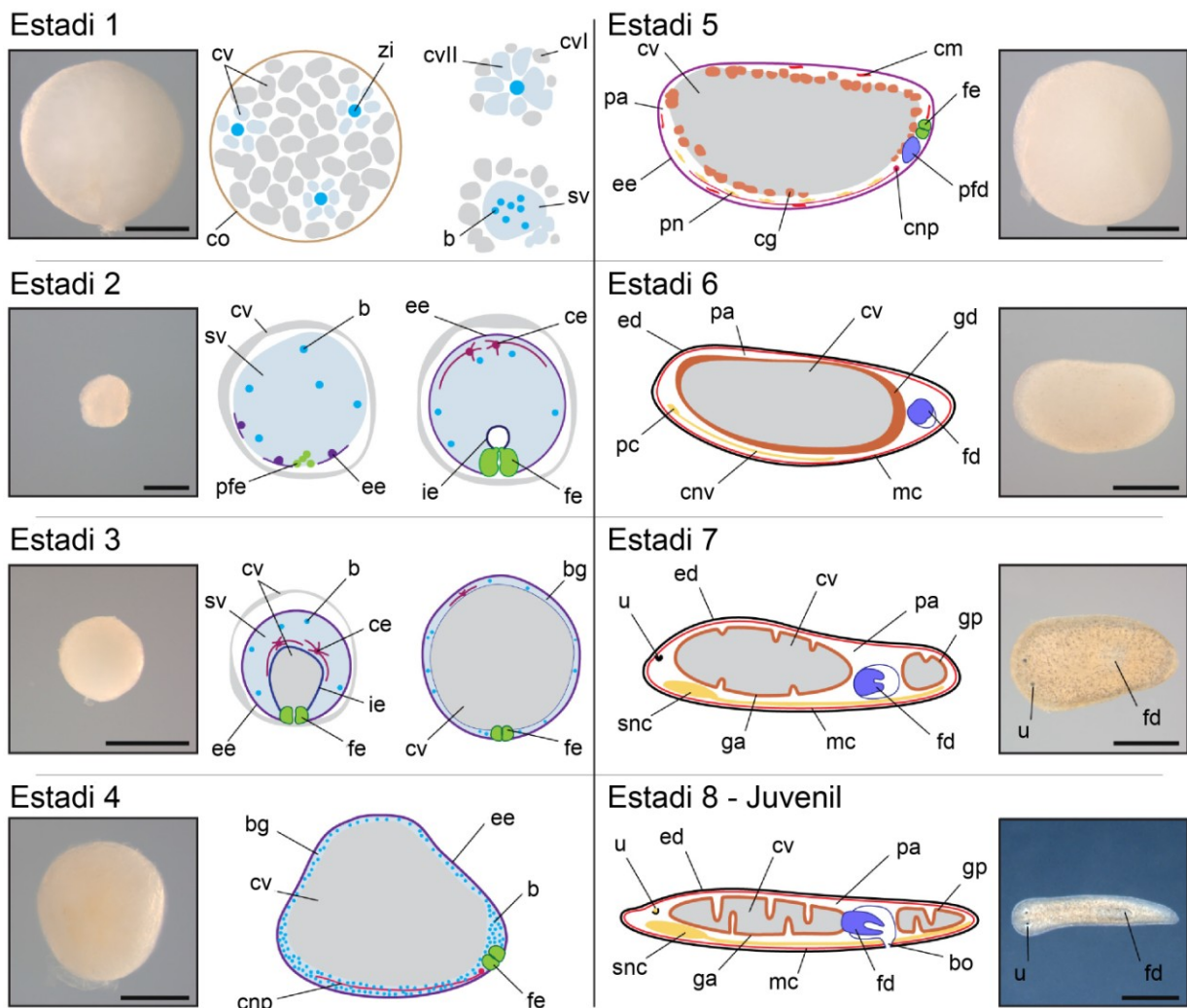
El desenvolupament embrionari de *S. polychroa* dura uns 15 dies a una temperatura constant de 20°C i té lloc dintre la càpsula embrionària que diposita la mare. Es pot considerar prototípic pel que fa als tríclads ja que mostra trets que també s'observen en altres animals del grup (Martín-Durán i altres, 2010). Les etapes inicials es caracteritzen per una segmentació dispersa del zigot en la que no hi ha rastre del patró de divisions en quartets dels espirals i en la que tampoc es distingeix la formació dels estadis típics de blàstula i gàstrula o dels fulls embrionaris, i per la diferenciació d'estructures transitòries que ajuden en la ingesta de les cèl·lules vitel·lines maternes. Els òrgans definitius s'estableixen un cop ha finalitzat el procés de captació de l'aliment (Cardona i altres, 2005b).

L'embriogènesi de *S. polychroa* s'ha dividit en els 8 estadis (Cardona i altres, 2005b). A continuació se'n descriuen els principals trets i també s'ofereix una representació esquemàtica per cadascun d'ells (Figura 18):

**1) Estadi 1:** diversos zigots i milers de cèl·lules embrionàries es troben dintre d'una càpsula embrionària dura i opaca. La primera divisió del zigot és morfològicament simètrica i té lloc dintre de la massa de cèl·lules vitel·lines. A continuació, un tipus de cèl·lules vitel·lines properes a les cèl·lules resultants de la divisió (cèl·lules vitel·lines de tipus II) es fusionen formant un sincici vitel·lí. Segueix la segmentació i es produeixen més blastòmers que perden

el contacte entre ells i migren dins del sincici; no s'observa en cap moment un patró de segmentació semblant al d'altres animals espirals. Les cèl·lules vitel·lines més allunyades del zigot (cèl·lules vitel·lines de tipus I) es mantenen intactes i seran ingerides en estadis posteriors.

**2) Estadi 2:** un grup de blastòmers es mou cap un extrem del sincici i forma el primordi de la faringe i l'epidermis embrionàries. Es produeix la diferenciació de cèl·lules de l'epidermis embrionària (o primària) dins del primordi i en regions perifèriques. Aquestes s'estenen per la superfície del sincici fins que l'embolcallen del tot; mentre dura el procés, les cèl·lules vitel·lines de tipus II es poden continuar fusionant en zones no recobertes. Al final de l'estadi, l'epidermis embrionària és cel·lular, multiciliada i està assentada sobre una membrana basal. Paral·lelament també es diferencia la faringe embrionària i apareix la cavitat de l'intestí embrionari al seu extrem interior. Finalment, al pol oposat d'on es troba aquest òrgan es desenvolupen unes cèl·lules multipolars molt ramificades anomenades cèl·lules estrella.



**Figura 18. Desenvolupament embrionari de *Schmidtea polychroa*.** S'hi mostra una imatge representativa dels 8 estadis i una idealització d'una secció interna de cada un d'ells. La posició de la faringe embrionària i del primordi de la faringe definitiva a l'estadi 5 segueix les descripcions de Martín-Durán i col·laboradors



(2010), i Martín-Durán i Romero (2011). Els dibuixos de l'estadi 5 i posteriors presenten una visió lateral de l'embrió on l'anterior és a l'esquerra del dibuix i el dorsal a la part superior; els embrions d'estadi 1-4 no tenen una veritable axialitat i s'organitzen en un patró similar al radial, amb la faringe embrionària com a principal punt de referència. b, blastòmer; bg, banda germinal; bo, boca; ce, cèl·lula estrella; cg, cèl·lula gastrodèrmica; cm, cèl·lula muscular; cnp, cordons nerviosos pioners; co, coberta de l'ou; cv, cèl·lula vitel·lina; cvl, cèl·lula vitel·lina de tipus I; cvll, cèl·lula vitel·lina de tipus II; ed, epidermis definitiva; ee, epidermis embrionària; fd, faringe definitiva; fe, faringe embrionària; ga, gastrodermis anterior; gd, gastrodermis; gp, gastrodermis posterior; ie, intestí embrionari; mc, musculatura corporal; pa, parènquima; pc, primordi del cervell; pn, precursors nerviosos; pfe, primordi de la faringe embrionària; snc, sistema nerviós central; sv, sincici vitel·lí; u, ull; zi, zigot. Escala de les barres: totes menys la imatge de l'estadi 2 i 8, 500µm; estadi 2, 250µm; estadi 8 i Juvenil, 1mm.

**3) Estadi 3:** S'obre la cavitat de l'intestí embrionari i l'embrió comença a incorporar-hi cèl·lules vitel·lines de tipus I mitjançant contraccions rítmiques de la faringe embrionària. S'acumula un número creixent de cèl·lules vitel·lines a l'intestí i, com a conseqüència, el sincici vitel·lí amb els blastòmers indiferenciats -a partir d'ara cèl·lules embrionàries- es deforma i acaba constituint una capa, la banda germinal, que es troba limitada per l'epidermis embrionària en la seva part externa i per l'intestí en la interna. L'embrió també creix de mida i adoptant una forma esfèrica. Les cèl·lules estrella es desplacen a regions properes a l'intestí i el material nutricional ingerit.

**4) Estadi 4:** Acaba la ingesta de les cèl·lules vitel·lines i es tanca l'obertura de la faringe embrionària. Es diferencien dos cordons nerviosos pioners a la futura zona ventral de l'embrió i presumptives cèl·lules de la gastrodermis plenes de material nutricional a la superfície de la cavitat intestinal. La faringe embrionària adopta una posició posterior-ventral. Augmenta la taxa de proliferació de les cèl·lules embrionàries de la banda germinal.

**5) Estadi 5:** Es desorganitza el remanent del sincici vitel·lí i les cèl·lules embrionàries s'empaqueten i comencen a formar el parènquima definitiu amb els òrgans i teixits finals. S'inicia la diferenciació massiva dels principals tipus cel·lulars: trobem cèl·lules de l'epidermis, musculars, de la gastrodermis, dels protonefridis, i també els primers precursors neuronals. L'embrió adopta una forma de disc aplanat dorsoventralment; aquest canvi és conseqüència de l'acció de les cèl·lules musculars, entre d'altres factors. Els precursors neuronals es formen al voltant dels cordons nerviosos pioners que continuen en posició ventral. El primordi de la faringe definitiva es constitueix en una posició posterior a la faringe embrionària en degeneració.

**6) Estadi 6:** L'embrió es continua aplanant dorsoventralment i es comença a allargar en l'eix anteroposterior, i s'inicia l'organogènesi de les estructures definitives. Les cèl·lules musculars s'organitzen en un patró ortogonal, apareixen els cordons nerviosos ventrals i laterals, i es forma el primordi del cervell a la regió anterior de l'embrió. Deixen d'observar-se la faringe embrionària i els cordons nerviosos pioners. L'epidermis definitiva reemplaça l'epidermis embrionària, i continua el desenvolupament de la faringe definitiva. Es dona la lisi de les cèl·lules vitel·lines ingerides i el material nutricional s'allibera a la cavitat digestiva. Les cèl·lules de la gastrodermis es situen al voltant del vitel i comencen a diferenciar-se les rames posteriors del digestiu.

**7) Estadi 7:** Es desenvolupen les cèl·lules pigmentàries de l'ull sota l'epidermis de la regió anterior-dorsal i es dona la maduració dels sistema nerviós central. Els dos hemisferis del cervell es condensen definitivament sobre els condons nerviosos ventrals. La faringe definitiva es trasllada a una posició central i es defineixen la rama anterior i les dues rames posteriors del digestiu. La gastrodermis adquireix una organització epitelial i es comencen a formar els diverticles digestius amb l'ajut d'extensions laterals del parènquima i de fibres musculars dorsoventrals. Les cèl·lules de l'epidermis definitiva adopten un perfil vertical i s'estructuren en una palissada.

**8) Estadi 8:** S'adopta la forma corporal típica i es dona la maduració final dels òrgans principals. La faringe contacta amb l'exterior a través de la boca. L'embrió comença a adquirir la pigmentació fosca del juvenil, i els ulls adopten la morfologia normal i es connecten amb el sistema nerviós central. Disminueix la quantitat de vitel present a la gastrodermis.

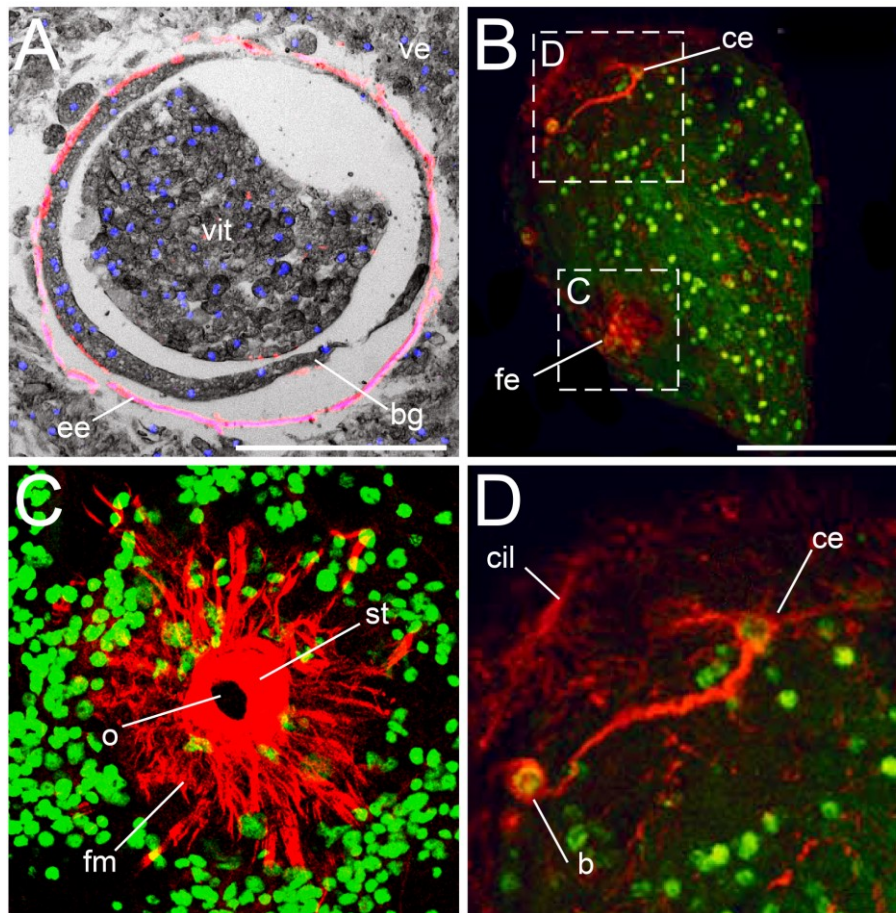
L'embriogènesi finalitza amb l'eclosió del juvenil al medi. El juvenil es diferencia de l'adult perquè és d'una mida menor, té una pigmentació més clara, i no presenta òrgans sexuals ni ha desenvolupat del tot el sistema digestiu, que es troba encara parcialment farcit de substàncies vitel·lines.

#### **2.4.2 L'estadi larvari**

S'ha proposat que els estadis primerencs de l'embriogènesi de les planàries poden representar un estadi de larva intracapsular, és a dir, una larva tancada a l'interior de la càpsula embrionària (Cardona i altres, 2006). La presència d'aquesta larva s'associa amb la diferenciació dels òrgans transitoris; així, la formació d'una epidermis i intestí embrionaris, de les cèl·lules estrella i de la faringe embrionària amb els seus components muscular, nerviós, epidèrmic i glandular dota l'embrió primerenc de l'autonomia necessària per dur a terme la seva funció, que és la d'ingerir les substàncies nutrients que l'envolten (Figura 19A-D). La incorporació d'aquestes substàncies és essencial i necessària pel posterior desenvolupament de l'animal. El procés d'ingesta es veu facilitat per la capacitat de moviment que atorga la ciliació de l'epidermis i les cèl·lules estrella, que són interpretades com un rudiment del sistema nerviós que controla el batec del cilis. A la banda germinal de la larva hi trobem cèl·lules embrionàries en un estat indiferenciat i proliferatiu; aquestes participaran, un cop finalitzi l'alimentació, en el desenvolupament dels primordis dels òrgans del juvenil. En aquest moment també s'inicia la degeneració i desaparició de les estructures embrionàries. La larva intracapsular té, per tant, una naturalesa transitòria i la seva substitució per l'embrió definitiu recorda una metamorfosi.

L'existència d'un estadi larvari en el desenvolupament de la planària es pot explicar mitjançant dues hipòtesis evolutives diferents: (i) és un vestigi d'una vertadera larva de vida lliure que hauria estat present en l'ancestre comú a tots els triclads. Aquesta hipòtesi es basa sobre tot en el fet de que en altres grups d'animals com ara els policlads, propers filogenèticament al triclads, també s'observa la progressiva encapsulació d'aquest estadi. (ii) és una adaptació a la cohabitació de diversos embrions tancats en un espai que conté un

número limitat de recursos. En aquesta hipòtesi és determinant la selecció positiva d'aquells embrions preparats per captar l'aliment de la manera més ràpida i eficient possible.



**Figura 19. Anatomia de l'embrió d'estadi 2-3.** **A** Immunotinció fluorescent específica de l'epidermis embrionària amb l'anticòs monoclonal EpEmb (en vermell); nuclis contrastats amb el marcador fluorescent DAPI (en blau). **B i D** Immunotincions fluorescentes amb l'anticòs anti-tubulina tirosinada (en vermell); nuclis contrastats amb el marcador fluorescent Sytox (en verd). L'anticòs detecta les cèl·lules estrella, blastòmers de la banda germinal, la faringe embrionària i els cilis de l'epidermis embrionària (imatges modificades de Cardona i altres, 2006). **C** Tinció de la faringe embrionària amb fal·loïdina fluorescent; nuclis contrastats amb DAPI (en verd). En aquest estadi la faringe està integrada per una regió tubular ben desenvolupada que obre a l'exterior, i per fibres musculars radials i circulars que ancoren l'òrgan a la superfície. b, blastòmer; bg, banda germinal; ce, cèl·lula estrella; cil, cilis de l'epidermis; ee, epidermis embrionària; fe, faringe embrionària; fm, fibres musculars de la faringe; o, obertura de la faringe; st, secció tubular de la faringe; ve, cèl·lules vitel·lines externes; vit, cèl·lules vitel·lines ingerides. escala de barres, 125 $\mu$ m.

### 2.4.3 Formació del sistema nerviós i dels ulls durant l'embriogènesi

Els detalls del desenvolupament del sistema nerviós i els ulls en embrions de planàries són poc coneguts i es basen, de nou, en les descripcions morfològiques de Le Moigne (1963, 1966), i els anàlisis amb anticossos comercials de Cardona i col·laboradors (2005b, 2006). Ambdós autors coincideixen en assenyalar la formació dels òrgans definitius de manera difusa a la zona ventral de la banda germinal de l'estadi 5 però difereixen en la seva interpretació de la morfogènesi inicial del SNC.

Així, segons Le Moigne, el sistema nerviós es desenvolupa a partir de cèl·lules embrionàries que es concentren sobre tot en la futura regió ventral-anterior; la seva diferenciació s'observa en paral·lel a l'organització de les tres branques de l'intestí i l'aparició de la faringe definitiva, que defineix el pol posterior. Inicialment, les cèl·lules nervioses són arrodonides i es concentren en dos ganglis cefàlics anteriors, però a l'estadi 6 desenvolupen les primeres fibres nervioses i es distingeixen per primer cop els cordons nerviosos ventrals, que progressen en un patró anteroposterior. Els ulls es comencen a desenvolupar entre l'estadi 6 i 7, quan els cordons han cobert entre un terç i la meitat de la superfície de l'embrió, i acaben la seva maduració abans de l'eclosió del juvenil. A l'estadi 7, el cervell i els cordons ventrals també adopten la forma definitiva i s'estableixen les commissures transversals típiques d'aquests òrgans.

Els resultats de Cardona i col·laboradors (2005b, 2006) suggereixen la formació de dos sistemes nerviosos independents durant l'embriogènesi:

**El sistema nerviós primari**, present durant les etapes inicials del desenvolupament i compost per les cèl·lules estrella, immunopositives per anticossos contra la tubulina tirosinada i acetilada, i el neurotransmissor serotonina. Com hem vist, les cèl·lules estrella apareixen per primer cop en embrions d'estadi 2 i es situen a l'extrem oposat de la faringe embrionària, en una posició entre l'epidermis embrionària i la superfície del sincici vitel·lí. Estenen quatre axons principals, dels quals tres són prims i semblen contactar amb alguns blastòmers, i el quart, que és més gruixut, es projecta cap a l'epidermis embrionària. A l'estadi 3, es desplacen a regions més laterals i properes a l'intestí embrionari i el material nutricional ingerit. En aquest estadi també augmenta el seu embrancament, i poden desenvolupar fins a 20 axons principals que cobreixen entre un terç i la meitat de la superfície del vitel·lí. Aquesta distribució es manté en embrions d'estadi 4 i desapareixen a l'estadi 5. La immunoreactivitat, morfologia i distribució de les cèl·lules estrella suggereix, segons Cardona i col·laboradors, una funció associada amb la motilitat i la ingesta de les cèl·lules vitel·lines en l'embrió transitori.

**El sistema nerviós definitiu**, que comença a desenvolupar-se a partir de l'estadi 5 i que es forma en associació amb dos cordons nerviosos pioners immunopositius per tubulina acetilada. Aquests estan presents durant els estadis 3-5 i s'estenen des de la proximitat de la faringe embrionària fins a l'extrem oposat de l'embrió i demarquen la futura regió ventral. Inicialment són molt prims, però durant l'estadi 5 pateixen un engruiximent degut a l'agregació de precursors neurals en la seva superfície. Durant l'estadi 6 els precursors estableixen el primordi del sistema nerviós definitiu que conté els cordons nerviosos ventrals i els ganglis del cervell en desenvolupament. A finals de l'estadi 5 també es comencen a formar les cèl·lules sensorials del marge de l'embrió. Finalment, a partir de l'estadi 6 la morfogènesi del sistema nerviós segueix una pauta similar a la que descriu Le Moigne (1963, 1966).

A més, al final de l'estadi 6 es fa obvia la diferenciació dels ulls a la regió dorsal-anterior, per sobre del cervell. En aquest estadi estan formats per unes poques cèl·lules pigmentàries que envolten els fotoreceptors i es troben immersos en el parènquima. A mesura que l'embrió s'allarga i adquireix la morfologia definitiva els ulls s'aproximen entre ells i s'estableixen en una posició definitiva sobre els ganglis del cervell.

## 2.5 Regeneració

Les planàries d'aigua dolça s'han estudiat clàssicament per la seva sorprenent capacitat de regenerar regions corporals senceres després d'una ferida i durant la reproducció asexual: gairebé qualsevol fragment, sense importar el pla d'amputació, pot desenvolupar en uns pocs dies en un individu nou i complet que serà més petit del que prové d'inici. La capacitat de regeneració, però, no és igual en tots els grups de planàries que es coneixen i, per exemple, algunes espècies com *S. mediterranea* o *D. japonica* s'ajusten a aquella norma que diu que són "almost to be called immortal under the edge of the knife", és a dir, gairebé immortals (Dalyell, 1814), mentre que d'altres com *Bdelloura candida* o les que pertanyen als gèneres *Dendrocoelopsis* i *Dendrocoelum* tenen dificultats per regenerar amb normalitat la seva regió anterior (Egger i altres, 2007). A més, l'estadi adult de les planàries també pot recanviar sense parar les cèl·lules envellides de tots els òrgans quan es troba en repòs (Handberg-Thorsager i altres, 2008), i créixer o decreixer en funció de la disponibilitat d'aliment (Romero i Baguñà, 1981; Romero i Baguñà, 1991).

La extraordinària plasticitat de les planàries depèn en gran mesura d'una població de cèl·lules mare anomenades neoblasts, i de senyals reguladores de la identitat i el posicionament de la seva progènie (Handberg-Thorsager i altres, 2008; Shibata i altres, 2010; Baguñà 2012; Rink, 2013). Els neoblasts es divideixen activament i són totipotents, i, per tant, poden diferenciar-se en tots els tipus cel·lulars de l'animal, incloent-hi les cèl·lules de la línia germinal (Baguñà i altres, 1989). De fet, experimentalment s'ha vist que al menys una població dels neoblasts, els anomenats cNeoblast, són pluripotents *in vivo* (Wagner i altres, 2011). Morfològicament es caracteritzen per ser de mida petita -entre 5 i 13 µm de diàmetre cel·lular-, tenir una relació nucli/citoplasma elevada i la cromatina del nucli en estat lax, i presentar pocs orgànuls al citoplasma (Morita i altres, 1969). Mostren, a més, uns grànuls electrodensos anomenats cossos cromatoids a la perifèria del nucli que estan formats per ARN i proteïnes (Coward, 1974; Hori, 1982; Morita i Best 1984; Morita i altres, 1969; Auladell i altres, 1993), i que s'han interpretat com un centre de regulació postranscripcional del ARN. Aquestes estructures disminueixen de mida i número durant la diferenciació dels neoblasts (Coward, 1974; Auladell i altres, 1993; Hori i Kishida, 2003).

Els neoblasts es troben distribuïts pel parènquima al llarg de l'animal amb l'excepció de la faringe i la regió anterior dels (Newmark i Sánchez Alvarado, 2000; Forsthoefel i altres, 2011), i representen entre un 20 i un 30% del número total de cèl·lules (Baguñà i Romero, 1981). Es poden visualitzar amb marcadors moleculars com els anticossos específics de cèl·lules en divisió anti-histona 3 fosforilada (H3P; Newmark i Sánchez Alvarado, 2000) i anti-antigen nuclear de proliferació cel·lular (PCNA; Orii i altres, 2005), o amb sondes per gens d'expressió en neoblasts -p. e. homòlegs de *piwi*, *h2b* o *vasa* (Reddien i altres, 2005; Handberg-Thorsager i altres, 2008; Rink, 2013)- o en subpoblacions de descendents postmitòtics -p. e. *NB.21.11e* i *AGAT-1* (Eisenhoffer i altres, 2008)

### 2.5.1 El procés de la regeneració

La regeneració de les planàries segueix un model que combina mecanismes morfogenètics d'epimorfosi i de morfol·laxi (Saló i Bagunyà, 1984). El concepte d'epimorfosi implica la regeneració mitjançant proliferació cel·lular, mentre que la morfol·laxi fa referència a la capacitat de remodelar parts dels cos preexistents per crear nous teixits. En les planàries es dona una primera resposta morfolàctica que serveix per ajustar el valor posicional de les estructures que s'han de formar a la regió on hi ha hagut l'amputació, i una segona que s'esdevé en tot l'organisme i que permet acomodar les proporcions corporals dels òrgans i de les regions corporals a la mida final. Per una altra banda, la formació d'un blastema de regeneració a partir del qual es diferenciaran *de novo* els òrgans perduts per part de cèl·lules descendents dels neoblasts és la principal resposta epimòrfica que té lloc durant la regeneració. Les planàries també poden regenerar per mecanismes d'intercalació quan dos fragments d'individus diferents s'enfronten cara a cara; en aquest cas, la regió que manca es forma des d'un blastema intercalat que es diferencia a la zona que s'empelta (Handberg-Thorsager i altres, 2008).

El procés de regeneració s'ha descrit com una seqüència constant de quatre esdeveniments: el tancament de la ferida, la formació del blastema, la determinació i diferenciació de les noves estructures, i, finalment, el restabliment del patró corporal (Handberg-Thorsager i altres, 2008).

**1) El tancament de la ferida:** És una resposta ràpida que busca minimitzar el dany i la pèrdua de teixit. En els primers minuts es contrau la musculatura subepitelial del voltant de la zona malmesa i es secreta una capa de moc que la protegeix de l'atac d'agents patògens externs (Reisinger i Kelbetz, 1964; Chandebais, 1980; Cebrià i altres, 1997). Com a conseqüència, l'epidermis ventral i dorsal s'estenen, contacten entre elles i acaben formant un epiteli que recobreix la lesió i que s'aprima quan, més endavant, la musculatura es relaxa (Chandebais, 1979; Chandebais, 1980). A les 6 hores es produeix un primer pic de proliferació dels neoblasts que es seguit per un decreixement general del nombre de cèl·lules en divisió en les hores posteriors. El màxim de proliferació té lloc de manera sistèmica al llarg l'animal i per activar-lo n'és suficient una petita incisió a la superfície (Wenemoser i Reddien, 2010). Entre les 1-4 hores també es dona un increment de la mort cel·lular que, en aquest cas, es concentra en regions pròximes a la ferida i que pot estar induït pel mecanisme de tancament i la formació del blastema (Pelletieri i altres, 2010).

**2) Formació del blastema:** A les 18 hores, coincidint amb un mínim en la taxa de proliferació, es produeix una acumulació de neoblasts sota l'epiteli que, a les 24 hores, generen un segon pic mitòtic (Wenemoser i Reddien, 2010). Contràriament amb el que passava amb el primer pic, aquesta resposta és local i només s'observa quan hi ha pèrdua d'alguna estructura. Llavors la progènie d'aquests neoblasts migra i forma el blastema de regeneració a l'espai que es troba entre l'epiteli i l'aglomeració de cèl·lules mare. Per tant, dins del blastema s'hi troben cèl·lules en diferenciació, i, ocasionalment, algunes cèl·lules en divisió a la regió més posterior (Wenemoser i Reddien, 2010). En els dies següents aquest teixit creix exponencialment per la incorporació de més cèl·lules des del post-blastema.

**3 i 4) Determinació, diferenciació i restabliment del patró corporal:** L'adquisició del patró a la regió del blastema permet la correcta distribució de la descendència dels neoblasts en els eixos de coordenades de l'animal i, per tant, dins dels òrgans que s'han de regenerar. És també un procés ràpid que té lloc poc després del tancament de la ferida: ocorre durant les primeres 24 hores en el cas de la regeneració d'un cap i a les 36 hores per la faringe (Handberg-Thorsager i altres, 2008). Alguns estudis suggereixen que cèl·lules diferenciades hi juguen un paper important, ja que planàries que no disposen de neoblasts retenen les senyals d'identitat dorsal i ventral capaces d'induir una resposta morfogènica (Kato i altres, 2001). Aquesta hipòtesi s'ha vist reforçada amb un altre treball que demostra que cèl·lules musculars de la capa subepidèrmica expressen constitutivament diversos gens de control posicional, és a dir, gens que pertanyen a vies de senyalització evolutivament conservades com la Wnt canònica i TGF- $\beta$  que regulen la identitat axial durant el desenvolupament (Witchley i altres, 2013).

Els primers signes de diferenciació dins del blastema es comencen a observar a partir de les 24-48 hores, depenent de l'espècie i de la mida del fragment o de la temperatura. A *S. mediterranea*, i de manera molt semblant a *S. polychroa*, es detecten cèl·lules nervioses del cervell dins d'un blastema anterior de regeneració als dos dies de l'amputació i es visualitzen els ulls a la regió dorsal als tres dies (Cebrià, 2007). El procés de diferenciació ve acompanyat d'un segon pic en la mort cel·lular que s'associa amb la remodelació dels teixits preexistents i que és necessari per a integrar les noves estructures i adaptar la mida del nou individu (Pelletieri i altres, 2010). Es pot considerar que la regeneració dels òrgans és completa als 7-10 dies, però el procés d'ajust a les noves dimensions encara pot durar algunes setmanes més.

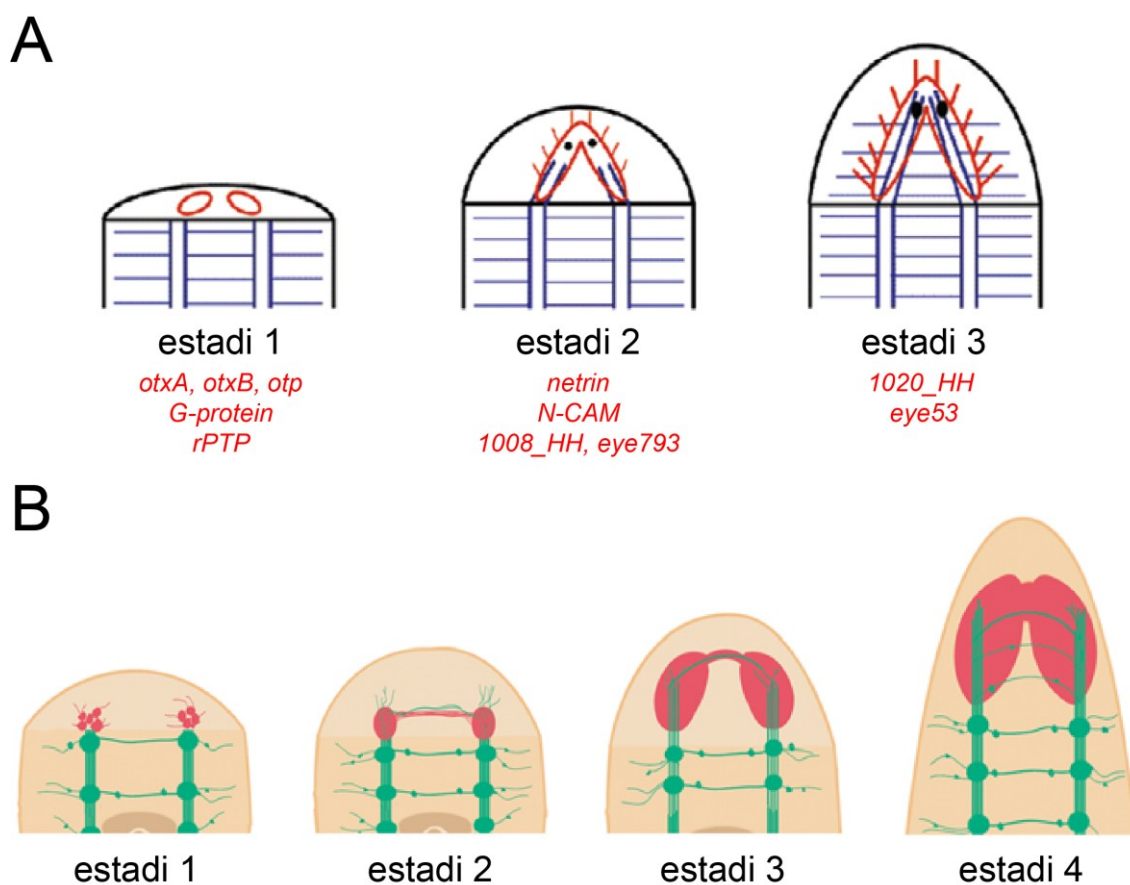
### **2.5.2 Regeneració del sistema nerviós i dels ulls**

Les planàries són també un sistema molt atractiu per estudiar el desenvolupament del SNC ja que poden regenerar-ne qualsevol òrgan -fins i tot el cervell- després d'un traumatisme. De fet, aquesta àrea de treball ha estat una de les més fructíferes pel que respecta als estudis cel·lulars i moleculars amb diverses espècies de planària. Així, les dinàmiques del procés de regeneració del sistema nerviós foren sistematitzades per Reuter i col·laboradors (1996), però treballs posteriors n'han refinat el model que proposaren aquells autors (Cebrià i altres, 2002c; Agata i Umesono, 2008; Fraguas i altres 2012).

Reuter i col·laboradors (1996) estudiaren sobre tot la regeneració dels ganglis cefàlics de l'espècie de planària *Dugesia tigrina* per a la qual n'observaren dues fases clarament diferenciades: una primera fase als dies 1 i 2 després de l'amputació que es caracteritza pel creixement cap a la regió del blastema de projeccions dels cordons nerviosos a partir dels quals s'establirà la futura comissura anterior del cervell; i una segona fase entre els dies 3 i 5 de regeneració en que apareixen neurones de nova formació per davant d'aquella comissura que, més tard, fasciculen amb els cordons truncats per desenvolupar un cervell nou. Les seves observacions, però, es donaren amb metodologies que no permetien visualitzar els moments inicials de la regeneració. Alguns anys més tard, Cebrià i col·laboradors (2002c)



defineixen un nou model de regeneració anterior a *Dugesia japonica* basant-se principalment en l'anàlisi de l'expressió de gens neurals. El seu model contempla un estadi més que el de Reuter i col·laboradors, i destaca per la identificació després de 24 hores de la lesió d'una primordi del cervell bilateral que es troba aïllat dels cordons preexistents a dins del blastema (Figura 20A-estadi 1). En una etapa més tardana es dona la connexió entre aquests dos òrgans, es produeix el creixement i la regionalització del cervell (Figura 20A-estadi 2), i finalment, entre els 4 i 5 dies, té lloc la morfogènesi definitiva que culmina amb la recuperació de la funcionalitat del sistema nerviós (Figura 20A-estadi 3). Per últim, Fraguas i col·laboradors (2012) han hipotetitzat recentment un tercer model a *Schmidtea mediterranea* que podríem definir com a mixt i en que es combinen algunes de les apreciacions dels dos models anteriors: així, com a Reuter i col·laboradors (1996), els autors suggereixen que el rudiment del cervell es diferencia amb una relació propera als cordons ventrals (Figura 20B-estadi 1), però a diferència d'aquells apunten que la comissura anterior s'estableix per projeccions que provenen tant dels ganglis cefàlics com dels cordons (Figura 20B-estadi 2). Aquests autors també demostren que la formació del cervell es depenent de la presència dels neoblasts, i descriuen amb un gran detall l'adquisició de la morfologia adulta del sistema nerviós a partir dels 4 dies de regeneració (Figura 20B-estadis 3 i 4).

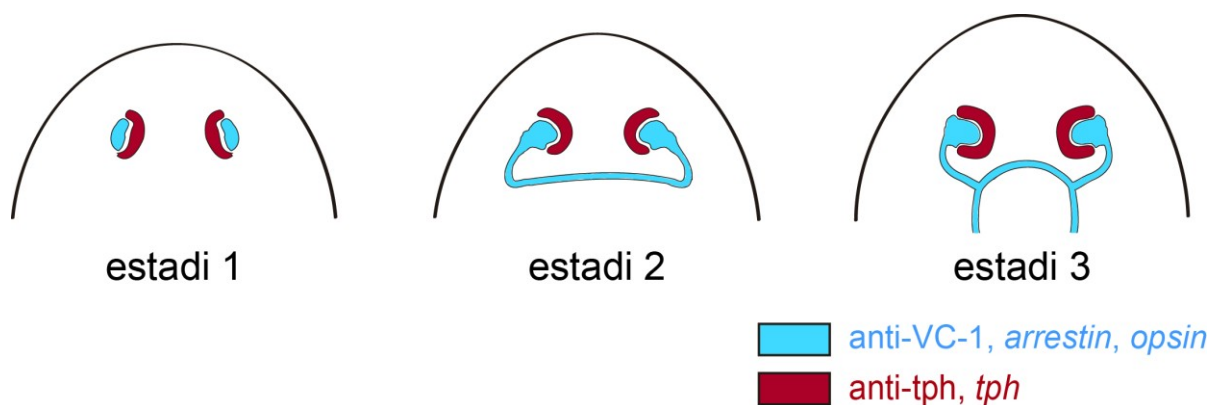


**Figura 20. Models proposats de regeneració del sistema nerviós. A** Model esquemàtic de la regeneració dels sistema nerviós anterior segons l'expressió de gens específics neurals (modificat de Agata i Umesono, 2008). El temps d'activació d'aquests gens permet definir tres estadis: estadi 1 (1-2 dies de regeneració), formació al blastema del primordi del cervell; estadi 2 (2-3 dies de regeneració), establiment de la comissura



anterior del cervell des de projeccions dels ganglis i connexió amb els cordons ventrals; estadi 3 (4-5 dies del desenvolupament), recuperació de la morfologia normal. S'hi indiquen els ganglis cefàlics (en vermell) i els cordons nerviosos ventrals (en blau), així com els gens d'expressió en cada estadi (en vermell i a sota de cada dibuix). **B** Model esquemàtic de la regeneració dels sistema nerviós anterior amb 4 estadis segons la immunohistoquímica amb anticossos neurals (modificat de Fraguas i altres, 2012). Estadi 1 (1-2 dies de regeneració), formació al voltant dels cordons truncats del primordi del cervell; estadi 2 (2-3 dies de regeneració), establiment de la comissura anterior del cervell des de fibres contralaterals del ganglis cefàlics i els cordons ventrals, i creixement d'aquests per davant dels ganglis; estadi 3 (4 dies del desenvolupament), consolidació de l'estructura esponjosa típica del cervell; estadi 4 (7 dies del desenvolupament), sistema nerviós definitiu. S'hi indiquen els ganglis cefàlics (en vermell) i els cordons nerviosos ventrals (en verd). Tots els dibuixos mostren una representació de la regió anterior-ventral d'un animal regenerant on l'anterior és a la part superior del dibuix.

*D. japonica* també ha estat objecte d'investigacions sobre el mode de desenvolupament dels òrgans visuals (Inoue i altres, 2004; Takeda i altres, 2009). Aquest procés s'inicia una mica més tard que el del sistema nerviós i es separa en tres esdeveniments principals: la formació de dos clústers visuals amb cèl·lules pigmentàries i fotoreceptores a la regió del blastema cefàlic als 2 dies de regeneració (Figura 21-estadi 1); la unió dels dos clústers amb axons que creixen contralaterals des les cèl·lules fotoreceptores als 3 dies de regeneració (Figura 21-estadi 2); i el restabliment de la connexió de l'òrgan amb la part més anterior del cervell als 4 dies de regeneració (Figura 21-estadi 3). L'organogènesi dels ulls, però, continua durant alguns dies més i no és fins a partir del cinquè dia quan s'observa el restabliment de la fototaxi negativa a l'animal.



**Figura 21. Regeneració dels ulls.** Model en tres estadis proposat per Inoue i col·laboradors (2004); els estadis 1, 2 i 3 es corresponen, respectivament, amb els dies 2, 3 i 4-5 de regeneració. La funcionalitat completa dels sistema visual es recupera als 5 dies de regeneració. S'hi indiquen les cèl·lules fotoreceptores (en blau) i les pigmentàries (en vermell), així com els marcadors amb que es poden detectar els dos tipus cel·lulars (mateix codi de color). Els tres dibuixos mostren una representació de la regió anterior-dorsal d'un animal regenerant on l'anterior és a la part superior del dibuix.

### 2.5.3 Mecanismes moleculars que regulen la regeneració del sistema nerviós i visual

Durant més de 200 anys, des de que Peter Simon Pallas descobrí el fenomen de la regeneració en l'espècie de trícilad *Fasciola punctata* (Pallas, 1774), els processos

responsables de la regeneració han estat caracteritzats amb metodologies clàssiques com les amputacions parcials o totals del cos, els transplants de fragments d'un animal a un altre, l'eliminació de les poblacions de neoblasts amb la irradiació de raigs X o l'observació de preparacions histològiques dels teixits (Baguña, 2012). En les últimes dècades les planàries s'han establert com un sistema de referència per a l'estudi genètic de la regeneració gràcies a que se n'han generat bases de dades genòmiques i proteòmiques per a les espècies model *Dugesia japonica* i *Schmidtea mediterranea* (Robb i altres, 2008; Abril i altres, 2010; Adamidi i altres, 2011; Fernández-Taboada i altres, 2011; Bocchinfuso i altres, 2012; Nishimura i altres, 2012; Böser i altres, 2013), i a que s'hi han optimitzat tècniques bàsiques en biologia molecular i cel·lular com la detecció específica de l'expressió gènica amb hibridacions *in situ* (Umesono i altres, 1997), la detecció de proteïnes mitjançant la immunohistoquímica amb anticossos monoclonals i policlonals (Bueno i altres, 1997; Robb i Sánchez Alvarado, 2002), el marcatge dels neoblasts i la seva descendència amb la bromodeoxiuridina (o BrdU), un anàleg fluorescent de la timidina que s'incorpora *in vivo* en el moment de la replicació del DNA (Newmark i Sánchez Alvarado, 2000), la detecció de la mort cel·lular amb el mètode del "terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling" (TUNEL; Pelletieri i altres, 2010) i l'aïllament de diferents poblacions cel·lulars en funció del seu contingut de DNA amb la citometria de flux (Asami i altres, 2002; Hayashi i altres, 2006). A més, el silenciament específic amb RNA d'interferència (o RNAi) ha permès estudiar la funció de gens que regulen la seva biologia (Sánchez Alvarado i Newmark, 1999; Newmark i altres, 2003; Orii i altres, 2003).

Amb aquests mètodes s'han identificat diversos gens necessaris per la correcta diferenciació del sistema nerviós a les planàries; aquests es poden agrupar en:

**Gens que afecten la identitat de la regió o el patró del sistema nerviós:** encara no està clar quines són les senyals que influencien l'adopció de destinacions cel·lulars nervioses, però les senyals de la polaritat probablement hi juguen un paper destacat. Per exemple, molts dels gens que regulen la formació del pol anterior també provoquen un efecte secundari de fallada de la regeneració del cervell i dels ulls, mentre que la pèrdua de senyals del pol posterior provoca l'expansió o la duplicació d'aquests òrgans (Gurley i altres, 2008; Iglesias i altres, 2008; Petersen i Reddien, 2008; Adell i altres, 2009). Així, s'ha demostrat que la via Wnt canònica, o  $\beta$ -*catenin*-depenent, imprescindible en els metazous per formar un patró anteroposterior durant l'embriogènesi (Niehrs, 2010), i la via Hedgehog tenen funcions conservades en la determinació d'aquest eix en les planàries adultes (Forsthoefel i Newmark, 2009; Reddien, 2011; Almuedo-Castillo i altres, 2012). També s'ha posat de manifest que altres factors com els nivells de calci (Nogi i altres, 2009; Beane i altres, 2011; Zhang i altres, 2011), la comunicació intercel·lular mitjançant unions gap (Oviedo i altres, 2010), o gens no pertanyents a aquelles vies com *prep*, un cofactor dels gens *Hox* (Felix i Aboobaker, 2010), o *FoxD*, un factor de transcripció de la família *Forkhead* (Scimone i altres, 2014b), controlen la regeneració anteroposterior. En canvi, la polaritat dorsoventral sembla dependre només d'un organitzador format per elements de la via TGF- $\beta$  (Gaviño i Reddien, 2011; Molina i altres, 2011). La molècula clau d'aquest circuit és el lligand *bmp* que promou, com en altres invertebrats (Niehrs, 2010), la identitat dorsal i inhibeix la formació d'estructures ventrals (Orii i

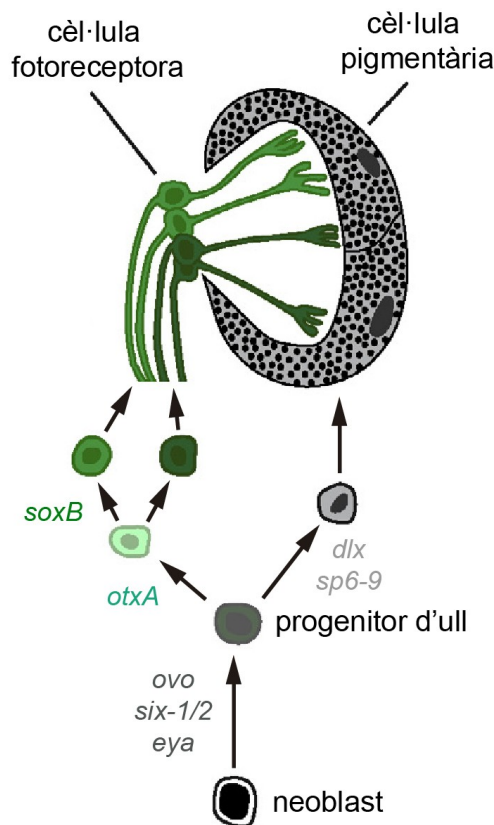
Watanabe; 2007; Reddien i altres, 2007; Molina i altres 2007; Molina i altres, 2011). Finalment, l'especificació de l'eix mediolateral s'ha relacionat amb l'actuació de *slit*, una glicoproteïna extracel·lular (Cebrià i altres, 2007), i amb alguns gens de la família Wnt (Adell i altres, 2009; Gurley i altres, 2010; Almuedo-Castillo i altres 2011) i de la via TGF- $\beta$  (Gaviño i Reddien, 2011).

En canvi, altres factors intervenen exclusivament en l'establiment del patró del sistema nerviós i cervell, i la seva funció es pot dissociar d'un efecte més ampli en la formació dels pols de l'animal. En aquest context *nou darake*, un receptor semblant a un FGF que no s'havia descrit amb anterioritat en cap altre organisme, restringeixen la formació del cervell al cap de l'animal, (Cebrià i altres, 2002a), i *wntA* en limita el creixement de la seva regió posterior durant la regeneració (Kobayashi i altres, 2007). També s'ha vist que gens ortòlegs de la família de *otx* i *otp* es detecten en un patró mediolateral en aquell òrgan (Umesono i altres, 1997; Umesono i altres, 1999). Malgrat això, es desconeix si factors conservats de la neurogènesi com els gens *Hox* o altres gens homeobox (p. e. *Gsx* o *six*) intervenen en el desenvolupament del sistema nerviós.

**Gens que controlen l'especificació de les cèl·lules nervioses:** les tècniques de seqüenciació massiva de nova generació combinades amb les irradiacions d'animals adults han servit per establir perfils transcripcionals dels neoblasts i, per tant, per identificar centenars de factors putativament responsables de la seva biologia (Rossi i altres, 2007; Eisenhoffer i altres, 2008; Friedländer i altres, 2009; Blythe i altres, 2010; Onal i altres, 2012; Solana i altres, 2012; Wagner i altres, 2012; Kao i altres, 2013; Rodríguez-Esteban i altres, 2015). En general podem distingir dues categories de gens reguladors dels neoblasts: la dels que són necessaris pel seu manteniment o l'expansió, i la dels que en controlen la sortida del cicle i permeten la correcta diferenciació (Shibata i altres, 2010; Rink, 2013; Scimone i altres, 2014a; Roberts-Galbraith i Newmark, 2015). A aquest segon grup pertanyen, entre d'altres, factors de transcripció d'expressió en subpoblacions de neoblasts que controlen el posterior desenvolupament de llinatges de neurones com *runt-1* (Wenemoser i altres, 2012), *follicistatin* (Roberts-Galbraith i Newmark, 2013), *lhx1/5-1* i *pitx* (Currie i altres, 2013; März i altres 2013), *klf* i *pax3/7* (Scimone i altres, 2014a), o diversos gens proneurals de la família dels bHLH (Cowles i altres, 2013; Cowles i altres 2014). El cas on s'ha estudiat més al detall aquesta mena de mecanismes moleculars és, però, durant la regeneració de l'ull. Lapan i Reddien (2011, 2012) complementen els treballs previs sobre aquesta temàtica de Pineda i col·laboradors (2000), i Mannini i col·laboradors (2004), i descriuen una xarxa gènica específica per la formació de l'òrgan durant la regeneració i l'homeòstasi (Figura 22). Controlant aquesta xarxa hi ha ortòlegs de *ovo*, *six* i *eya* que defineixen una única població de progenitors amb potencialitat per produir tant cèl·lules fotoreceptores com pigmentàries, i, per sota d'ells, hi ha factors de transcripció com *otxA*, *meis*, *foxQ2*, *sp6-9* i *dlx* que intervenen només en la producció d'un d'aquells tipus cel·lulars.

**Gens que controlen la diferenciació cel·lular durant les etapes tardanes de la regeneració nerviosa i/o la posterior supervivència de les neurones,** com aquells pertanyents a les molècules d'adhesió nervioses CAM i DSCAM (Fusaoka i altres, 2006), i de

la família de les *clathrin-heavy-chain* (Inoue i altres, 2007). En aquesta categoria també trobem els gens *tph* i *gad* que s'associen més específicament amb el desenvolupament de les subpoblacions de cèl·lules serotoninèrgiques i GABAèrgiques (Nishimura i altres, 2007b; Nishimura i altres, 2008b).



**Figura 22. Xarxa gènica d'especificació de l'ull.**

La xarxa està controlada al nivell més superior per *ovo*, *six-1/2* i *eya*, que s'expressen al progenitor comú de les cèl·lules de l'ull. En els estadis successius aquestes cèl·lules s'especialitzaran en les diferents poblacions de fotoreceptors (en verd) i les cèl·lules pigmentàries (en gris; modificat de Roberts-Galbraith i Newmark, 2015).

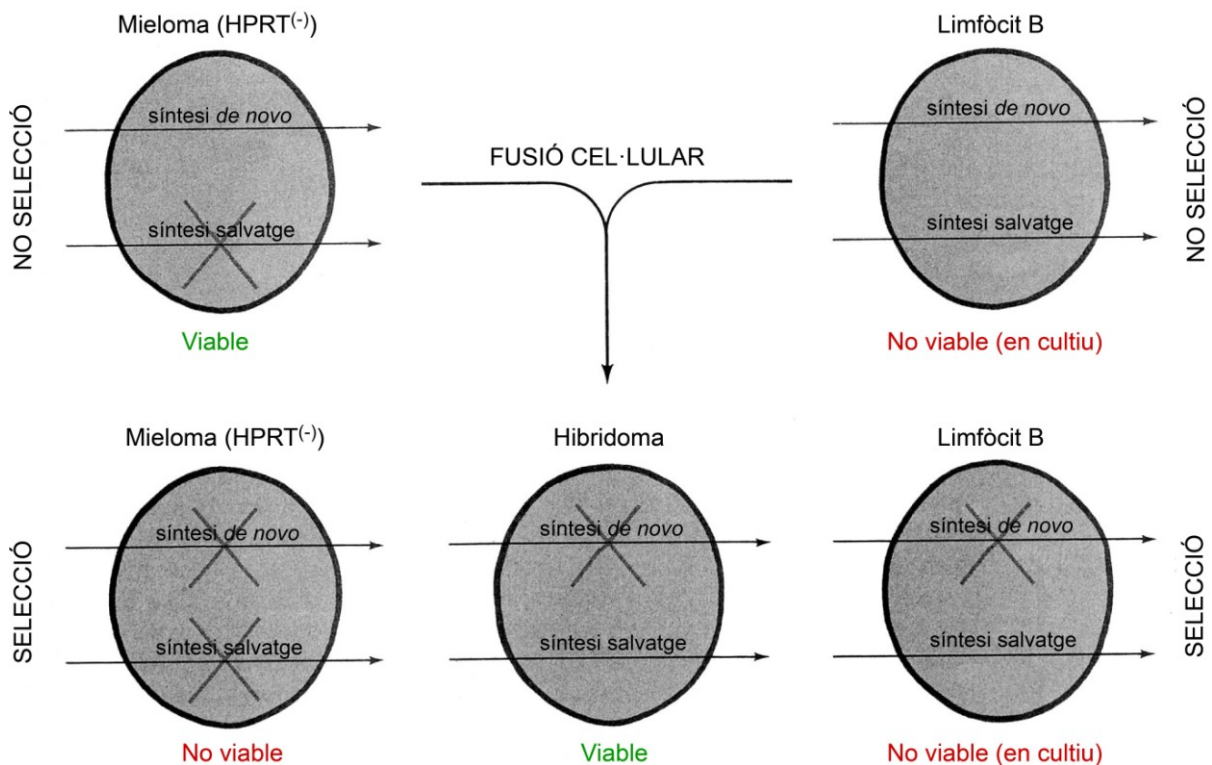
Per últim, hi ha els **gens que intervenen en la senyalització de la guia d'axons**, entre els quals hi destaca la família de les Netrins (Cebrià i Newmark, 2005), i les molècules *wnt5* i *slit* (Adell i altres, 2009; Gurley i altres, 2010; Almuedo-Castillo i altres 2011). A *S. mediterranea*, un receptor de les Netrins i el seu lligand són necessaris per mantenir l'arquitectura del sistema nerviós central i per dirigir els axons dels fotoreceptors al centre visual del cervell (Cebrià i Newmark, 2005). Per la seva banda, *wnt5* controla la connectivitat neural i la seva pèrdua de funció resulta en una expansió lateral dels òrgans nerviosos (Adell i altres, 2009; Gurley i altres, 2010; Almuedo-Castillo i altres 2011), i *slit* serveix com una senyal que prevé el creixement del CNS a la línia mitja (Cebrià i altres, 2007). S'ha proposat que aquestes dues molècules podrien actuar com a senyals repulsives que impedeixen la regeneració del sistema nerviós cap als dominis on són secretats (Gurley i altres, 2010; Almuedo-Castillo i altres 2011).

En resum, tots aquests treballs mostren que les planàries són un bon model per analitzar els mecanismes moleculars encarregats de la regeneració en metazous. Tot i així, encara falta molt per entendre absolutament alguns aspectes importants del procés. El desenvolupament de més eines metodològiques com la producció d'animals transgènics, el

cultiu estable de cèl·lules mare o la generació de més marcadors moleculars específics ha de permetre afrontar amb garanties aquest repte.

### 2.5.4 Els anticossos monoclonals i l'estudi de les planàries

Els anticossos són immunoglobulines secretades per cèl·lules especialitzades que s'han usat extensament com a marcadors moleculars en diferents organismes model degut a la seva rapidesa i facilitat d'aplicació, i a l'alt nivell de detall i resolució que se n'aconsegueix amb la tinció (Samoilovich i col., 2001, Drukker i col., 2007, Hofbauer i col., 2009, Hadwiger i col., 2010). Estan produïts de manera natural pels limfòcits B del sistema immune d'un animal en resposta a la presència de partícules estranyes, el antígens, però també es poden obtenir *in vitro* amb la generació dels hibridomes (Harlow i Lane, 1999). Els anticossos monoclonals (o mAbs) en particular són un tipus d'anticòs molt especialitzat capaç d'unir-se a una sola zona, o epítop, d'un antigen, i, per tant, suposen una eina molt preuada per als estudis moleculars del desenvolupament i la regeneració (Nelson i altres, 2000). La seva estructura molecular consta d'una o més subunitats en forma d'Y integrades per un parell de cadenes pesades i lleugeres en les quals es poden distingir dues zones diferenciades: un domini anomenat "Fab", que es correspon amb els braços terminals de la "Y", que és variable i està format per combinacions aleatòries de cadenes pesades i lleugeres, i que suposa el lloc d'unió a l'epítop; i un domini anomenat "Fc", que s'identifica amb el pal de la "Y", que consta de les zones més conservades de les cadenes pesades i que és per on es produirà la reacció de detecció del marcador.



**Figura 23.** En la fusió cel·lular es fusiona una cèl·lula mielòmica i un limfòcit B provinents de la mateixa soca animal amb l'ajuda d'un agent dissolvent de membranes, com el detergent Polietilenglicol; en cultiu

únicament les cèl·lules mielòmiques es mantenen viables (filera No Selecció). La selecció de les cèl·lules post-fusió es dona amb l'aplicació d'un medi de cultiu que conté aminopterina, una droga inhibidora de la ruta de síntesis *de novo* de nucleòtids purínics (Köhler i Milstein, 1975). Els híbridomes són els únics que poden sobreviure en aquest medi perquè incorporen dels limfòcits una ruta alternativa salvatge per produir aquestes molècules (filera Selecció). Posteriorment els híbridomes han de ser analitzats amb tècniques quantitatives i qualitatives per a la producció del mAb d'interès.

Idealment els mAB's es podrien obtenir amb el cultiu de la població de limfòcits B que els originen. El principal problema, però, és que aquestes cèl·lules moren al cap d'un temps ja que manquen la capacitat de proliferació. Per a resoldre aquest problema Köhler i Milstein (1975) van desenvolupar una tècnica per fusionar aquelles cèl·lules amb una soca mielòmica capaç de dividir-se "ad infinitum", de manera que acabaven obtenint línies immortals i productores d'anticòs en un mateix tipus cel·lular, l'híbridoma. El limfòcits B necessaris per a aquesta fusió provenien d'animals que havien estat prèviament hiperimmunitzats amb la proteïna (o proteïnes) desitjades (Figura 23). Aquests limfòcits, però, es trobaven barrejats amb d'altres que provenien de la immunitat natural de l'animal, i generaven híbridomes que no eren desitjables. Köhler i Milstein també van haver de desenvolupar un protocol de crivellatge per tal d'aïllar només aquelles poblacions d'interès.

L'obtenció dels mAb's és, per tant, un procés llarg i difícil. Malgrat això, en el grup del Dr. Romero s'han desenvolupat alguns projectes de generació de mAB's per a l'espècie de planària *Dugesia tigrina* que segueixen l'aproximació experimental proposada per Köhler i Milstein (Romero i altres, 1991; Bueno i altres, 1997). En aquests projectes s'hi ha utilitzat una barreja d'extractes proteics d'animals asexuals intactes i regenerants que ha permès construir una llibreria d'híbridomes productors d'anticossos contra diversos tipus cel·lulars, com per exemple l'anticòs TMUS-13 que, com s'ha vist al capítol de "Morfologia", és específic per cèl·lules musculars, o TCAV-1 que detecta un epítip present en les cèl·lules epitelials de la faringe. Altres marcadors d'aquella llibreria reconeixen teixits com la gastrodermis (p. e. TG-131) o regions corporals de l'animal (p. e. TCEN-49 o TNEX-59). Alguns dels anticossos han estat utilitzats posteriorment en estudis sobre la formació del patró, la determinació i la diferenciació en l'adult d'aquesta espècie (Bueno i altres, 1996; Cebrià i altres, 1997). De manera interessant, l'anàlisi de la seqüència de la proteïna reconeguda per un dels anticossos de tinció regional, el mAb TCEN-49, no mostra una clara homologia amb cap altre factor descrit, tot i que certs residus d'aminoàcids recorden al patró de cisteïnes d'alguns factors tròfics de mol·luscs i, alhora, de molècules de la via dels EGF (Bueno i altres, 2001). Experiments de la pèrdua de funció del gen *tce49* demostren que, tal com es deduïa de la seva seqüència, fa funcions de factor tròfic neuronal i també sembla estar implicat en el procés de fissió (Bueno i altres, 2002) i de manteniment de la regió central de l'animal (Bueno i altres, 2001). Un altre marcador regional, TNEX-49, ha estat la primera eina molecular aplicada en estudis comparatius entre l'embriogènesi i la regeneració (Fernández-Rodríguez, 2005). Amb el temps, però, s'ha demostrat que només uns pocs dels mAb's de la llibreria que construïren Romero i col·laboradors reaccionen creuadament amb proteïnes de similar distribució en altres espècies de planària. En conjunt, però, aquests resultats reafirmen la

viabilitat (i necessitat) de la tècnica per trobar noves molècules implicades en els programes de desenvolupament i també per generar un banc de recursos moleculars d'aplicabilitat immediata.

# OBJECTIUS





En aquest treball hem analitzat els mòduls genètics potencialment conservats que regulen la neurogènesi primerenca dels metazous en embrions de la planària d'aigua dolça *Schmidtea polychroa* amb la finalitat d'expandir el coneixement sobre l'evolució d'aquell procés als Spiralia. *S. polychroa* s'ofereix com un model interessant i adequat per aquesta tasca perquè: (1) pertany a un clade, els Platyhelminthes, on la neurogènesi embrionària gairebé no ha estat caracteritzada; (2) presenta un sistema nerviós centralitzat i un sistema visual morfològicament simple; i (3) mostra un desenvolupament embrionari que, malgrat deriva substancialment respecte del patró ancestral espiral, encara conserva elements pertanyents a les xarxes reguladores implicades en l'establiment de la polaritat corporal i el desenvolupament d'altres sistemes d'òrgans (p. e. el sistema digestiu i el muscular). Històricament, però, l'estudi de la neurogènesi en els embrions de les planàries s'ha vist dificultada per la manca d'eines metodològiques i experimentals d'avantguarda.

Per tot això, l'**objectiu inicial** d'aquesta tesi doctoral fou:

– Descriure l'organogènesi embrionària del sistema nerviós central, perifèric i dels ulls a la planària *Schmidtea polychroa*, analitzant-lo amb processos anàlegs de la regeneració d'aquests organismes i amb els mòduls conservats de la neurogènesi primerenca dels bilaterals.

Per assolir aquesta fita ens vàrem fixar els següents **objectius particulars**:

1. Utilitzar anticossos específics per a visualitzar poblacions cel·lulars diferenciades de derivats ectodèrmics i, en particular, per les subpoblacions serotoninèrgiques, FMRFamidèrgiques i per les cèl·lules fotoreceptores del ulls.
2. Estudiar l'expressió durant l'embriogènesi de gens pan-neurals i d'altres gens específics de subpoblacions neuronals.
3. Identificar factors de transcripció amb una funció evolutivament conservada en la determinació del neuroectoderm -gens de la família *soxB*- i l'especificació de tipus cel·lulars nerviosos -gens de les famílies *bHLH* proneurals- a *S. polychroa* i caracteritzar-ne el patró espacial i temporal d'expressió en embrions.
4. Identificar i estudiar els mecanismes moleculars responsables de la formació dels ulls en embrions de *S. polychroa*.



# RESULTATS



## **Informe del director sobre la participació del doctorand i l'índex d'impacte de les publicacions**

La memòria de la tesi doctoral presentada per en Francisco Monjo Luis, titulada "Organogènesi del sistema nerviós i dels òrgans sensorials en el desenvolupament embrionari de la planària *Schmidtea polychroa*", de la que en sóc director, inclou quatre articles: dos d'ells es troben a l'apartat de "Resultats" i ja han estat publicats; els altres dos articles consten a l'apartat d'"Annexes", i un d'ells també ha estat publicat mentre l'altre es troba pendent de publicació.

Els articles publicats han estat acceptats a revistes científiques internacionals després de ser avaluats per un grup de revisors anònims designats pels editors. Totes aquestes revistes estan registrades al PubMed, la base de dades més important de ciències biomèdiques, i a la *ISI Web of Science*. A continuació passo a detallar la participació relativa del doctorand en cadascun dels treballs i els índexs d'impacte de les revistes i la posició que ocupen en el llistat d'especialitats corresponents (dades del *Journal Citation Reports* del *ISI Web of Science*, edició 2014). Així mateix, certifico que l'article que encara no ha estat publicat serà enviat a una revista internacional de l'àrea de la biologia del desenvolupament i/o evolució.

### **Apartat "Resultats"**

#### **Article 1**

*Embryonic development of the nervous system in the planarian Schmidtea polychroa.*  
**Francisco Monjo** i Rafael Romero. *Developmental Biology* (2015) 397:305-319.

Factor d'impacte: 3,547

Posició en l'àrea: 9/41 (Q1 de l'àrea de *Developmental Biology*)

El treball experimental presentat en aquest article (descripció morfològica de la formació del sistema nerviós en embrions, identificació i clonatge de gens neurals i proneurals -famílies *soxB* i *bHLH*- i anàlisi del seu patró d'expressió i colocalització, i quantificació del número de cèl·lules positives pels gens *soxB* que es troben en divisió) ha estat realitzat íntegrament pel doctorand Francisco Monjo sota la supervisió del Doctor Rafael Romero. El doctorand també ha participat activament en la discussió dels resultats i la redacció de totes les versions del manuscrit.

## Article 2

*Morphological and molecular development of the eyes during the embryogenesis of the freshwater planarian Schmidtea polychroa.* José María Martín-Durán, **Francisco Monjo** i Rafael Romero. *Development Genes and Evolution* (2012) 222:45-54.

Factor d'impacte: 2,441  
Posició en l'àrea: 123/184 (Q3 de l'àrea de *Cell Biology*)  
24/41 (Q3 de l'àrea de *Developmental Biology*)  
29/46 (Q3 de l'àrea de *Evolutionary Biology*)

El doctorand Francisco Monjo ha realitzat part del treball experimental presentat en aquest article (identificació i clonatge de gens -principalment marcadors de tipus cel·lulars de l'ull i factors de transcripció conservats associats amb el desenvolupament d'aquest òrgan-, i anàlisi del seu patró d'expressió) sota la supervisió del Doctor Rafael Romero. Anteriorment, en José María Martín-Durán s'havia encarregat de la descripció de la formació de l'ull amb microscòpia òptica i electrònica i també d'aïllar, clonar i estudiar el patró d'expressió de membres de la xarxa gènica regulada per *pax6*. El doctorand, junt amb en José María Martín-Durán, també ha participat activament en la discussió dels resultats i la redacció de totes les versions del manuscrit.

## Apartat “Annexes”

### Article 3

*Generació d'anticossos monoclonals per l'embrió de la planària Schmidtea polychroa.* **Francisco Monjo** i Rafael Romero. Manuscrit en preparació.

El treball experimental presentat en aquest article (immunitzacions, fusions cel·lulars, selecció d'hibridomes i posterior caracterització immunohistoquímica dels patrons de tinció dels anticossos monoclonals) ha estat realitzat íntegrament pel doctorand Francisco Monjo sota la supervisió del Doctor Rafael Romero. El doctorand també ha participat activament en la discussió dels resultats i la redacció de totes les versions del manuscrit.

### Article 4

*Planarian embryology in the era of comparative developmental biology.* José María Martín-Durán, **Francisco Monjo** i Rafael Romero. *International Journal of Developmental Biology* (2012) 56:39-48.

Factor d'impacte: 1,903

Posició en l'àrea: 35/41 (Q4 de l'àrea de *Developmental Biology*)

El doctorand Francisco Monjo ha contribuït en l'escriptura del text i l'elaboració de les figures de la revisió junt amb en José María Martín-Durán i sota la supervisió del Doctor Rafael Romero.

Firmat,

Dr. Rafael Romero Benedí

Barcelona, 2 de Novembre de 2015





**Article 1. Embryonic development of the nervous system in the planarian *Schmidtea polychroa***

**Francisco Monjo**<sup>1</sup> i Rafael Romero<sup>1</sup>

Developmental Biology, 397:305-319;

Índex d'impacte (2014): 3,547

<sup>1</sup> Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya



## Resum

Una de les principals innovacions dels metazous és el desenvolupament d'un sistema nerviós capaç d'integrar i processar informació sensorial, i coordinar les respostes adequades. La formació del sistema nerviós, o neurogènesi, s'inicia durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari i requereix que una part de l'ectoderma es determini en el neuroectoderma i que aquest, més tard, generi els primers progenitors nerviosos. En diversos grups d'animals bilateris s'ha demostrat que aquestes dues transicions estan regulades per un grup de gens amb funcions evolutivament conservades, però desconeixem si la neurogènesi en els Spiralia, i en particular en els Platyhelminthes, està controlada per mecanismes semblants. En aquest estudi caracteritzem amb eines moleculars específiques la formació durant l'embriogènesi del sistema nerviós de la planària d'aigua dolça *Schmidtea polychroa*, i analitzem l'expressió de representants de dues famílies gèniques, la dels *soxB* i la dels *bHLH*, que tenen papers rellevants en les primeres etapes del procés. Amb els nostres resultats mostrem que el sistema nerviós de la planària s'organitza *de novo* després de que l'embrió primerenc ingereixi el material nutricional matern. També demostrem que en embrions primerencs els membres de la subfamília *soxB1* es detecten en putatius progenitors neurals, mentre que els gens de la família *soxB2* i diversos gens *bHLH* proneurals (*achaete-scute*, *neuroD* i *beta3*) s'associen més tard amb l'especificació de subpoblacions de neurones del sistema nerviós central i perifèric. Finalment, contextualitzem les semblances entre aquests patrons d'expressió i la funció proneural dels gens en altres organismes bilateris, i suggerim que la xarxa ancestral de la qual formen part està conservada en els tríclads.





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Developmental Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/developmentalbiology](http://www.elsevier.com/locate/developmentalbiology)

# Embryonic development of the nervous system in the planarian *Schmidtea polychroa*



Francisco Monjo\*, Rafael Romero

Universitat de Barcelona, Departament de Genètica, Avda. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 March 2014  
 Received in revised form  
 28 October 2014  
 Accepted 29 October 2014  
 Available online 11 November 2014

## Keywords:

Planarian  
 Embryonic development  
 Central nervous system  
 Neurogenesis  
*bHLH*  
*soxB*

## ABSTRACT

The development of a nervous system is a key innovation in the evolution of metazoans, which is illustrated by the presence of a common developmental toolkit for the formation of this organ system. Neurogenesis in the Spiralia, in particular the Platyhelminthes, is, however, poorly understood when compared with other animal groups. Here, we characterize embryonic neurogenesis in the freshwater flatworm *Schmidtea polychroa* and analyze the expression of *soxB* and a set of proneural *bHLH* genes, which are gene families with a well-established role in metazoan early neural development. We show that the nervous system is fully *de novo* assembled after the early embryo ingests the maternal nutrients. At early stages of neurogenesis, *soxB1* genes are expressed in putative neural progenitor cells, whereas *soxB2* and neural *bHLH* genes (*achaete-scute*, *neuroD* and *beta3*) are associated with late neurogenesis and the specification of neural subpopulations of the central and peripheral nervous system. Our findings are consistent with the role of proneural genes in other bilaterians, suggesting that the ancestral neural-specific gene regulatory network is conserved in triclads, despite exhibiting a divergent mode of development.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

A manifest feature of most animals is the presence of a nervous system, which integrates and processes sensory information to coordinate adequate responses. In bilaterally symmetric animals (Bilateria) the nervous system is often divided into a centralized nervous system (CNS) and a peripheral nervous system (PNS). Anatomically, the CNS comprises an anterior brain, and one or more nerve cords that run along the body. The PNS consists of sensory neurons and nerve plexus innervating different organs that are connected to each other and to the CNS through nerve tracts.

The development of the nervous system (neurogenesis) starts early in development, and involves two crucial steps: the determination of the neuroectoderm, which is the neurogenic portion of the ectoderm; and the generation of neural progenitors from this tissue. In recent decades, molecular studies in several animal models, in particular pertaining to the Deuterostomia (e.g. zebrafish and mouse) and the Ecdysozoa (e.g. *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila*), have shown a set of regulatory genes with homologous roles in bilaterian neurogenesis (Hirth, 2010; Arendt et al., 2008; Guth and Wegner, 2008; Mizutani and Bier, 2008; Bertrand et al., 2002), which is even

conserved in cnidarians, the sister group to the Bilateria (Layden et al., 2012; Galliot and Quiquand, 2011; Galliot et al., 2009). Members of the group B of SRY-related HMG box (*soxB*) genes are involved in the formation of the neuroectoderm and its maintenance in an undifferentiated and proliferative state (Sarkar and Hochedlinger, 2013; Guth and Wegner, 2008). Later on, proneural basic helix-loop-helix (*bHLH*) genes control the transition from undifferentiated neuroectodermal cells to neural progenitors as well as the activation of neuronal differentiation pathways (Quan and Hassan, 2005; Bertrand et al., 2002). After the commitment of the neural progenitors, downstream regulatory genes, such as *elav*, *musashi*, and *prospero*, implement genetic programs that initiate differentiation of these cells into neurons (Pascale et al., 2008; Choksi et al., 2006; Okano et al., 2002). In the Spiralia (i.e. Lophotrochozoa), which together with the Ecdysozoa form the clade Protostomia (Dunn et al., 2008), most of the studies about the molecular mechanisms controlling embryonic neurogenesis have focused on mollusks and annelids (Demilly et al., 2013; Buresi et al., 2013; Kerner et al., 2009; Meyer and Seaver, 2009; Simionato et al., 2008; Denes et al., 2007; Le Gouar et al., 2004; Nederbragt et al., 2002), whereas little is known about other related groups. Here, we describe neural development during the embryogenesis of the freshwater triclad *Schmidtea polychroa* (Schmidt, 1861) and report the expression of proneural and neural-related genes in order to understand how these mechanisms may have evolved in the Spiralia.

\* Corresponding author. Fax: +34 93 403 4420.  
 E-mail address: [radiakis@gmail.com](mailto:radiakis@gmail.com) (F. Monjo).

Triclad (commonly referred to as planarians) are a group of free-living Platyhelminthes well known for their extensive regenerative capabilities (Reddien and Sánchez Alvarado, 2004). Freshwater planarians have a CNS composed of an anterior bilobed brain and two ventral nerve cords (VNC) interconnected by transverse commissures in a rope ladder-like configuration (Agata et al., 1998; Cebrià et al., 2002b), and they also have a PNS that includes sensory cells arranged in lateral cords in the body margin (Cardona et al., 2005) and the nerve plexus that innervate the organs (Baguñà and Ballester, 1978; Baguñà, 1974; Hyman, 1951). Studies in adult planarians during regeneration and homeostasis have identified neural markers specific to organs and cell populations of the CNS, such as the homeobox transcription factors *otxA/B* and *otp* which are detected in different domains of the brain (Cebrià, 2007). Remarkably, most of these genes display a high level of conservation compared to their vertebrate orthologs (Mineta et al., 2003). Analysis of the expression of aforementioned genes enabled us to summarize the regeneration of the planarian CNS in a model divided into five steps (Inoue et al., 2007; Cebrià et al., 2002b) and to functionally characterize key factors for each stage of neural regeneration (Umesono et al., 2011; Cebrià, 2007), like the FGF-like receptor *nou-darake* that restricts the brain to the head region (Cebrià et al., 2002a). Recently, these molecular studies have demonstrated that planarians possess neural-lineage committed progenitors among the heterogeneous population of stem cells of the adult animal (Cowles et al., 2013; Currie and Pearson, 2013; März et al., 2013; Lapan and Reddien, 2012). Contrary to the situation observed in the study of regeneration, only recently has work begun on analyzing the embryonic development of the planarian nervous system at the genetic level (Martín-Durán et al., 2012a).

Planarian development occurs inside opaque eggshells (cocoons) and is characterized by the presence of ectolecithal eggs, in which the embryonic nutrients are stored in maternally-supplied yolk cells that are packed together with the oocytes inside the cocoon. In *S. polychroa*, embryogenesis is systematized into 8 stages (Cardona et al., 2005; summarized in Fig. S1). Development begins soon after the egg is laid, when the zygote undergoes a disperse cleavage in which the blastomeres do not remain attached and wander around inside a yolk-derived syncytium (stage 1). Shortly thereafter, some of these blastomeres differentiate into two transient organs: the embryonic pharynx and the embryonic epidermis (stage 2). These two structures are required for the ingestion of the surrounding yolk cells by the early embryo (stage 3), and, as a result of this uptake, the syncytium becomes a thin band in which the remaining undifferentiated blastomeres proliferate (stage 4) and, eventually, give rise to definitive axial patterning and organ primordia (stages 5 and 6). In the last stages, the definitive organs develop, and the embryo acquires its mature morphology (stages 7 and 8). The specifics of nervous system development in planarians are poorly known and are mostly based on morphological descriptions (Martín-Durán et al., 2012b) and immunohistochemistry (Cardona et al., 2006, 2005). According to Cardona et al. (2006, 2005), planarian embryos form two independent nervous systems—one associated with the yolk-feeding embryo and the other the definitive nervous system that develops from stage 6 onwards. The early, or primary, nervous system is transitory and composed of a pair of large multipolar cells, known as star cells, which disappear with the formation of the definitive organs. In contrast, the definitive CNS develops in association with two ventrally-located nerve tracts, the “pioneer nerve cords”, which grow anew in stage 5 embryos from the embryonic pharynx toward the opposite pole of the embryo. As such, embryonic neurogenesis appears to be highly divergent in planarians, and therefore, an outstanding opportunity to investigate the evolution of neurogenesis in bilaterian animals.

## Material and methods

### Animals and eggs

A sexual population of *S. polychroa* from Sant Celoni (Barcelona, Spain) was maintained in the lab as described previously (Martín-Durán et al., 2008). Egg capsules were collected regularly and kept in Petri dishes at 20 °C in culture water (tap water:distilled water, 1:1, v-v). Embryos at different developmental stages were fixed in 4% formaldehyde (Sigma) in phosphate buffer saline (PBS) for 4 h at 4 °C, and stored at –20 °C in 70% ethanol. Samples intended for rhodamine–phalloidin (Molecular Probes) staining were kept at 4 °C in PBS.

### Immunohistochemistry and phalloidin staining

Embryos at the desired time of development were rehydrated in PBT (PBS Triton X-100, 0.1%), dissected from the egg capsules with the help of a pair of tweezers under a stereomicroscope, and pooled in a glass tube, where they were permeabilized with PBT 0.3% (PBS Triton X-100, 0.3%) for 30 min. When the antibodies anti-5-HT (Sigma-Aldrich, S5545), anti-FMRFamide (DiaSorin, 2009), and anti-TMUS13, an antibody specific for planarian muscle fibers (Cebrià et al., 1997), were used, a step in Image-iT FX Signal Enhancer (Invitrogen) for 30 min was performed to block unspecific binding sites, followed by at least 5 washes in PBT for the next 90 min. For anti- $\alpha$ -tubulin, used to detect the cephalic ganglia and the nerve cords (Developmental Studies Hybridoma Bank, AA4.3), and anti-phosphorylated histone H3 (anti-H3p, Upstate), used to label cells in mitosis, samples were blocked in 10% normal goat serum (NGS; Invitrogen) diluted in PBT for 30 min. Incubation with the primary antibody was always carried out in 10% NGS in PBT at 4 °C overnight. Primary antibodies were used at the following dilutions: anti-5HT, 1:1000; anti-FMRFamide, 1:500; anti-TMUS13, 1:10; anti- $\alpha$ -tubulin, 1:50; anti-H3p, 1:5000. After incubation with the primary antibody, embryos were washed at least 5 times in PBT for 20 min each wash, and incubated with the secondary antibody diluted 1:400 in 10% NGS in PBT at 4 °C overnight. When necessary, rhodamine–phalloidin (Invitrogen) at a 1:40 dilution was added. Finally, the secondary antibody was washed in PBT, and embryos were mounted between two coverslips with ProLong Gold Antifade (Invitrogen) with the nuclear marker DAPI.

### Identification and cloning of planarian genes

*S. polychroa* is a species closely related to the triclad model *Schmidtea mediterranea*. Partial fragments of the genes *Spol-sec5*, *Spol-syt*, *Spol-mlgC*, *Spol-otp*, and *Spol-gad* (GenBank accession numbers KJ493799, KJ493800, KJ493801, KJ493802, and KJ493803) were cloned using interspecific primers designed against the respective *S. mediterranea* sequences. *Spol-elav-1*, *Spol-elav-2*, *Spol-elav-3*, *Spol-elav-4*, *Spol-soxB1-1*, *Spol-soxB1-2*, *Spol-soxB2-1*, *Spol-soxB2-2*, *Spol-ASCa*, *Spol-ASCb*, *Spol-neuroD*, *Spol-beta3*, and *Spol-olig* (GenBank accession numbers KJ493804, KJ493805, KJ493806, KJ493807, KJ493808, KJ493809, KJ493810, KJ493811, KJ493812, KJ493813, KJ493814, KJ493816, and KJ493815) were cloned with primers designed against the predicted *S. mediterranea* genes and named following the suggested gene nomenclature guidelines (Reddien et al., 2008). The predictions were established via BLAST searches (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) and genomic annotations available in SmedGD (<http://smedgd.neuro.utah.edu>). The *S. mediterranea* *soxB* and *ASCa* orthologs were manually annotated. Elongation of the cloned fragments in *S. polychroa* was achieved by classic RACE-PCR, as described in Frohman (1994).

### Phylogenetic analysis

Amino acid alignments were carried out using MAFFT v6.0 (Kato and Toh, 2008) and corrected by hand for obvious alignment errors. For *soxB*, and Atonal and Achaete–Scute subfamily amino acid alignments similar datasets as presented in Royo et al. (2011) and Simionato et al. (2007) were used. In the phylogenetic analysis of the *sox* family we included amino acid sequences from previously identified planarian *sox* genes that showed no specific orthology to any group (*SmSoxP1*, *SmSoxP2*, *SmSoxP3*, *SmSoxP5*, reported in Wagner et al., 2012; Wenemoser et al., 2012), and the predicted *S. mediterranea soxB* genes presented in this study; in the analysis of the *bHLH*-related genes we included the sequences reported in Cowles et al. (2013) along with the predicted *S. mediterranea* ortholog of *Spol-ASCa*. Additional sequences were fetched from public repositories. Nexus files of the alignments are available upon request. In each case, ProtTest (Abascal et al., 2005) was used to select the best-fit model of protein evolution and MrBayes v3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) to conduct the Bayesian phylogenetic analysis. The evolutive models predicted for each analysis were as follows: WAG for Elav, JTT for Achaete–Scute and Atonal proteins, RtRev for Sox family proteins, and Dayhoff for the SoxB subfamily of proteins. In all cases, the results are a consensus of two converged runs of at least 2000,000 generations, sampled every 1000 generations. Trees were visualized in FigTree and edited in Adobe Illustrator. Taxon names for gene sequences are abbreviated as follows: Ag *Anopheles gambiae*, Am *Acropora millepora*, Bf *Branchiostoma floridae*, Bt *Bos taurus*, Ce *Caenorhabditis elegans*, Ci *Ciona intestinalis*, Cq *Culex quinquefasciatus*, Ct *Capitella teleta*, Dj *Dugesia japonica*, Dm *Drosophila melanogaster*, Dr *Danio rerio*, Gg *Gallus gallus*, Hs *Homo sapiens*, Lg *Lottia gigantea*, Ml *Macrostomum lignano*, Mm *Mus musculus*, Nv *Nematostella vectensis*, Pd *Platynereis dumerilii*, Pv *Patella vulgata*, Sk *Saccoglossus kowalevskii*, Sm *S. mediterranea*, Sman *Schistosoma mansoni*, Spu *Strongylocentrotus purpuratus*, Sp *S. polychroa*, Tc *Tribolium castaneum*, and Xt *Xenopus tropicalis*.

### Gene expression studies

Single colorimetric *in situ* hybridization on whole-mount and paraffin sections in triclad embryos were carried out as previously described (Martín-Durán et al., 2010). Whole-mount *in situ* hybridization in hatchlings was performed as described in Umeson et al. (1997), using an *in situ* robot (InsituPro VSi, Intavis) and developed with an alkaline phosphatase–NBT/BCIP colorimetric assay. Single and double fluorescent *in situ* hybridization on whole-mount embryos were carried out as previously described (Martín-Durán et al., 2010), using the POD-conjugated antibodies (Roche) at a final concentration of 1:100. RNA probes synthesized with dinitrophenol modified ribonucleotides (DNP, Perkin-Elmer) were used to visualize transcripts of genes with low levels of expression. When necessary, an additional immunohistochemistry with anti- $\alpha$ -tubulin or anti-H3p was performed after *in situ* hybridization.

### Imaging

Whole-mount embryos and hatchlings were observed under a Leica MZ16F stereomicroscope. Images from representative specimens of each experiment were captured with a ProgRes<sup>®</sup>C3 camera from Jenoptik. Histological sections were observed under a Zeiss Axiophot microscope equipped with a Leica DFC300FX camera. Fluorescent preparations were observed under Leica TCS-SPE and Leica TCS-SP2 confocal microscopes. Images were analyzed using Helicon Focus, Adobe Photoshop, Fiji (Schindelin et al., 2012), and Adobe Illustrator.

### Cell counting

Several 1  $\mu$ m-confocal sections were captured from desired embryos and merged, and cells were hand-counted using Fiji. The proportion of H3p-positive cells coexpressing specific *soxB* genes was calculated from a 100  $\times$  100  $\mu$ m germ band region for stage 3, stage 4, and stage 5 embryos and from 100  $\times$  100  $\mu$ m prepharyngeal regions for stage 7 embryos. In each case, a minimum of five embryos were counted, and afterwards mean and standard deviation were computed.

## Results

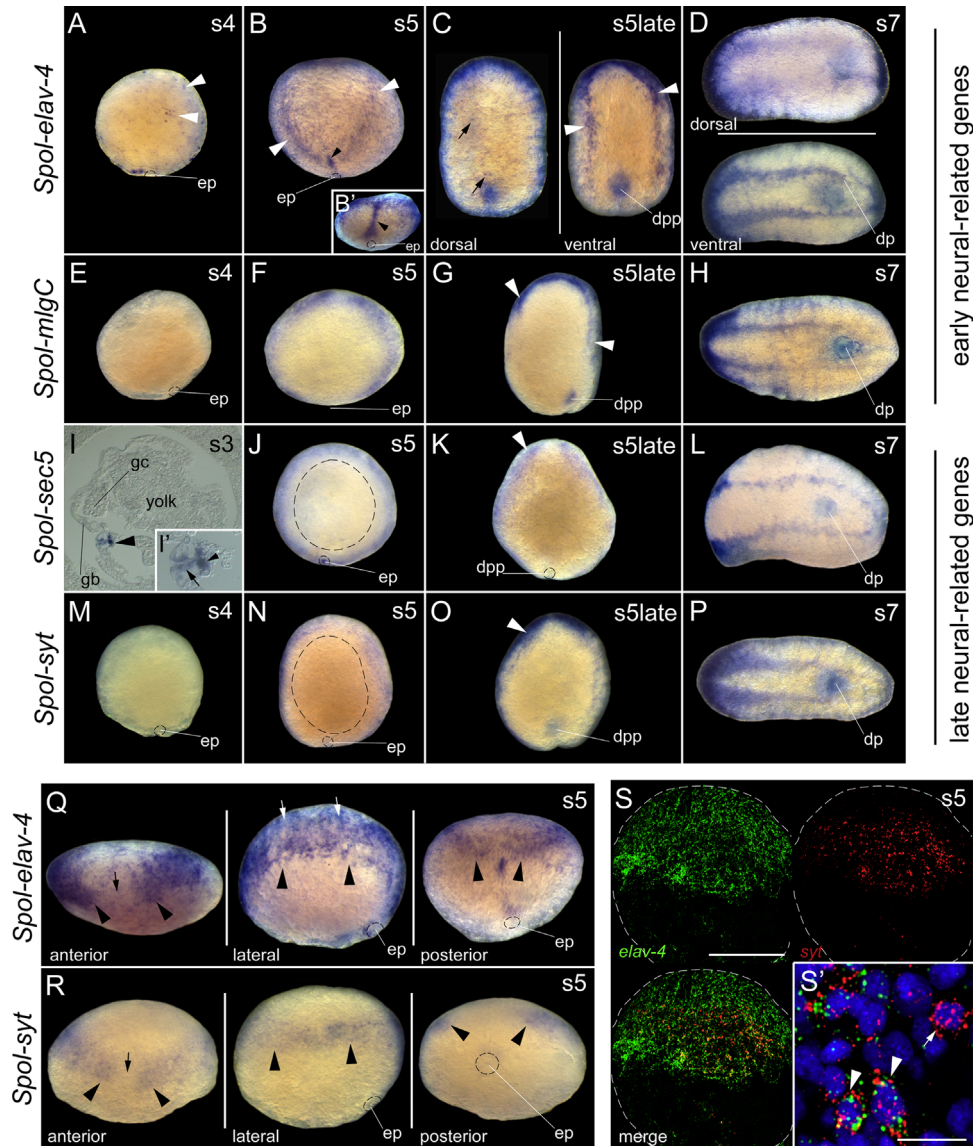
### Expression of neural differentiation genes during *S. polychroa* embryonic development

To characterize the development of the nervous system in *S. polychroa* we first studied the expression of orthologs of pan-neural genes in embryos and hatchlings (Figs. 1 and S2A–G). Genes of the *elav/hu* and *musashi* families are expressed in neurons that are in early steps of differentiation in most studied animals (Pascale et al., 2008; Okano et al., 2002). In planarians, however, no neural *elav/hu* genes have been reported, and the *mushashi* orthologs that have been characterized are expressed in postmitotic cells of the CNS, where they probably control the terminal differentiation of subpopulations of neurons (Higuchi et al., 2008). We identified and partially cloned a fragment of *musashi-like gene C* (*Spol-mlgC*), the planarian member of the *musashi* family that shows the earliest and strongest expression in the CNS during regeneration (Higuchi et al., 2008), and of four putative *elav/hu* orthologs, which we named *Spol-elav-1*, *Spol-elav-2*, *Spol-elav-3*, and *Spol-elav-4*. Phylogenetic analysis by Bayesian inference confirmed these four genes to be members of the *elav/hu* family (Fig. S3), but only *Spol-elav-4*, which displayed a specific pan-neural expression in hatchlings (Fig. S2D–G), was analyzed in embryos. We also characterized the spatiotemporal pattern of *synaptotagmin* (*Spol-syt*) and *secretogranin 5* (*Spol-sec5*), which are markers of terminally differentiated neurons (Reddien et al., 2005; Nakazawa et al., 2003).

The first genes detected by whole-mount *in situ* hybridization in embryos were *Spol-sec5* and *Spol-elav-4*: *Spol-sec5* was expressed within the embryonic pharynx from stage 3 to stage 5, in the inner epithelium of the pharynx duct and the cells connecting this organ to the temporary intestine (Fig. 1I, I' and J), and *Spol-elav-4* in a great number of embryonic cells at stage 4 (Fig. 1A), some of which were in division (Fig. S4A and A'). Later, at stage 5, *Spol-syt*, *Spol-sec5*, and *Spol-mlgC* were detected in a broad domain encircling the spherical embryo (Fig. 1F, J and N) that is interrupted at the putative anterior and posterior pole (evident in Fig. 1R). At this stage, *Spol-elav-4* was detected in postmitotic cells, in a pattern similar to the other neural genes (Fig. 1B and Q), in dorsally isolated cells (Fig. 1Q), and in a narrow domain expanding from the embryonic pharynx to the dorsal side of the embryo (Fig. 1B, B' and Q), which resembles that of the characteristic bundle of muscular cells visualized in this region (compare with Fig. 2A–posterior and Fig. S1B–stage 5 panels). Double fluorescent *in situ* hybridization (DFISH) of *Spol-syt* and of *Spol-elav-4* demonstrated the colocalization of these genes in a cellular subpopulation in the region of the domain circling the embryo (Fig. 1S and S'), but not in other *Spol-elav-4* positive cells (i.e., in dorsal cells).

At late stage 5, when the embryo begins to flatten and elongate in the anteroposterior axis, the four neural markers were ventrally restricted in two lateral stripes that run along the embryo (Fig. 1C–ventral, Fig. 1G, K and O). *Spol-elav-4* and *Spol-mlgC* were also expressed in the definitive pharynx primordium that lies near the degenerating embryonic pharynx (Fig. 1C–ventral and Fig. 1G),





**Fig. 1.** Temporal and spatial expression of pan-neural genes in embryos. (A–H, J–R) are whole-mount *in situ* hybridizations of *Spol-elav-4*, *Spol-mlgC*, *Spol-sec5*, and *Spol-syt* in embryos at stage 4 (s4), stage 5 (s5), late stage 5 (s5late), and stage 7 (s7). (I and I') are *in situ* hybridizations on paraffin sections of *Spol-sec5* in embryos at stage 3 (s3). (S and S') are z-projections of confocal stacks from whole-mount DFISH with *Spol-elav-4* (in green) and *Spol-syt* (in red) in stage 5 embryos. The large arrowheads in (A) show expression related to embryonic cells of the germ band, and in (B–G, K, O, Q and R), to the developing nervous system; the dashed black circle in (J and N) delimits the domains where neural genes are detected. The black arrow in (Q and R) indicates the absence of expression at the future anterior pole, which is also observed in the future posterior region of the embryo. The white arrowheads in (S') indicate cells where *Spol-elav-4* colocalizes with *Spol-syt*; the white arrow points to a *Spol-syt* positive cell. At stage 5, *Spol-elav-4* was also detected in a narrow domain going from the embryonic pharynx to the dorsal side of the embryo (small black arrowhead in B, B'; B' is an inset of the posterior region of the embryo viewed from the top) and in isolated cells of the dorsal side (white arrows in Q), which were not detected with late differentiation markers such as *Spol-syt*. At late stage 5, *Spol-elav-4* transcripts persisted in few dorsal cells (black arrows in C-dorsal). At early stages, *Spol-sec5* was expressed in the embryonic pharynx (large black arrowhead in I), in cells connecting the pharynx with the temporary intestine (small black arrowhead in I'), and in the inner epithelium of the organ (black arrow in I'–I' is an inset of the embryonic pharynx region). Most embryos are oriented as depicted in Fig. S1; in (Q, R and S), the dorsal is to the top, and, unless specified, the future anterior to the left. In (A, B, B', E, F, J, M, N, Q and R), the dashed line encircles the embryonic pharynx. dp, definitive pharynx; dpp, definitive pharynx primordium; ep, embryonic pharynx; gb, germ band; gc, "gigantic" cells; yolk, ingested yolk. Scale bars, S, 250  $\mu$ m; S', 10  $\mu$ m.

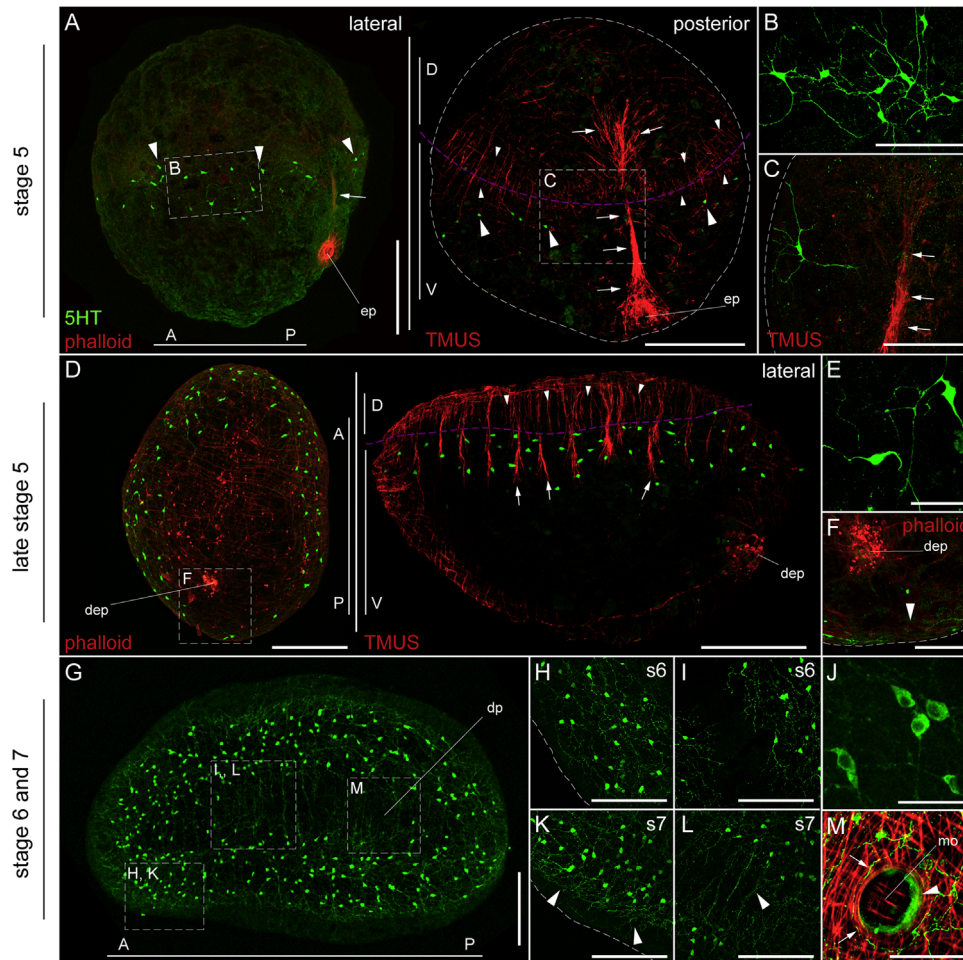
while *Spol-elav-4* was expressed in few scattered dorsal cells (Fig. 1C-dorsal). In some embryos an expanded domain at the anterior pole hinted at the condensation of the brain in this region (particularly apparent in Fig. 1G and O). Finally, during late embryogenesis, as the adult body proportions are established, the expression of these genes was localized exclusively in the definitive CNS and the nerve plexus of the definitive pharynx (Fig. 1D, H, L and P), in a manner akin to the expression in the mature organs of hatchlings (Fig. S2A–C and G).

To determine the embryonic pattern of neuronal subtype formation, we analyzed the expression of the genes encoding for tyrosine hydroxylase (*Spol-th*), tyramine beta-hydroxylase (*Spol-tbh*), and

glutamic acid decarboxylase (*Spol-gad*), which are, respectively, markers of dopaminergic, octapaminergic, and GABAergic neurons (Nishimura et al., 2008a, 2008b, 2006). The three genes were expressed in fewer cells than the pan-neural markers, but in a similar pattern (Fig. S5; compare with Fig. 1). In terms of timing, *Spol-th* was first detected in stage 5 embryos (Fig. S5A), while *Spol-tbh* and *Spol-gad* were detected first in late stage 5 embryos (Fig. S5F and J).

#### Morphogenesis of the nervous system in embryos

To further characterize the development of the nervous system we studied the distribution of anti-5HT and anti-FMRamide in



**Fig. 2.** Neural development visualized with anti-serotonin immunolabelling. All panels are z-projections of confocal stacks from whole-mount anti-5HT immunolabellings (in green) in developing embryos; the musculature is labeled with either the anti-TMUS antibody or phalloidin (in red). In (A and C), the large white arrowheads indicate serotonergic neurons, and the small white arrowheads mark radially organized muscular fibers. The white arrows point to a bundle of muscular cells that arises from the embryonic pharynx and extends to the dorsal side of the embryo, ending in a fan-like structure from which more muscular cells arise; serotonergic neurons were unconnected at this region. In (D), the small white arrowheads mark short transversal muscular fibers at the margin, while the white arrows point to long transversal muscular fibers that grow toward the ventral side. A late stage 5, the serotonergic system was located in the ventral side of the embryo, immediately below the short muscular fibers. In (F), the white arrowhead indicates the empty space between two unconnected neurons. In (K and L), the large white arrowheads highlight the neural projections and the commissures established in stage 7 embryos (s7) that were not present in stage 6 embryos (s6). In (M), the white arrowhead points to the staining in the mouth opening, and the white arrows to the subepithelial plexus of the mature pharynx. (D-left panel, G) are ventral views of the embryo. The white dashed lines in (A-posterior, C, F, H and K) delimit the boundaries of the embryo; in (A-posterior, D-lateral) the dashed violet line delimits the dorso-ventral boundary of the embryo. A, anterior; D, dorsal; dep, degenerating embryonic pharynx; dp, definitive pharynx; ep, embryonic pharynx; mo, mouth opening; P, posterior; V, ventral. Scale bars, A, D and G, 200  $\mu$ m; B, C, F, H, I, K and L 100  $\mu$ m; M, 50  $\mu$ m; E and J, 25  $\mu$ m.

embryos at different stages of development (Figs. 2 and 3). In adult planarians, anti-5HT labels CNS serotonergic cells (Cebrià, 2008) and anti-FMRFamide the CNS and the lateral cords (Fraguas et al., 2012; Cardona et al., 2005).

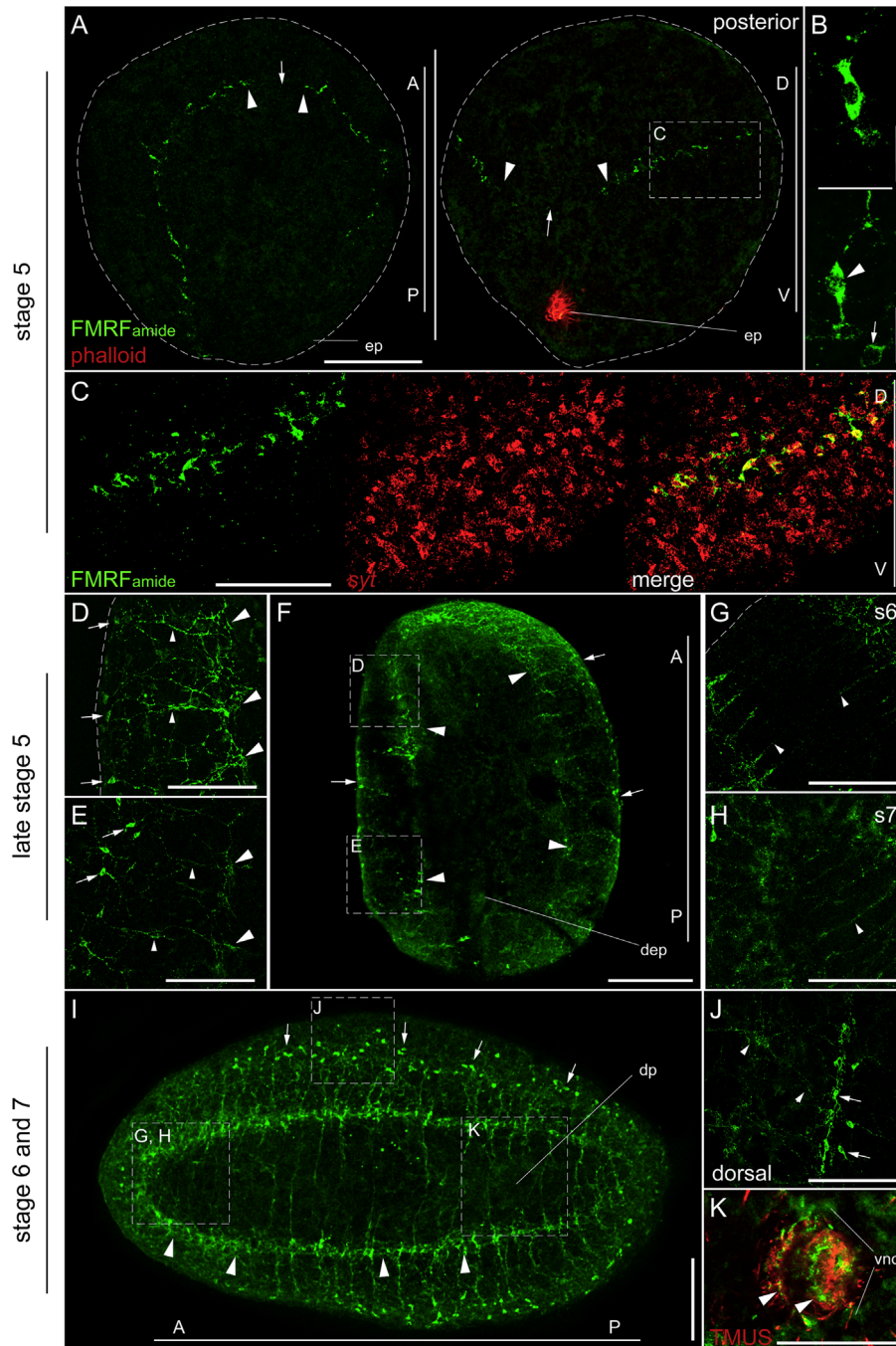
Both anti-FMRFamide and anti-5HT were first detected at stage 5 and were distributed in a ring-like pattern around the embryo (Figs. 2A and 3A), located between another ring-like accumulation of muscular fibers and the embryonic pharynx (Fig. 2A) in a region that corresponds to the future ventral side of the embryo (Fig. S1B). These patterns are extremely similar to that of the pan-neural markers at this stage (Fig. 1-stage 5 panels), and are, therefore, indicative of the differentiation of a neural primordium that contains the rudiment of the CNS. Serotonergic cells were arranged in a broad region (Fig. 2A-lateral) and formed a continuum of connected cells except at the region around the embryonic pharynx (Fig. 2A–C). FMRFamide neurons were organized in two unconnected lateral stripes (Fig. 3A) that were confined to the dorsal-most part of the neural primordium (Fig. 3C). At the cellular level, all serotonergic cells had an elongated body and were multipolar, with some axonal tracts

projecting to the germ band and others connecting with neighboring neurons (Fig. 2B and C), and FMRFamide neurons were similarly wired by multiple axons, but displayed at least three different morphologies: ovoid, and slightly rounded and rectangular (Fig. 3B).

At late stage 5, the developing CNS appeared as two ventral rows of cells faintly immunoreactive to anti-FMRFamide that run from anterior to posterior (Fig. 3F). We also visualized the FMRFamide lateral cords all along the margin of the embryo (Fig. 3F), and the serotonergic system in a ventral CNS-like distribution (Fig. 2D) disrupted, as in stage 5 embryos, at the posterior pole (Fig. 2F). Serotonergic cells at this stage had a more rounded and less branched cellular outline (Fig. 2E), and the FMRFamide system was composed of putative sensory cells in the lateral cords that were connected through commissures to neurons clustered in ganglia in the developing CNS (Fig. 3D and E).

Finally, from stage 6 to stage 7, both neuronal populations progressively acquired their definitive distributions (Figs. 2G and 3I), and by stage 7, their general morphology was equivalent to that observed in adult animals (Cebrià, 2008; Cardona et al., 2005). Anti-





**Fig. 3.** Neural development visualized with anti-FMRFamide immunolabelling. All panels are z-projections of confocal stacks from whole-mount anti-FMRFamide immunolabellings (in green) in developing embryos. Panels (A and K) show the musculature labeled with either phalloidin or the anti-TMUS antibody (in red); the panel (C) shows the neural primordium visualized by whole-mount FISH with *SpoI-syt* (in red). In (A), the white arrowheads point to the end of the FMRFamide lateral stripes, and the white arrows indicate the empty space between them. In (B), the white arrow marks a characteristic small rounded cell and the large arrowhead an ovoid cell with a punctuated axonal tract; the top panel shows a slightly rectangular cell. In (D–J), the large white arrowheads mark the CNS or CNS ganglia, and white arrows mark the lateral cords. In most of these panels, the small white arrowheads indicate growing neural commissures between these two systems or within the brain (although images (G) and (H) are in the stage 5 tier, they correspond, respectively, to stage 6 (s6) and stage 7 (s7) embryos), and the submuscular plexus and the connections with the sensory cells of the lateral cords in (J). In (K), the large white arrowheads point to the proximal and distal nerve ring of the definitive pharynx. A top view of the embryo is shown in (A-right panel), while (F and I) are ventral views of the embryo. In (A, D and G) the white dashed lines delimit the boundaries of the embryo. A, anterior; D, dorsal; dep, degenerating embryonic pharynx; dp, definitive pharynx; ep, embryonic pharynx; P, posterior; V, ventral; vnc, ventral nerve cords. Scale bars, A, F and I, 200  $\mu$ m; D–E, G–H and J–K, 100  $\mu$ m; C, 50  $\mu$ m; B, 15  $\mu$ m.

FMRFamide immunolabelling enabled us to identify the brain condensed at the anterior pole, the VNC running along the ventral surface, and the lateral cords at the margin (Fig. 3I). Serotonergic neurons had increased in number and disseminated in a CNS-like ventral pattern (Fig. 2G), adopting the rounded morphology typical of these cells in the adults (Fig. 2J) and finally connecting at the posterior end (Fig. 2G). Furthermore, between stage 6 and 7, a high number of

neuronal connections were established, such as transversal commissures in the CNS (Figs. 2I, L, and 3G, H), neural projections from the margin to the dorsal of the embryo (Figs. 2H, K, and 3J), and the nerve plexus in the definitive pharynx (Figs. 2M and 3K).

Altogether, the presented data suggests that the onset of neural differentiation begins in stage 4, in a population of committed cells in the germ band that express the early neural-related marker

*Spol-elav-4*. The presumptive early differentiating neurons will be later organized in the bilateral fashion characteristic of the adult animal, attaining their definitive morphology by stage 7. These results provide the necessary framework to address how evolutionarily conserved genes with a proneural role in other metazoans are expressed during the development of the nervous system of triclads.

#### Characterization of the complement of *soxB* genes in *S. polychroa*

*soxB* genes have a conserved role in neuroectoderm and nervous system development in most studied animals (Guth and Wegner, 2008). Previous reports proposed the existence of different *Sox* genes in planarians, based on *in silico* predictions over the genome and analysis of transcriptomes of *S. mediterranea* (Önar et al., 2012; Lapan and Reddien, 2012; Zhong et al., 2011). Using these amino acid sequences and others from spiralian and vertebrate species, we identified and partially isolated fragments of four *soxB*-like genes in *S. polychroa*, and using phylogenetic inference we effectively assigned their orthology to the *soxB* group (Fig. S6). The *soxB* group is composed of two subfamilies, *soxB1* and *soxB2*, that may have already existed in the last common ancestor of sponges, cnidarians, and bilaterians (Zhong et al., 2011; Larroux et al., 2008). A second phylogenetic analysis using only protein sequences of *soxB1* and *soxB2* orthologs demonstrated that the planarian complement consists of two *soxB1* (*Spol-soxB1-1* and *Spol-soxB1-2*) and two *soxB2* genes (*Spol-soxB2-1* and *Spol-soxB2-2*) (Fig. S7). *Spol-soxB1-1* corresponds to the previously described *Smed-soxB* (Lapan and Reddien, 2012) and *Spol-soxB2-2* to the putative *soxB2* ortholog reported in Scimone et al. (2014).

In *S. polychroa* embryos, *Spol-soxB1-1* was first detected in stage 2–3 embryos, as observed in other germ layer-related markers (Martín-Durán et al., 2010), in isolated blastomeres of the yolk syncytium (Fig. 4A and A'). As the embryo grows in size due to the ingestion of the external yolk (Cardona et al., 2005) and proliferation in the germ band is triggered (Martín-Durán et al., 2010), the number of *Spol-soxB1-1* positive cells increased (Fig. 4B), and in stage 4 embryos, the transcripts of *Spol-soxB1-1* were present in all the putative new-born neurons (Fig. 5A and A'). Later, at stage 5, *Spol-soxB1-1* and *Spol-soxB1-2*, which was detected for the first time in developing embryos, were expressed in the lateral margin of the embryo (Fig. 4C and F), in a pattern resembling that exhibited by pan-neural genes (compare with Fig. 1-stage 5 panels), and colocalized in some cells in this region (Fig. S8C and C'). Further analysis by complementary localization with neural-related markers showed that both transcription factors were detected in a subpopulation of *Spol-elav-4* positive cells (Fig. 5C–C', and G, G') and in the neural primordium (Figs. S8A, A', and B, B'). At late stages and in hatchlings, *Spol-soxB1-1* was expressed in the brain region, in the margin of the head, in cells of the parenchyma, and in the definitive pharynx (Figs. 4D and S2H). Additionally, *Spol-soxB1-2* was expressed in cells of the margin and in the parenchyma (Figs. 4G, H and S2I); as in stage 5, *Spol-soxB1-1* and *Spol-soxB1-2* were coexpressed in some cells (Fig. S8D and D') and their transcripts were detected in differentiated neurons of the CNS (Fig. 5E, E', and I, I').

In terms of timing and localization, *soxB2* genes were detected in correlation with the late pan-neural markers: *Spol-soxB2-2* was detected first in stage 5 embryos and *Spol-soxB2-1* in late stage 5 embryos, in the anterior part of the developing CNS (Fig. 6A, A' and D–E') and faintly in the definitive pharynx primordium (Fig. 6A). The expression in the anterior CNS was maintained in later embryonic stages (Fig. 6B, C and F) and in hatchlings (Fig. S2J and K). Complementary localization by DFISH with neural markers showed that *soxB2* transcription factors were expressed in differentiated neurons of the CNS (Fig. 6G–H') and that some *Spol-*

*soxB2-2* transcripts were specifically localized in serotonergic cells (Fig. 6I and I').

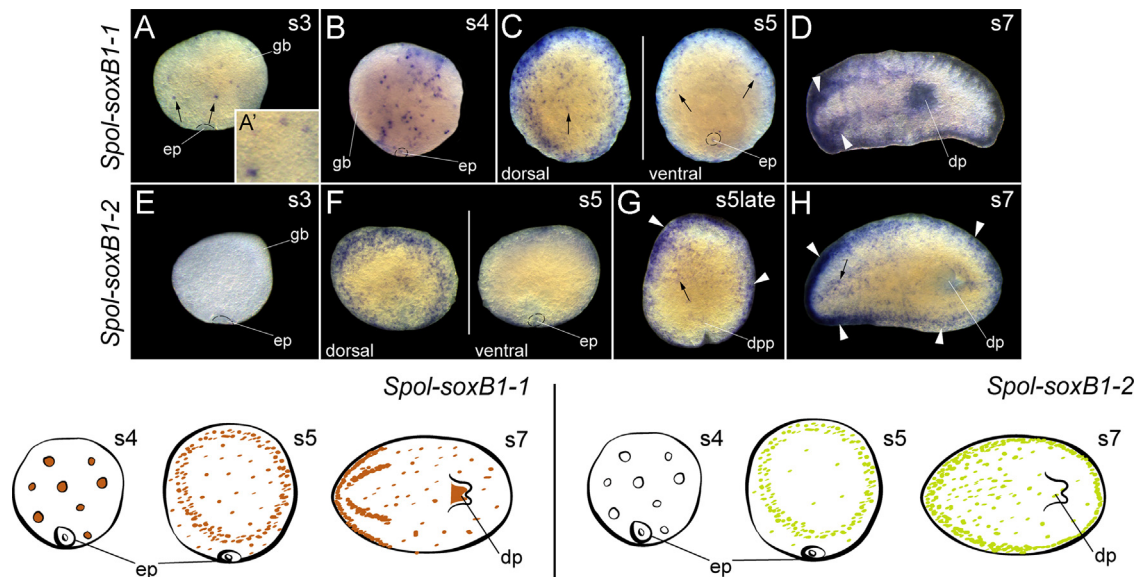
During vertebrate neurogenesis, *soxB1* members are expressed early, in neural stem cells and progenitors, while *soxB2* genes are expressed in differentiated neurons in later stages (Guth and Wegner, 2008). To test if *soxB1* genes and *Spol-soxB2-2* were detected in cells with stem cell features, we combined fluorescent *in situ* hybridization (FISH) of these genes and immunostaining with the antibody anti-phosphorylated histone H3 (H3p), a marker of mitotic cells. We observed that throughout embryogenesis, some cells expressing *Spol-soxB1-1* and *Spol-soxB1-2* but not *Spol-soxB2-2* were positive for anti-H3p (Figs. 5B, B', D, D', F, F', H, H', J, J, and 6J–K'); at stages 5 and 7, mitotic cells were frequently observed close to cells presenting *Spol-soxB2-2* transcripts but never overlapping with them (Fig. 6J–K'). All in all, these results support the idea that only planarian *soxB1* genes may be expressed in putative neural progenitor cells.

#### Characterization of the complement of proneural *bHLH* genes in *S. polychroa*

*bHLH* transcription factors regulate metazoan neurogenesis by segregating neural precursor cells from the ectoderm and specifying neural subtypes in later stages (Bertrand et al., 2002). We identified five putative proneural *bHLH* genes that were assigned to the *achaete-scute* (*Spol-ASCa* and *Spol-ASCb*) (Fig. S9), *neuroD* (*Spol-neuroD*), *beta3* (*Spol-beta3*), and *olig* (*Spol-olig*) subfamilies (Fig. S10). No *neurogenin* ortholog could be isolated by Blast searches, neither in the planarian genome nor in EST databases. The recent work of Cowles et al. (2013) supports our findings, and suggests the specific loss of this family in planarians.

During the embryonic development of *S. polychroa*, *achaete-scute* genes were not detected before stage 5 (Fig. 7A and E). At that moment, *Spol-ASCa* was localized in embryonic cells of the germ band that were mostly arranged in a ring-like distribution resembling the distribution of neural and *soxB1* genes (Fig. 7B; compare with Figs. 1 and 4), and *Spol-ASCb* was expressed in a “salt and pepper” manner (Fig. 7F). At late stage 5 the two homologs were detected mostly in the lateral margin of the embryo (Fig. 7C, C' and G, G'), and a similar pattern persisted in later stages and hatchlings (Figs. 7D, H, S2L and M). *Spol-ASCa* was also expressed strongly in the parenchyma, but did not seem to overlap with CNS structures (Figs. 7D and S2L); on the contrary, *Spol-ASCb* was localized, in addition to the margin of the embryo, in the brain region (Figs. 7H and S2M), and in the primordium of the definitive pharynx (Fig. 7G) as well as the mature organ (Figs. 7H and S2M). To determine whether or not these genes were labeling unique cellular populations, we performed DFISH with them, and we observed their coexpression in a population of cells of the germ band in stage 5 embryos (Fig. S11A and A') and in some cells of the margin in late stages (Fig. S11B and B'). Further analysis with markers of putative neural progenitors (*Spol-soxB1-1*) and pan-neural genes (*Spol-elav-4* and *Spol-syt*) and immunolabelling with anti-H3p antibody showed that both *Spol-ASCa* and *Spol-ASCb* were detected in a subpopulation of *Spol-soxB1-1* positive cells in stage 5 embryos (Figs. S4E, E' and S11C, C') and *Spol-ASCa* in stage 7 embryos (Fig. S11D and D'). We also observed that *Spol-ASCa* was expressed in embryonic cells in division (Fig. S11E and E') and in stem cells (Fig. S1F and F'), and that *Spol-ASCb* was restricted to a subset of cells of the neural primordium and the mature CNS (Fig. 7I–J'). At stage 5, however, *ASCb* was detected only in *Spol-syt* positive cells and not in cells stained with *Spol-elav-4* (Figs. 7I, I' and S4D, D'), suggesting its expression to be related to terminally differentiated neurons.

The *atonal*-related gene *Spol-olig* was detected diffusely in the parenchyma in hatchlings but not throughout embryogenesis (data not shown). *Spol-neuroD* was expressed from stage 4 onwards, first in



**Fig. 4.** Expression pattern of *soxB1* genes throughout embryonic development. (A–H) are whole-mount *in situ* hybridizations of *Spol-soxB1-1* and *Spol-soxB1-2* in embryos at stage 3 (s3), stage 4 (s4), stage 5 (s5), late stage 5 (s5late), and stage 7 (s7). At stage 2–3, *Spol-soxB1-1* was expressed in a few blastomeres (black arrows in A; A' is an inset of the germ band showing three positive cells). This gene was detected at stage 5, along with the margin of the embryo, in dispersed cells of the future dorsal and ventral side (black arrows in C). The black arrows in (G and H) point to cells of the parenchyma positive for *Spol-soxB1-2*. The white arrowheads in (D) indicate the expression of *Spol-soxB1-1* in the brain, and in (G and H), that of *Spol-soxB1-2* in the lateral margin, which is especially strong in the head region. Most stages are oriented as described in Fig. S1. In (A, B, C, E and F), the dashed line encircles the embryonic pharynx. Drawings represent the expression of the genes but are not to scale. dp, definitive pharynx; dpp, definitive pharynx primordium; ep, embryonic pharynx; gb, germ band.

cells of the germ band (Fig. 8A), in some neural progenitors and putative early differentiating neurons (Fig. 54B–C'), and in late stages, as the embryo adopts its definitive worm-shaped morphology, in an increasing number of ventrally-distributed cells (Figs. 8B, C and S2N) and in the definitive pharynx (Figs. 8C and S2N). The expression related to the pharynx is consistent with the localization of the nerve plexus of the mature organ in hatchlings (compare with Fig. S2A–C and G).

Finally, *Spol-beta3* was first detected in embryonic cells of the germ band at stage 4 (Fig. 8D). In some of those cells, *Spol-beta3* colocalized with *Spol-elav-4* (Fig. 8G and G'), but the *bHLH* gene was also expressed strongly in a population of cells that did not overlap with *Spol-elav-4* transcripts (Fig. 8G). Later, *Spol-beta3* localization followed a dynamic similar to that of other neural genes, and by late stage 5, it was detected in two ventral lateral rows of cells that run from anterior to posterior of the embryo (Fig. 8E and E') and in the definitive pharynx primordium (Fig. 8E). Expression in this organ appears to be transient and specific to this stage, because it was not observed in subsequent stages. At stage 7 and hatchlings, *Spol-beta3* was expressed in a CNS-like fashion (Figs. 8F and S2O), in clusters of cells that overlapped at many points with the forming gut diverticula (Fig. 8F'), and colocalized with the expression of pan-neural markers at the outer- (or lateral-) most part of these clusters, both at the brain (Fig. 8H) and the VNC (Fig. 8J) level. Moreover, FISH of *Spol-beta3* enabled us to detect a population of isolated cells distributed in a ventral domain restricted by the CNS that was not observed in the single colorimetric *in situ* hybridization (Fig. 8H and J). Immunostaining for  $\alpha$ -tubulin and FISH for *Spol-beta3* revealed that these cells and the entire clusters were overlapping with neural structures (Fig. 8I and K).

## Discussion

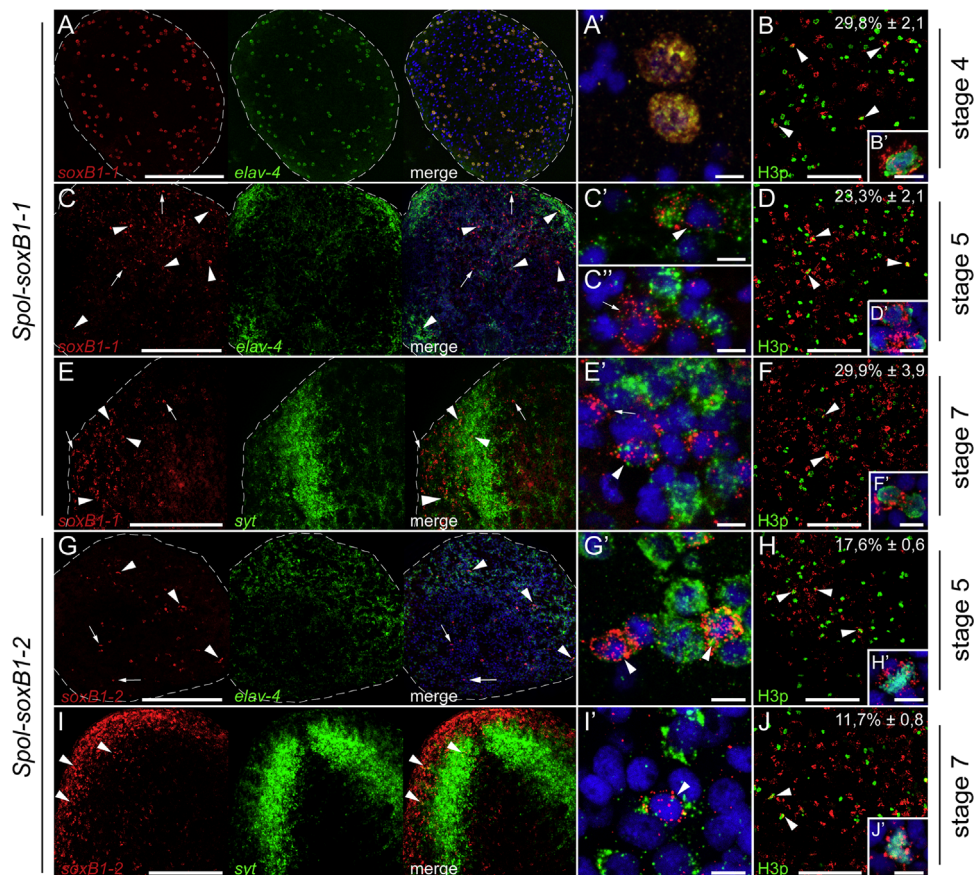
### Neurogenesis in *Schmidtea polychroa*

In this study we investigated the embryonic formation of the nervous system in *S. polychroa* with the aid of pan-neural and neural

subtype genes (Figs. 1, S2, S4 and S5) along with neural-specific antibodies (Figs. 2 and 3). The expression of *Spol-elav-4* in embryonic cells of the germ band (Figs. 1 and S4) is consistent with the conserved expression in neural progenitors/early differentiating neurons described in other model organisms (Cunningham and Casey, 2014; Berger et al., 2007; Ratti et al., 2006), and suggests that the definitive nervous system of the hatchling forms *de novo* beginning in stage 4, after the early transient embryo has fed on the maternally-supplied yolk. From stage 4 onwards, the newly differentiated neurons assemble into the CNS and PNS, and by stage 7, the stereotypical nervous system morphology is already visible (summarized in Fig. 9A). The juvenile is able to respond to stimuli, such as food and light, indicating that basic organogenesis is finished before hatching. Our results on the formation of the definitive nervous system show great similarity to the description provided by Cardona et al. (2005) during late embryogenesis, and are also consistent with the model of regeneration of the anterior CNS in adults, which is based on the localization of similar neural-specific markers (Fraguas et al., 2012; Cebrià et al., 2002b). There are, however, slight differences in our findings. For instance, dopaminergic, GABAergic and octopaminergic transcripts were detected at similar timings during adult regeneration (Fraguas et al., 2012; Nishimura et al., 2008a, 2008b, 2006), whereas dopaminergic neurons seem to appear first during embryogenesis (Fig. S5). Nevertheless, our results indicate that the general molecular mechanisms involved in embryonic development may be later redeployed during adult regeneration and asexual reproduction.

The transition from stage 4 to stage 5 appears to be critical in the morphogenesis of the nervous system as an embryo with dispersed neurons develops into a more organized stage, displaying a neural primordium composed of two ventro-lateral clusters of cells, each corresponding to half of the bipartite CNS, and neurons which probably are in the early steps of differentiation in the dorsal side of the embryo. From the clusters, the identity of the different neural organs is established: the rudiment of the brain is localized at the region opposite of the embryonic pharynx, demarcating the anterior pole of the embryo (Martín-Durán et al., 2010), as is supported by the expression of specific markers (Fig. S12 and Martín-Durán et al.,





**Fig. 5.** Expression of *soxB1* genes in developing/differentiated neurons and in mitotic cells during embryogenesis. (A, A', C–C', E, E', G, G', I and I') are z-projections of confocal stacks from whole-mount DFISH with *soxB1* genes (in red) and neural markers (in green) in embryos at stage 4, stage 5, and stage 7. In (B, B', D, D', F, F', H, H', J and J'), cells in division are labeled with the anti-H3p antibody (in green). The white arrowheads show cells where the expression of *soxB1* genes colocalize with that of neural genes, or either *soxB1* positive cells in mitosis; the white arrows point to cells expressing only *soxB1* genes. At stage 4, *Spol-soxB1-1* colocalizes in all the *Spol-elav-4* positive cells; some of these cells were in division. At stage 5 and during late embryogenesis, *soxB1* transcripts were detected, among others, in differentiating and/or differentiated neurons as well as in mitotic cells. At stage 7, they were localized in neurons of the brain, but while *Spol-soxB1-1* was expressed all along the brain region, *Spol-soxB1-2* was restricted to the outer-most part of the organ and the brain branches. In (E and I), the anterior is to the top. In (A, C, E and G), the white dashed lines delimit the boundaries of the embryo. In (B, D, F, H and J), the percentage of the total number of H3p positive cells that colocalized with *soxB1* genes is shown at the top; although not shown in the figure, at stage 3, *Spol-soxB1-1* was expressed in  $13.2\% \pm 0.6$  H3p positive cells. Scale bars, C, E, G and I, 200  $\mu\text{m}$ ; A, 100  $\mu\text{m}$ ; B, D, F, H and J, 50  $\mu\text{m}$ ; A', B', C', C', D', E', F', G', H', I' and J', 5  $\mu\text{m}$ .

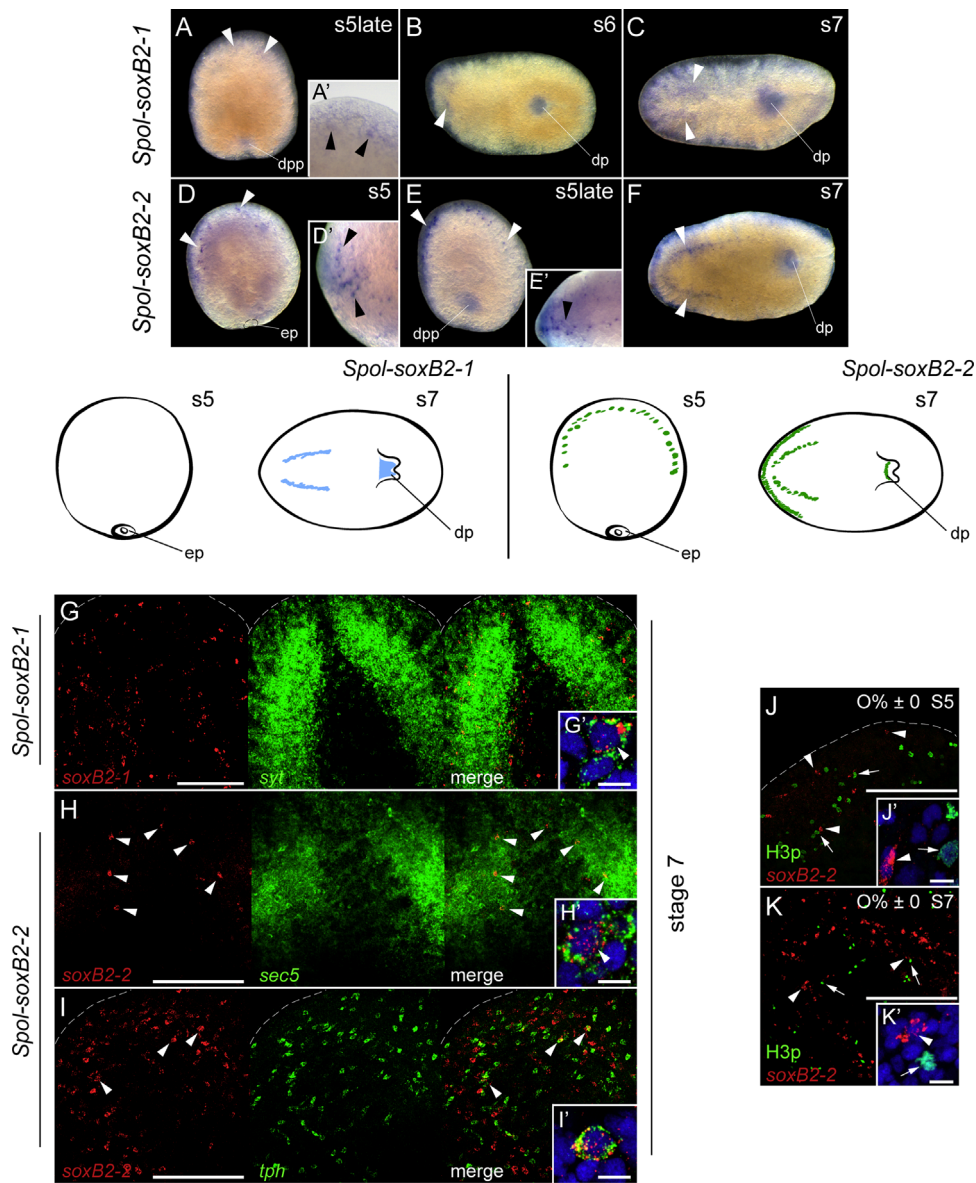
2012a); simultaneously, the VNC develop along the anteroposterior axis of the embryo. Therefore, in *S. polychroa*, both the brain and the VNC thus develop at the same time, which disagrees with the model of neural development proposed in *Polycelis nigra*, based only on morphological data (Moigne, 1966). In *P. nigra*, the brain is first formed in the anterior–ventral region in stage 5 embryos, and later the ventral nerve cords differentiate from there toward the posterior end. Characterizing neurogenesis in embryos of other planarian species to determine if the timing of brain and VNC differentiation, provided in *S. polychroa* is stereotypical within triclads, would be an important extension of our findings.

Finally, our results did not support the presence of star cells in the embryo during early development. As they were described (Cardona et al., 2006, 2005), star cells are cells of the germ band with a morphology similar to a highly-branched neuron, and thus, it was proposed that they are a primitive and transitory nervous system in the feeding embryo. However, their description was based on antibodies that can label either muscular or neuronal cells (Cardona et al., 2006, 2005). In our study, we tested an extensive number of neural-specific markers, and in no case did we detect cells with similar characteristics in early developing embryos. *Spol-Sec5*, a pan-neural gene, is the only marker that showed expression in the first stages, but it was detected in the embryonic pharynx (Fig. 1), and not in the germ band. It was

expressed in cells that are in close contact with the musculature of the pharynx until stage 5, (Fig. 1), probably forming a nerve plexus. At stage 5, *Spol-sec5* was also detected in the germ band, but this expression is associated with the formation of the definitive CNS. Our results, therefore, weaken the hypothesis of the existence of two separate nervous systems during planarian embryogenesis, and indicate that there is only one major event of neurogenesis, which is related to the formation of the definitive nervous system of the embryo/juvenile.

#### *soxB* genes in neural development

*soxB* genes are essential regulators of CNS development in most studied animals (Sarkar and Hochedlinger, 2013; Guth and Wegner, 2008). In vertebrates, the subgroups *soxB1* and *soxB2* have opposite roles during early neurogenesis: the *soxB1* subfamily is involved in conferring neuroectodermal competence and the maintenance of neural stem cells in a pluripotent and proliferative state, while genes of the *soxB2* group are involved in triggering neural differentiation in the progenitors (Guth and Wegner, 2008). This subfunctionalization, however, has not been fully confirmed in any non-vertebrate species. During *D. melagonaster* embryogenesis, both *SoxNeuro*, a *soxB1* gene, and *Dichaete*, a *soxB2* gene, show expression patterns and functions of both neuroectoderm-promoting *soxB1* and neural differentiation-

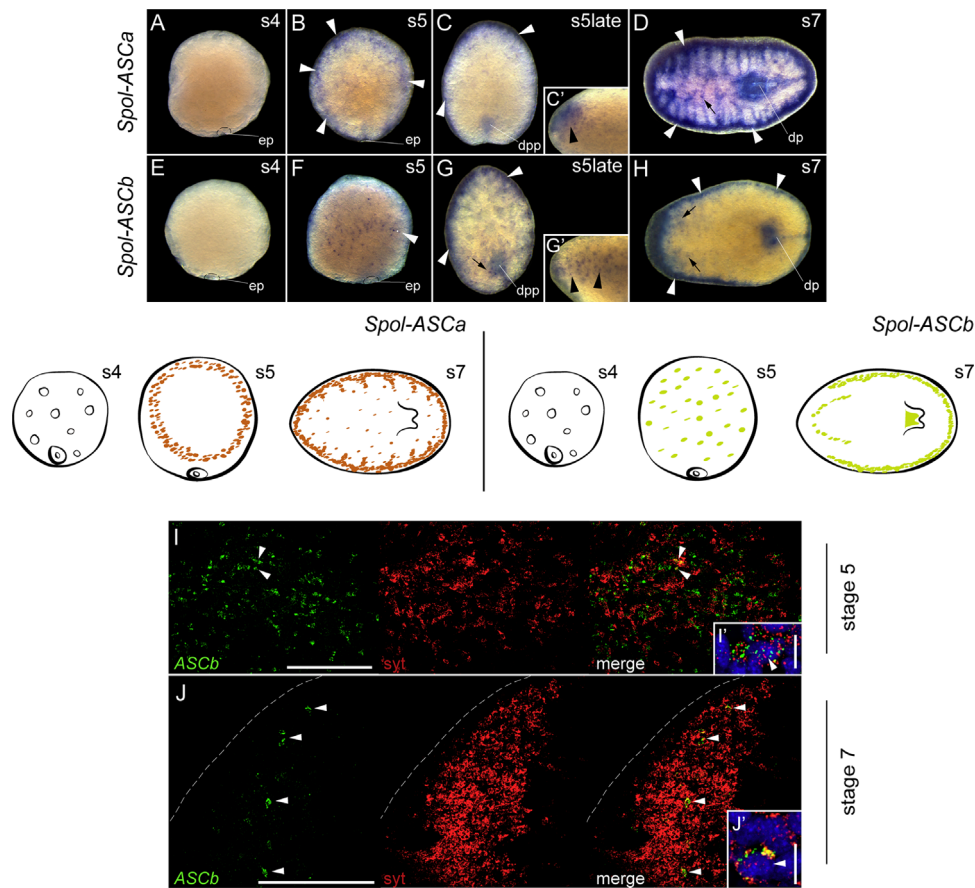


**Fig. 6.** Expression of *soxB2* genes during late embryogenesis. (A–F) are whole-mount *in situ* hybridizations of *Spol-soxB2-1* and *Spol-soxB2-2* in embryos at stage 5 (s5), late stage 5 (s5late), stage 6 (s6), and stage 7 (s7). The black and white arrowheads indicate CNS expression; (A') is an inset of the anterior region of the embryo viewed from the top with white background. *Spol-soxB2-2* was restricted to a discrete population of CNS cells, as is observed in the lateral–anterior views in (D' and E'). (G–I') are z-projections of confocal stacks from whole-mount DFISH with *soxB2* genes (in red) and neural markers (in green) in embryos at stage 7. In (J–K'), cells in division are labeled with the anti-H3p antibody (in green). The white arrowheads show cells where *soxB2* genes colocalize with pan-neural markers, and in (I and I'), with *Spol-tph*, a marker specific of serotonergic neurons; in (J–K'), they indicate *soxB2* positive cells. The white arrows in (J–K') point to cells in proliferation. Both *soxB2* genes were detected in differentiated neurons, and *Spol-soxB2-2* in serotonergic cells; *Spol-soxB2-2* expression was never observed in cells in mitosis. Most stages are oriented as described in Fig. S1, except in (D' and E'), where the anterior is to the left and the dorsal to the top and in (G, H, I and K), where the anterior is to the top. In (D) the dashed line encircles the embryonic pharynx; in (G, I and J) the white dashed line delimits the boundaries of the embryo. In (J and K), the percentage of the total number of H3p positive cells that colocalized with *Spol-soxB2-2* transcripts is shown at the top. Drawings represent the expression of the genes, but are not to scale. dp, definitive pharynx; dpp, definitive pharynx primordium; ep, embryonic pharynx. Scale bars, G, 150  $\mu$ m; H, I and K, 100  $\mu$ m; J, 75  $\mu$ m; G', H', I', J' and K', 5  $\mu$ m.

promoting *soxB2* genes (Buescher et al., 2002; Overton et al., 2002; Zhao and Skeath, 2002). Moreover, a recent study demonstrated that *Dichaete* acts as a transcriptional activator of the gene regulatory networks involved in the maintenance of neuroblasts in a self-renewal state, like vertebrate *soxB1* genes (Aleksic et al., 2013).

Within spiralian, *soxB* orthologs have been characterized in few species. The only gene studied in the mollusk *P. vulgata* is probably a *soxB1* member (Kerner et al., 2009) and is detected in the prospective neuroectoderm (Le Gouar et al., 2004), but no expression is reported for *soxB2* genes. In contrast, in the annelid *P. dumerilii*, *Pd-SoxB*, an ortholog of the *soxB2* group (Fig. S7 and Kerner et al., 2009), is detected only in neuroectodermal cells, in a similar fashion to the

canonic expression of the vertebrate *soxB1* group (Kerner et al., 2009). Finally, in the planarian *S. mediterranea*, a *soxB* gene is expressed in an anterior population of photoreceptors and is required for its differentiation from eye progenitors (Lapan and Reddien, 2012); this gene and a putative ortholog of the *soxB2* group are also detected in the brain in intact animals and in a specific population of neoblasts following anterior amputation (Scimone et al., 2014), but their role during CNS development was not investigated in detail. Our results demonstrate that *S. polychroa* presents genes of both *soxB1* and *soxB2* subfamilies (Figs. S6 and S7) and suggest that the triclade complement may have resulted from a lineage specific duplication, as the ancestral state within Bilateria is a single gene



**Fig. 7.** Expression of *achaete-scute* genes in developing embryos. (A–H) are whole-mount *in situ* hybridizations of *Spol-ASCa* and *Spol-ASCb* in embryos at stage 4 (s4), stage 5 (s5), late stage 5 (s5late), and stage 7 (s7). The large white arrowheads in (B) show the expression of *Spol-ASCa* in the lateral region, and, in (F), that of *Spol-ASCb* in disperse cells of the germ band; the arrowheads in (C, D, G and H) indicate expression in the margin of the embryo. The black arrow in (D) indicates expression in the parenchyma, cells around the embryonic pharynx primordium in (G), and the brain in (H). *asc* genes were not expressed in stage 4 embryos. At late stage 5, *Spol-ASCa* was detected strongly in the anterior margin of the embryo; in contrast, the expression of *Spol-ASCb* in this region was more homogeneous, as is observed in lateral-anterior views in (C' and G'). (I–J') are z-projections of confocal stacks from DFISH with *Spol-ASCb* (in green) and with *Spol-syt* (in red) in stage 5 and stage 7 embryos. The white arrowheads point to *Spol-ASCb* and *Spol-syt* positive cells; the proneural gene was expressed in differentiated neurons both at stage 5 and stage 7. Most embryos are oriented as described in Fig. S1, except in (C' and G'), where the anterior is to the left and the dorsal to the top. In (A, E and F), the dashed line encircles the embryonic pharynx; in (J), the white dashed lines delimit the boundaries of the embryo. Drawings represent the expression of the genes but are not to scale. dp, definitive pharynx; dpp, definitive pharynx primordium; ep, embryonic pharynx. Scale bars, I and J, 75  $\mu$ m; I' and J', 5  $\mu$ m.

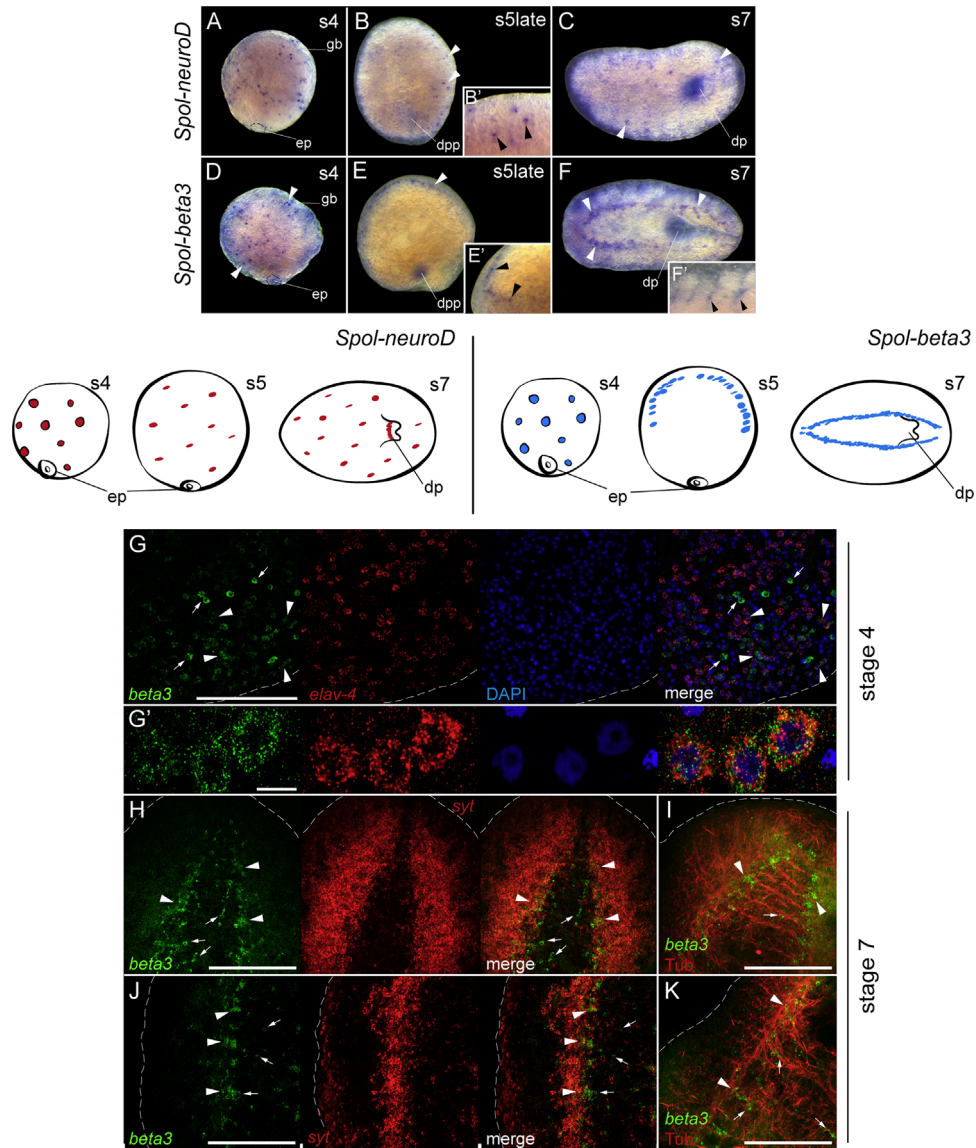
copy for each group (Zhong et al., 2011). Analysis of their expression may be consistent with a subfunctionalization akin to the roles in vertebrates.

We have shown that *Spol-soxB1-1*, a *soxB1* ortholog, is expressed during early development before pan-neural genes are detected in the CNS, in a subset of isolated blastomeres and embryonic cells in division, and later, at stage 4, in all of the putative developing neurons (Figs. 4 and 5). This gene and *Spol-soxB1-2*, the other planarian *soxB1* ortholog, are detected, among other cell types, in a subpopulation of cycling cells during late embryogenesis (Fig. 5). In *S. polychroa*, after the cleavage of the zygote, groups of blastomeres are set apart in the syncytium and differentiate into the transient embryonic epidermis and pharynx, while others that express stem cell markers remain wandering and undifferentiated (Solana et al., 2009; Solana and Romero, 2009; Cardona et al., 2005). The embryonic cells resulting from the division of the migrant blastomeres become the putative progenitors of all the tissues and organs of the definitive embryo after the ingestion of the yolk (Martín-Durán et al., 2012b), and give rise to the cellular subset that eventually develops into the neoblasts (Solana et al., 2009; Solana and Romero, 2009). The expression of evolutionary conserved genes involved in mesoderm differentiation and endoderm regionalization in the embryonic pharynx (Martín-Durán et al., 2010), and of *Spol-GATA456a*, a

transcription factor related to the development of the endoderm in embryonic cells (Martín-Durán and Romero, 2011) indicate that the molecular mechanisms of germ-layer segregation and determination are probably active by stage 2/3 in different subpopulations of isolated blastomeres. Thus, the pattern exhibited by *soxB1* genes throughout embryonic development suggests that it could be related to the early steps of neurogenesis, the specification of neural progenitors (embryonic cells positive for *Spol-soxB1-1* at stage 3–4), and later their maintenance in the adult worm (stem cells positive for *Spol-soxB1-1* and *Spol-soxB1-2*). In contrast, *Spol-soxB2-1* and *Spol-soxB2-2*, the two *soxB2* paralogs, are expressed in cells and organs of the CNS from stage 5 onwards (Figs. 6 and S2), and their role is probably associated with the development of these neurons. Overall, these results suggest that triclad *soxB* genes have a conserved expression during embryonic neurogenesis similar to that observed in vertebrates (summarized in Fig. 9B), which supports the ancestry in bilaterians of the functional subdivision of the groups *B1* and *B2*.

*soxB1* genes are also expressed in the CNS in later stages, in differentiating neurons at stage 5 and in cells of the brain at stage 7 (Figs. 5 and S8). Recent studies demonstrate that some members of the *B1* group are involved in neural maturation and maintenance starting in late neurogenesis and continuing throughout





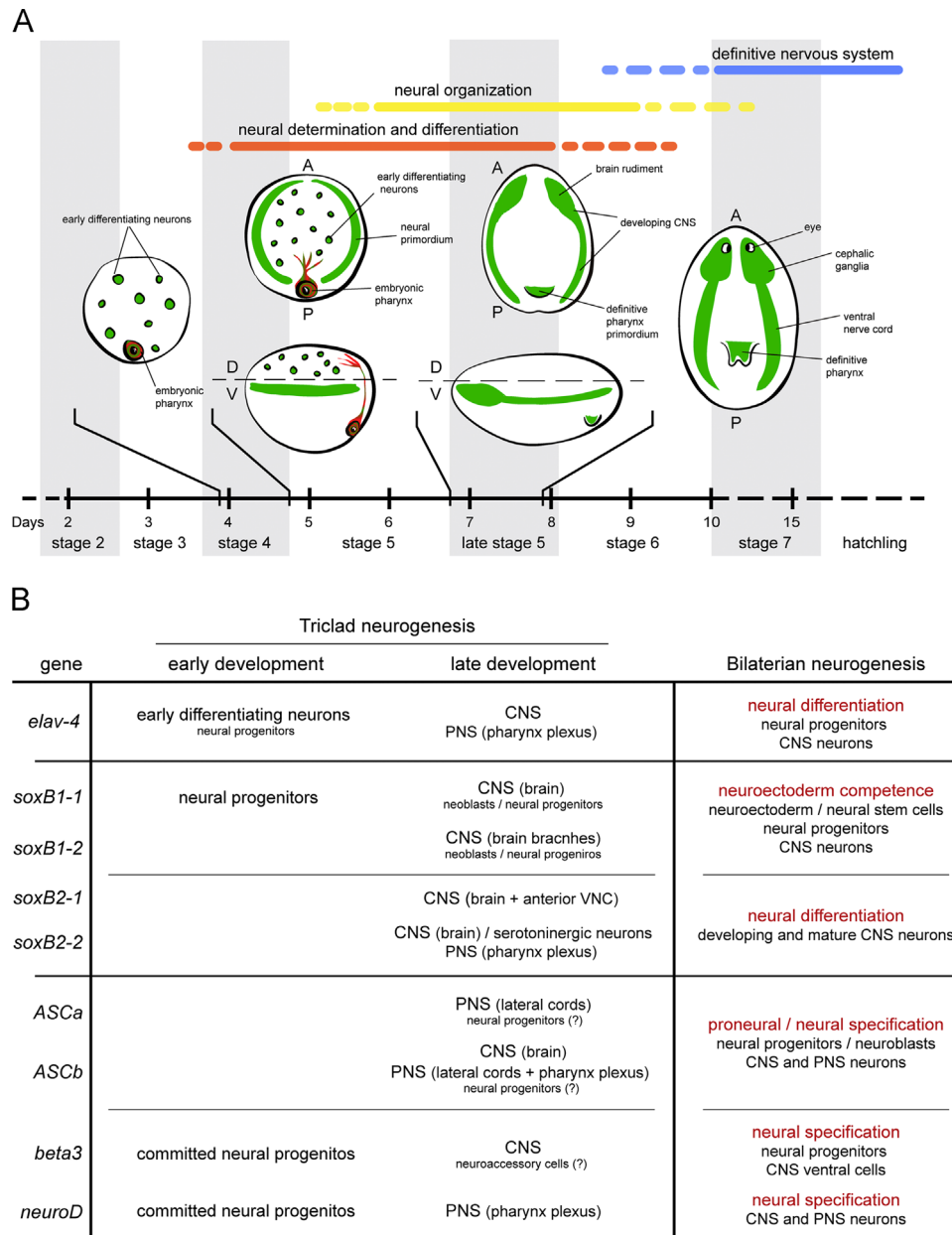
**Fig. 8.** Expression of *atonal* genes in developing embryos. (A–F) Are whole-mount *in situ* hybridizations of *Spol-neuroD* and *Spol-beta3* in embryos at stage 4 (s4), late stage 5 (s5late), and stage 7 (s7). In (B and C), the black and white arrowheads show expression of *Spol-neuroD* in ventral cells of the parenchyma; (B') is an inset of the ventral surface of the embryo viewed from the top. In (D–F'), the black and white arrowheads point to embryonic cells and in later stages, to CNS cells; (E' and F') are, respectively, insets of the lateral–anterior region and ventral surface of the embryos viewed from the top. (G–K) are z-projections of confocal stacks from whole-mount DFISH with *Spol-beta3* (in green) and neural markers (in red) in stage 4 and stage 7 embryos. In (I and K), neural structures and axons are labeled with anti- $\alpha$ -tubulin antibody (in red). The white arrowheads show cells or clusters of cells positive for *Spol-beta3* and neural markers, while the white arrows show only *Spol-beta3* positive cells. At late stages, *Spol-beta3* clusters are localized in the ventral inner-most region of the CNS. Most stages are oriented as reported in Fig. S1, except in (E'), where the anterior is to the left and the dorsal to the top as well as in (B' and F'), where the anterior is to the left. In (A and D), the dashed line encircles the embryonic pharynx; in (G–K), the white dashed lines delimit the boundaries of the embryo. Drawings represent the expression of the genes but are not to scale. dp, definitive pharynx; dpp, definitive pharynx primordium; ep, embryonic pharynx. Scale bars, H–K, 200  $\mu$ m; A, 75  $\mu$ m; G', 5  $\mu$ m.

adulthood in vertebrates (Guth and Wegner, 2008). The late *soxB* function in neural maturation appears to be conserved in protostomes, as *soxB* genes of *Drosophila* also regulate the development of subsets of brain neurons (Phochanukul and Russell, 2010). Thus, the expression of *Spol-soxB1-1* and *Spol-soxB1-2* may be consistent with an ancestral function in neural differentiation during late neurogenesis.

#### Planarian proneural bHLH genes and specification of neural cell types

In spiralian, *asc* genes have been studied in embryos of the polychaete annelids *C. teleta* and *P. dumerilii* (Meyer and Seaver, 2009; Simionato et al., 2008) and during regeneration and homeostasis of the planaria *S. mediterranea* (Cowles et al., 2013). In *C. teleta*,

an *asc* gene is expressed in the anterior ectoderm and in presumptive neural precursor cells during the formation of the brain (Meyer and Seaver, 2009), and the *asc* ortholog of *P. dumerilii* is detected in the ventral neuroectoderm and later on in the medial part of the VNC and in sensory cells of the PNS (Simionato et al., 2008). In both cases, their patterns are consistent with an ancestral role in neural specification in metazoans. In *S. mediterranea*, two *asc*-like genes are detected in stem cells of the parenchyma, and at least one of them (*ascl-1*) is necessary for the correct differentiation of neural lineages (Cowles et al., 2013). We identified two *S. polychroa asc* paralogs in this work (Fig. S9), and we confirmed that *Spol-ASCB* corresponds to the *S. mediterranea ascl-2* ortholog, while *Spol-ASCa* is a novel gene. Both transcription factors are expressed in specific populations of putative neural progenitors (*Spol-soxB1-1* positive



**Fig. 9.** Summary of neural development during *S. polychroa* embryogenesis. (A) indicates the proposed model of neurogenesis in planarian embryos based on the expression of neural-specific genes and the immunolocalization of serotonin and FMRFamide. Early differentiating neurons (*Spol-elav-4* positive cells) or the CNS along with the definitive pharynx nerve plexus are shown in green. The musculature of the embryonic pharynx and the characteristic posterior bundle of muscular cells are shown in red. The green coloring in the embryonic pharynx reflects the expression of *Spol-sec5* in this organ; in stage 5 embryos, the green coloring in the bundle of muscular cells indicates the expression of *Spol-elav-4* in this region, which is probably associated with the development of the nerve plexus of the definitive pharynx. Drawings are not to scale. A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral. (B) Shows the comparative expression of *elav*, *soxB*, and proneural *bHLH* genes between the triclad *S. polychroa* and a prototypic bilaterian. The name of the planarian orthologs that were characterized in this study are shown in the first column. The putative ancestral function of the genes during neurogenesis (see main text for references) is highlighted in red.

cells; Figs. S4 and S11), but only the neural-related pattern of *Spol-ASCb* in developing embryos and hatchlings (Figs. 7, S2 and S4) supports a role for this gene in the specification of CNS cells. *Spol-ASCa* and *Spol-ASCb* are also detected in the lateral margin of the animal (Figs. 7 and S2), in a similar distribution to that of sensory cells of the lateral cords, and could be implicated in PNS development. Future studies using molecular markers specific for this system should be undertaken to confirm this possibility.

*neuroD* genes have been characterized in spiralian exclusively in the polychaete annelid *P. dumerilii* (Simionato et al., 2008) and the triclad *S. mediterranea* (Cowles et al., 2013). The early neuroectodermal expression of *Pd-NeuroD*, which is completely different from the

late neural expression characteristic of other animals (Bertrand et al., 2002), suggests a role only in the establishment of this tissue in annelids. In *S. mediterranea*, one *neuroD* gene is expressed in CNS cells and seems to be implicated, like *asc* genes, in neural subtype specification (Cowles et al., 2013). Here, we identify one *neuroD* ortholog (Fig. S10) that is expressed in a subpopulation of early neural progenitors (Fig. S4) and in the nerve plexus of the definitive pharynx (Figs. 8 and S2), therefore supporting its role as a proneural gene.

*beta3* genes are one of the less-studied groups of proneural *bHLH* genes. When investigated, genes of this family are usually detected with a neural-specific pattern in subpopulations of neurons of the

CNS (Zhang et al., 2008; Adolf et al., 2004; Brunelli et al., 2003; Kim et al., 2002). *Spol-beta3* (Fig. S10) is the first spiralian ortholog to be characterized in detail. The dynamic expression of this gene during embryogenesis (Figs. 8 and S2) resembles that reported in vertebrates and arthropods and is consistent with an ancestral role in the commitment of neural progenitors (Oyallon et al., 2012; Skaggs et al., 2011; Ross et al., 2010; Joshi et al., 2008): *Spol-beta3* is first expressed in presumptive early differentiating neurons and later in the CNS, in cells that, like in *D. melanogaster* (Zhang et al., 2008), are ventrally located within the brain and the VNC. *Spol-beta3* is also detected in a non-neural cellular population in close contact with neural structures, both during embryogenesis and in the definitive CNS (Fig. 8). Neuroaccessory cells (or glia-like cells) adjacent to the planarian CNS have been previously described at the ultrastructural level using electron microscopy techniques (Morita and Best, 1966), but no molecular markers have convincingly shown their presence and/or distribution (Cebrià, 2007). Our hypothesis is that the non-neural *Spol-beta3* cellular population could be composed of some kind of planarian glial cells, but, in the future, it will be necessary to improve the characterization of these cells by means of functional and complementary expression studies using conserved markers of the neuroglia.

## Conclusions

Using molecular data, we have characterized the embryonic development of the nervous system in *S. polychroa* embryos. Our results indicate that the definitive nervous system develops from isolated cells in the germ band from stage 4 onwards. The early yolk-feeding embryo only shows expression of neural-related genes in the embryonic pharynx, likely in a simple nerve plexus required for its proper function. The expression of *soxB* and proneural *bHLH* genes suggests that triclad neurogenesis exhibits similarities with the evolutionarily conserved mechanisms of neurogenesis described in mainstream developmental model systems (summarized in Fig. 9B). Our work thus provides a better understanding of the evolution of the neural-specific gene regulatory network in bilaterians, as well as a basic framework for further studies in planarian nervous system development.

## Acknowledgements

We thank M. Vila-Farré and members of the laboratories of E. Saló and F. Cebrià, especially T. Adell and F. Cebrià for their support and suggestions. Special thanks to M. Almuedo and J. M. Martín-Durán for discussion and comments that helped to improve the manuscript and B. V. Schardin for English-language editing. The monoclonal antibody AA4.3 developed by Charles Walsh was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. F. M. was an APIF fellow from the University of Barcelona, Spain. This study was supported by grants BFU-2007-63209 and BFU-2010-19119 from MEC (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain).

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.10.021>.

## References

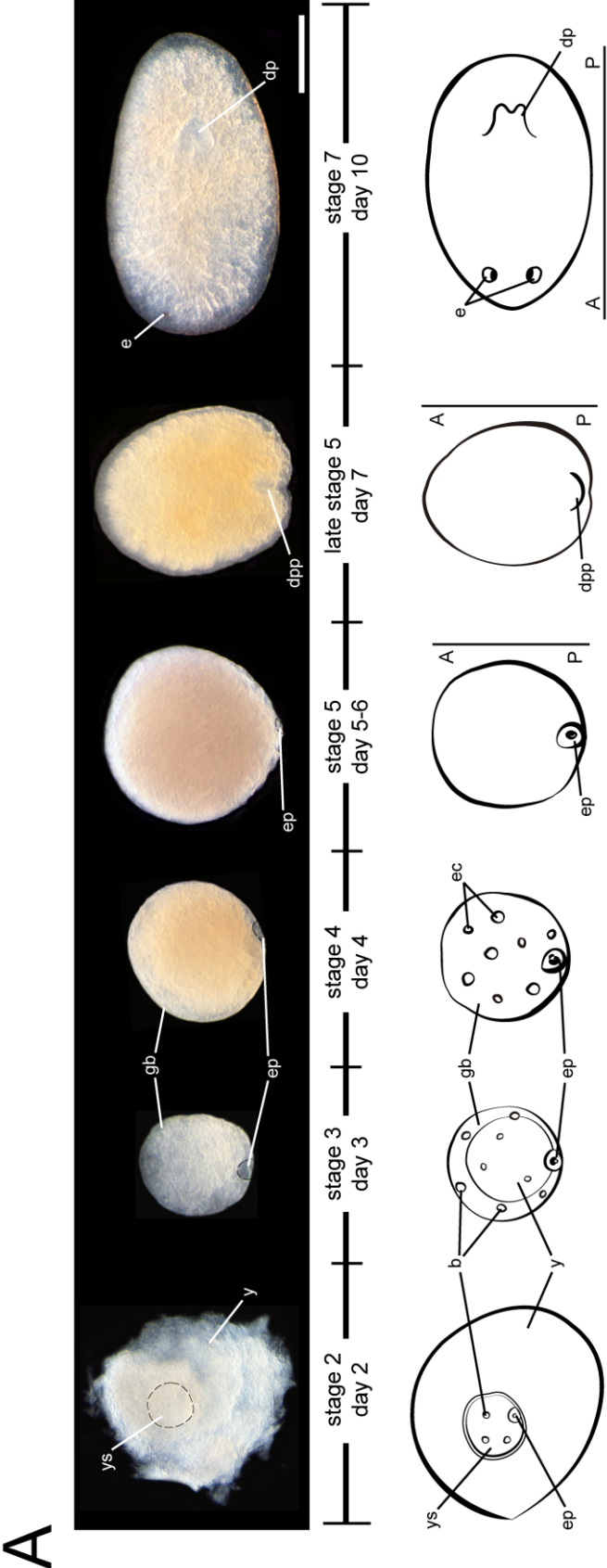
Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D., 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104–2105.

- Adolf, B., Bellipanni, G., Huber, V., Bally-Cuif, L., 2004. *atoh1.2* and *beta3.1* are two new bHLH-encoding genes expressed in selective precursor cells of the zebrafish anterior hindbrain. *Gene Expr. Patterns* 5, 35–41.
- Agata, K., Soejima, Y., Kato, K., Kobayashi, C., Umesono, Y., Watanabe, K., 1998. Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. *Zool. Sci.* 15, 433–440.
- Aleksic, J., Ferrero, E., Fischer, B., Shen, S.P., Russell, S., 2013. The role of Dichaete in transcriptional regulation during *Drosophila* embryonic development. *BMC Genomics* 14, 861.
- Arendt, D., Denes, A.S., Jékely, G., Tessmar-Raible, K., 2008. The evolution of nervous system centralization. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 363, 1523–1528.
- Baguña, J., 1974. A demonstration of a peripheral and a gastrodermal nervous plexus in planarians. *Zool. Anz.* 193, 240–244.
- Baguña, J., Ballester, R., 1978. The nervous system in planarians: peripheral and gastrodermal plexuses, pharynx innervations and the relationship between central nervous system structure and the acoelomate organization. *J. Morphol.* 155, 37–252.
- Berger, C., Renner, S., Lüer, K., Technau, G.M., 2007. The commonly used marker ELAV is transiently expressed in neuroblasts and glial cells in the *Drosophila* embryonic CNS. *Dev. Dyn.* 236, 3562–3568.
- Bertrand, N., Catro, D.S., Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517–530.
- Brunelli, S., Innocenzi, A., Cossu, G., 2003. *Bhlhb5* is expressed in the CNS and sensory organs during mouse embryonic development. *Gene Expr. Patterns* 3, 755–759.
- Buescher, M., Hing, F.S., Chia, W., 2002. Formation of neuroblast in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster* is controlled by *SoxNeuro*. *Development* 129, 4193–4203.
- Buresi, A., Canali, E., Bonnaud, L., Baratte, S., 2013. Delayed and asynchronous ganglionic maturation during cephalopod neurogenesis as evidenced by *Sof-elav1* expression in embryos of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). *J. Comp. Neurol.* 521, 1482–1496.
- Cardona, A., Hartenstein, V., Romero, R., 2006. Early embryogenesis of planaria: a cryptic larva feeding on maternal resources. *Dev. Genes Evol.* 216, 667–681.
- Cardona, A., Hartenstein, V., Romero, R., 2005. The embryonic development of the triclad *Schmidtea polychroa*. *Dev. Genes Evol.* 215, 109–131.
- Cebrià, F., 2008. Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: an immunocytochemical study. *Neurosci. Res.* 61, 375–381.
- Cebrià, F., 2007. Regenerating the central nervous system: how easy for planarians!. *Dev. Genes Evol.* 217, 733–748.
- Cebrià, F., Kobayashi, C., Umesono, Y., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Itoh, M., Taira, M., Sánchez 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.
- Cebrià, F., Vispo, M., Newmark, P.A., Bueno, D., Romero, R., 1997. Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian *Girardia tigrina*. *Dev. Genes Evol.* 207, 306–316.
- Choksi, S.P., Southall, T.D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B.E., van Steensel, B., Micklem, G., Brand, A.H., 2006. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Dev. Cell* 11, pp. 775–789.
- Cowles, M.W., Brown, D.D., Nisperos, S.V., Stanley, B.N., Pearson, B.J., Zayas, R.M., 2013. Genome-wide analysis of the bHLH gene family in planarians identifies factors required for adult neurogenesis and neuronal regeneration. *Development* 140, 4691–4702.
- Cunningham, D., Casey, E.S., 2014. Spatiotemporal development of the embryonic nervous system of *Saccoglossus kowalevskii*. *Dev. Biol.* 386, 252–263.
- Currie, K.W., 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.
- Demilly, A., Steinmetz, P., Gazave, E., Marchand, L., Vervoort, M., 2013. Involvement of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in neuroectoderm architecture in *Platynereis dumerilii*. *Nat. Commun.* 4, 1915.
- Denes, A.S., Jékely, G., Steinmetz, P.R., Raible, F., Snyman, H., Prud'homme, B., Ferrier, D.E., Balavoine, G., Arendt, D., 2007. Molecular architecture of annelid nerve cords supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell* 129, 277–288.
- Dunn, C.W., Hejnol, A., Matus, D.Q., Pang, K., Browne, W.E., Smith, S.A., Seaver, E., Rouse, G.W., Obst, M., Edgecombe, G.D., Sørensen, M.W., Haddock, S.H., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A., Kristensen, R.M., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q., Giribert, G., 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745–749.
- Fraguas, S., Barberán, S., Ibarra, B., Stöger, L., Cebrià, C., 2012. Regeneration of neuronal cell types in *Schmidtea mediterranea*: an immunohistochemical and expression study. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 143–153.
- Frohman, M.A., 1994. On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Meth. Appl.* 4, 40–58.
- Galliot, B., Quiquand, M., 2011. A two-step process in the emergence of neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 34, 847–862.
- Galliot, B., Quiquand, M., Ghila, L., de Rosa, R., Miljkovic-Licina, M., Chera, S., 2009. Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Dev. Biol.* 332, 2–24.
- Guth, S.I., Wegner, M., 2008. Having it both ways: sox protein function between conservation and innovation. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3000–3018.

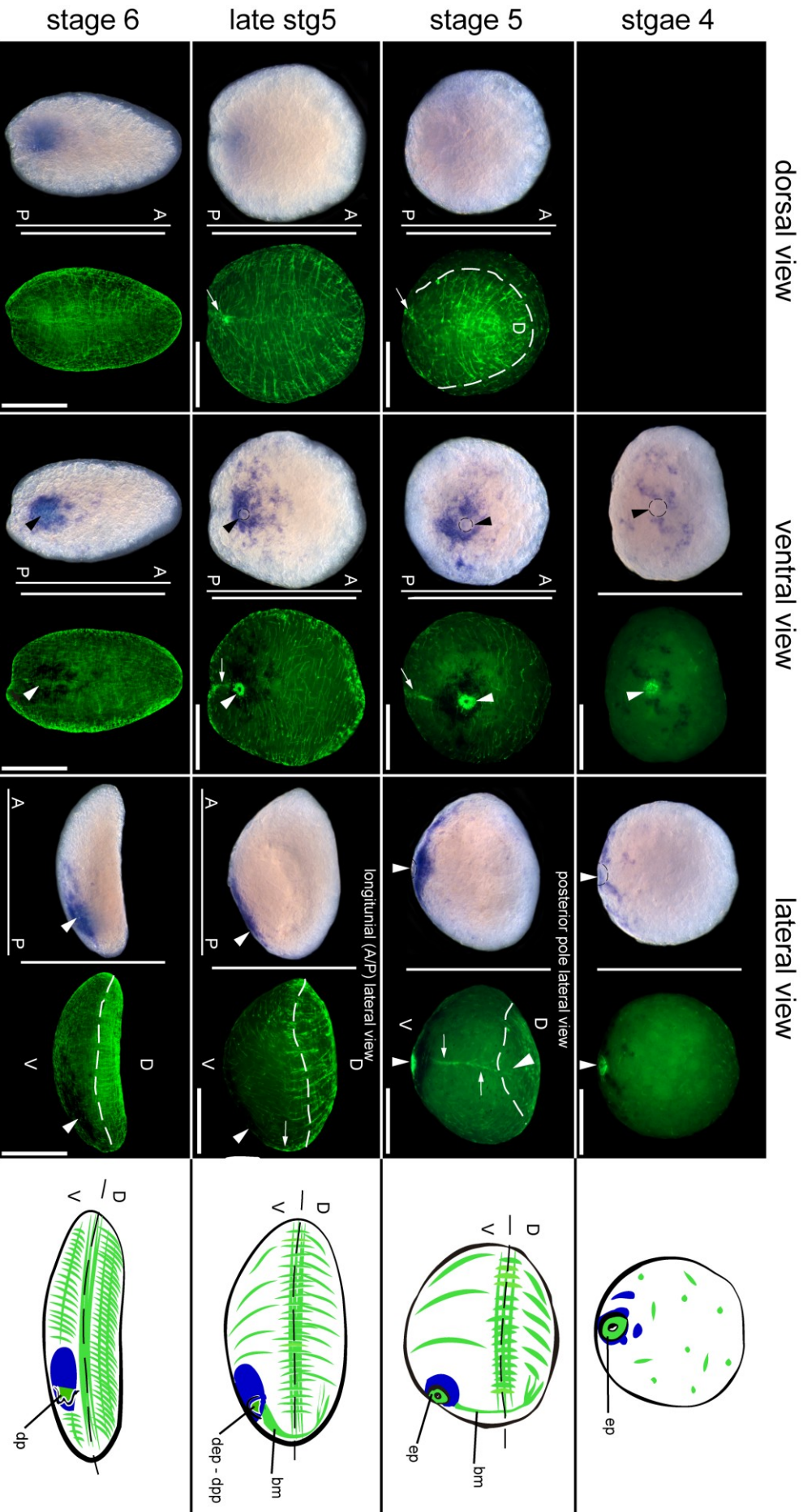


- Higuchi, S., Hayashi, T., Tarui, H., Nishimura, O., Nishimura, K., Shibata, N., Sakamoto, H., Agata, K., 2008. Expression and functional analysis of *musashi*-like genes in planarian CNS regeneration. *Mech. Dev.* 125, 631–645.
- Hirth, F., 2010. On the origin and evolution of the tripartite brain. *Brain Behav. Evol.* 76, 3–10.
- Hyman, L.H., 1951. *The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela*. McGraw-Hill, New York.
- Inoue, T., Hayashi, T., Takechi, K., 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.
- Joshi, P.S., Molyneaux, B.J., Feng, L., Xie, X., Macklis, J.D., Gan, L., 2008. *Bhlhb5* regulates the postmitotic acquisition of area identities in layers II–V of the developing neocortex. *Neuron* 60, 258–272.
- Katoh, K., Toh, H., 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinf.* 9, 286–298.
- Kerner, P., Simionato, E., Le Gouar, M., Vervoort, M., 2009. Orthologs of key vertebrate neural genes are expressed during neurogenesis in the annelid *Platynereis dumerilii*. *Evol. Dev.* 11, 513–524.
- Kim, M.H., Gunnarsen, J., Augustine, C., Tan, S.S., 2002. Region-specific expression of the helix-loop-helix gene *BETA3* in developing and adult brains. *Mech. Dev.* 114, 125–128.
- Lapan, S.W., Reddien, P.W., 2012. Transcriptome analysis of the planarian eye identifies *ovo* as a specific regulator of eye regeneration. *Cell Rep* 2, 294–307.
- Larroux, C., Luke, G.N., Koopman, P., Rokhsar, D.S., Shimeld, S.M., Degnan, B.M., 2008. Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol. Biol. Evol.* 25, 980–996.
- Layden, M.J., Boekhout, M., Martindale, M.Q., 2012. *Nematostella vectensis ascahete-scute* homolog *NvashA* regulates embryonic ectodermal neurogenesis and represents an ancient component of the metazoan neural specification pathway. *Development* 139, 1013–1022.
- Le Gouar, M., Guillou, A., Vervoort, M., 2004. Expression of a *SoxB* and a *Wnt2/13* gene during the development of the mollusc *Patella vulgata*. *Dev. Genes Evol.* 214, 250–256.
- Moigne, L.E., 1966. Etude du développement embryonnaire et recherches sur les cellules de régénération chez l'embryon de la Planaire *Polycelis nigra* (Turbellarié, Tricladé). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 15, 39–60.
- Martín-Durán, J.M., Monjo, F., Romero, R., 2012a. Morphological and molecular development of the eyes during embryogenesis of the freshwater planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev. Genes Evol.* 222, 45–54.
- Martín-Durán, J.M., Monjo, F., Romero, R., 2012b. Planarian embryology in the era of comparative developmental biology. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 39–48.
- Martín-Durán, J.M., 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., 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.
- Martín-Durán, J.M., Duocastella, M., Serra, P., Romero, R., 2008. New method to deliver exogenous material into developing planarian embryos. *J. Exp. Zool. B: Mol. Dev. Evol.* 310, 668–681.
- 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.
- Meyer, P.M., Seaver, E.C., 2009. Neurogenesis in an annelid: characterization of *brain* neural precursors in the polychaete *Capitella* sp. I. *Dev. Biol.* 335, 237–252.
- Mineta, K., Nakazawa, M., Cebrià, F., Ikeo, K., Agata, K., Gojobori, T., 2003. Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by comparative genomics analysis of planarian ESTs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7666–7671.
- Mizutani, C.M., Bier, E., 2008. *AdvD/Vo*: the origins of BMP signalling in the neuroectoderm. *Nat. Rev. Genet.* 9, 663–677.
- Morita, M., Best, J.B., 1966. Electron microscopic studies of Planaria. 3. Some observations on the fine structure of planarian nervous tissue. *J. Exp. Zool.* 161, 391–411.
- Nederbragt, A.J., te Welscher, P., van der Driesche, S., van Loon, A.E., Dictus, W.J., 2002. Novel and conserved roles for *orthodenticle/otx* and *orthopedia/otp* orthologs in the gasteropod mollusc *Patella vulgata*. *Dev. Genes Evol.* 212, 330–337.
- Nakazawa, N., Cebrià, F., Mineta, K., Ikeo, K., Agata, K., Gojobori, T., 2003. Search for the evolutionary origin of a brain: planarian brain characterized by microarray. *Mol. Biol. Evol.* 20, 784–791.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Yoshimoto, K., Taniguchi, T., Agata, K., 2008a. Characterization of tyramine  $\beta$ -hydroxylase in planarian *Dugesia japonica*: cloning and expression. *Neurochem. Int.* 53, 184–192.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Umesono, Y., Takeuchi, K., Takata, K., Taniguchi, T., Agata, K., 2008b. Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience* 153, 1103–1114.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Sano, S., Yoshimoto, K., Inden, M., Takata, K., Taniguchi, T., Shimohama, S., Agata, K., 2006. Reconstruction of dopaminergic neural network and locomotion function in planarian regenerates. *Dev. Neurobiol.* 67, 1059–1078.
- Okano, H., Imai, T., Okabe, M., 2002. *Musashi*: a translational regulator of cell fate. *J. Cell Sci.* 115, 1355–1359.
- Önar, P., Grün, D., Adamidi, C., Rybak, A., Solana, J., Mastrobuoni, G., Wang, Y., Rahn, H.P., Chen, W., Kempa, S., Ziebold, U., Rajewsky, N., 2012. Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *EMBO J.* 31, 2755–2769.
- Overton, P.M., Meadows, L.A., Urban, J., Russell, S., 2002. Evidence for differential and redundant function of the *Sox* genes *Dichaete* and *SoxN* during CNS development in *Drosophila*. *Development* 129, 4219–4228.
- Oyallon, J., Apitz, H., Miguel-Aliaga, I., Timofeev, K., Ferreira, L., Salecker, I., 2012. Regulation of locomotion and motoneuron trajectory selection and targeting by the *Drosophila* homolog of *Oli* family transcription factors. *Dev. Biol.* 369, 261–276.
- Pascale, A., Amadio, M., Quattrone, A., 2008. Defining a neuron: neuronal ELAV proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 128–140.
- Phochanukul, N., Russell, S., 2010. No backbone but lots of *Sox*: invertebrate *Sox* genes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 453–464.
- Quan, X.J., Hassan, B.A., 2005. From skin to nerve: flies, vertebrates and the first helix. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2036–2049.
- Ratti, A., Fallini, C., Cova, L., Fantozzi, R., Calzarossa, C., Zennaro, W., Pascale, A., Quattrone, A., Silani, V., 2006. A role for the ELAV RNA-binding proteins in neural stem cells: stabilization of *Msi1* mRNA. *J. Cell Sci.* 119, 1442–1452.
- Reddien, P.W., Newmark, P.A., Sánchez Alvarado, A., 2008. Gene nomenclature guidelines for the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev. Dyn.* 237, 3099–3101.
- Reddien, P.W., Bermange, A.L., Murfitt, K.J., Jennings, J.R., 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.
- Reddien, P.W., Sánchez Alvarado, A., 2004. Fundamentals of planarian regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 725–757.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Ross, S.E., Mardinly, A.R., McCord, A.E., Zurawski, J., Cohen, S., Jung, C., Hu, L., Mok, S.I., Shah, A., Savner, E.M., Toliás, C., Corfas, R., Chen, S., Inqumbert, P., Xu, Y., McInness, R.R., Rice, F.L., Corfas, G., Ma, Q., Woolf, C.J., Greenberg, M.E., 2010. Loss of inhibitory interneurons in the dorsal spinal cord and elevated itch in *Bhlhb5* mutant mice. *Neuron* 65, 886–898.
- Royo, J.L., Maeso, I., Irimia, M., Gao, F., Peter, I.S., Lopes, C.S., D'Aniello, S., Casares, F., Davidson, E.H., Garcia-Fernández, J., Gómez-Skarmeta, J.L., 2011. Transphyletic conservation of developmental regulatory state in animal evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 14186–14191.
- Sarkar, A., Hochedinger, K., 2013. The *sox* family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* 12, 15–30.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D.J., Hartenstein, V., Elceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Scimone, M.L., Kravarik, K.M., Lapan, S.W., Reddien, P.W., 2014. Neoblast specialization in regeneration of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Stem Cell Rep.* 3, 339–352.
- Simionato, E., Kerner, P., Dray, N., Le Gouar, M., Ledent, V., Arendt, D., Vervoort, M., 2008. *atonal*- and *achaete-scute*-related genes in the annelid *Platynereis dumerilii*: insights into the evolution of neural basic-helix-loop-helix genes. *BMC Evol. Biol.* 8, 170.
- Simionato, E., Ledent, V., Richards, G., Thomas-Chollier, M., Kerner, P., Coornaert, D., Degnan, B., Vervoort, M., 2007. Origin and diversification of the basic helix-loop-helix gene family in metazoans: insights from comparative genomics. *BMC Evol. Biol.* 7, 33.
- Skaggs, K., Martin, D.M., Novitch, B.G., 2011. Regulation of spinal interneuron development by the Olig-related protein *Bhlhb5* and Notch signaling. *Development* 138, 3199–3211.
- Solana, J., Lasko, P., Romero, R., 2009. *Spoltud-1* is a chromatoid body component required for planarian long-term stem cell self-renewal. *Dev. Biol.* 328, 410–421.
- Solana, J., Romero, R., 2009. *SpolvlgA* is a DDX3/PL10-related DEAD-box RNA helicase expressed in blastomeres and embryonic cells in planarian embryonic development. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 64–73.
- Umesono, Y., Tasaki, J., Nishimura, K., Inoue, T., Agata, K., 2011. Regeneration in an evolutionarily primitive brain—the planarian *Dugesia japonica* model. *Eur. J. Neurosci.* 34, 863–869.
- 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.
- Wagner, D.E., Ho, J.J., Reddien, P.W., 2012. Genetic regulators of a pluripotent adult stem cells system in planarians identified by RNAi and clonal analysis. *Cell Stem Cell* 10, 299–311.
- Wenemoser, D., Lapan, S.W., Wilkinson, A.W., Bell, G.W., Reddien, P.W., 2012. A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes Dev.* 26, 988–1002.
- Zhang, S.y.u., Modica, L.J., Yu, V., Von Ohlen, Z., Mellerick, D.M., T., 2008. The *Drosophila* homeodomain transcription factor, *Vnd*, associates with a variety of co-factors, is extensively phosphorylated and forms multiple complexes in embryos. *FEBS J.* 275, 5062–5073.
- Zhao, G., Skeath, J.B., 2002. The *Sox*-domain containing gene *Dichaete/fish-hook* acts in concert with *vnd* and *ind* to regulate cell fate in *Drosophila* neuroectoderm. *Development* 129, 1165–1174.
- Zhong, L., Dengqiang, W., Xiaoni, G., Tong, Y., Shunping, H., 2011. Parallel expansion of *Sox* transcription factor group B predating the diversification of the arthropods and jawed vertebrates. *PLoS One* 6, e16570.





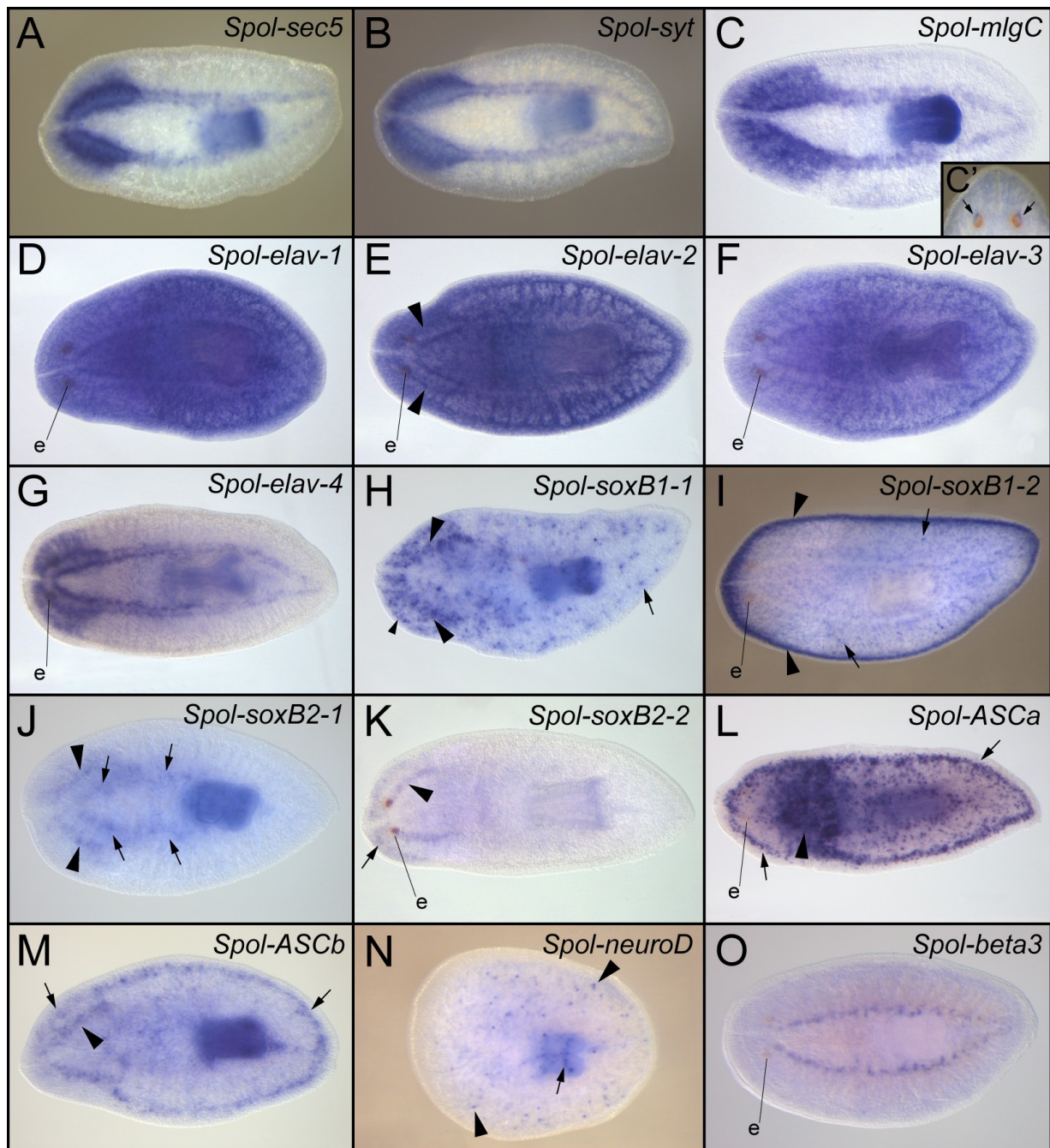
**Supplementary Figure 1. *S. polychroa* embryogenesis and dorso-ventral patterning. (A)** Appearance of planarian embryos at different developmental times and a schematic view of each of them. Stage 2 embryos are surrounded by yolk cells (the dashed line delimits the boundaries of an embryo), which will be swallowed through the embryonic pharynx in the following stages. The definitive anteroposterior patterning is adopted from stage 5 onwards (Martín-Durán et al., 2010), as is indicated in the drawings. Late stage 5 and stage 7 are ventral views. The dashed line in stage 3, stage 4, and stage 5 panels encircles the embryonic pharynx. Scale bar. 250  $\mu$ m.

**B**

**Supplementary Figure 1. *S. polychroa* embryogenesis and dorso-ventral patterning. (B)**

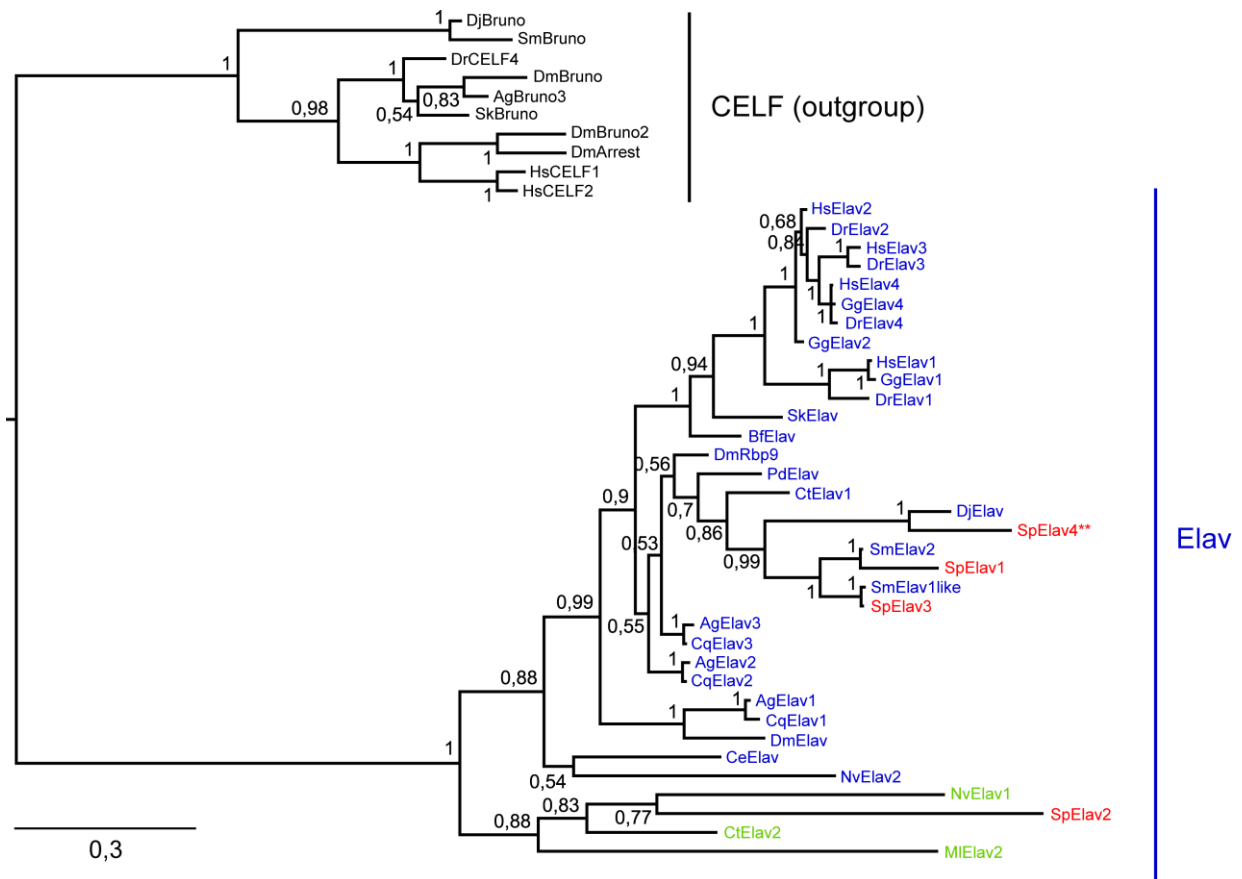
Dorso-ventral orientation of planarian embryos. The left panels of the dorsal, ventral, and lateral view columns are single colorimetric whole-mount *in situ* hybridizations of *Spol-foxA*, and the right panels are z-projections of stacks from whole-mount fluorescent anti-TMUS13 immunolabelling (in green) combined with *Spol-foxA in situ* hybridization. The diagrams represent the musculature (in green) and *Spol-foxA* expression (in dark blue). *Spol-foxA* is an ortholog of the family *Forkhead box A* of conserved transcription factors involved in gut development that is expressed in the definitive pharynx and in surrounding cells of the gastrodermis (Martín-Durán et al., 2010, Koinuma et al., 2000) as well as in the embryonic pharynx in early embryos (Martín-Durán et al., 2010). Here we focus only on the late ventral expression related to the formation of the definitive organ. The white arrows show a characteristic bundle of muscular cells located at the future posterior pole in both stage 5 and late stage 5 embryos; this structure arises from the embryonic pharynx towards the top region of the embryo. The black and white arrowheads indicate the position of the embryonic pharynx or the degenerating embryonic pharynx/primordium of the definitive pharynx in stage 4, stage 5, and late stage 5 embryos, as well as the definitive pharynx in stage 6 embryos. Note that at stage 5, muscular cells organize radially in the medial part of the embryo. At late stage 5, TMUS labels transversal muscular fibres in the dorso-ventral margin, which correspond to the muscular cells of the medial region observed in the previous stage. The dorsoventral polarity in stage 5 embryos was inferred after comparing the relative position of muscular structures (radial/transversal musculature, the embryonic and definitive pharynx, and the bundle of muscular cells) and *Spol-foxA* expression at this stage and, especially, in late stage 5 embryos; the dashed line is drawn following the theoretical dorso-ventral boundary. Stage 4 embryos lack true axuality and are organized in a radial-like pattern. Drawings of different stages are not to scale. Scale bars, stage 4 panels, 200 µm; stage 5 panels, 300 µm; late stage 5 panels, 400 µm; stage 6 panels, 500 µm. Both in (A) and in (B): A, anterior; b, blastomeres; bm, bundle of musculature; D, dorsal; dp, definitive pharynx; dpp, definitive pharynx primordium; e, eye; ec, embryonic cells; ep, embryonic pharynx; gb; germ band; P, posterior; V, ventral; y, yolk cells; ys, yolk sincitium.



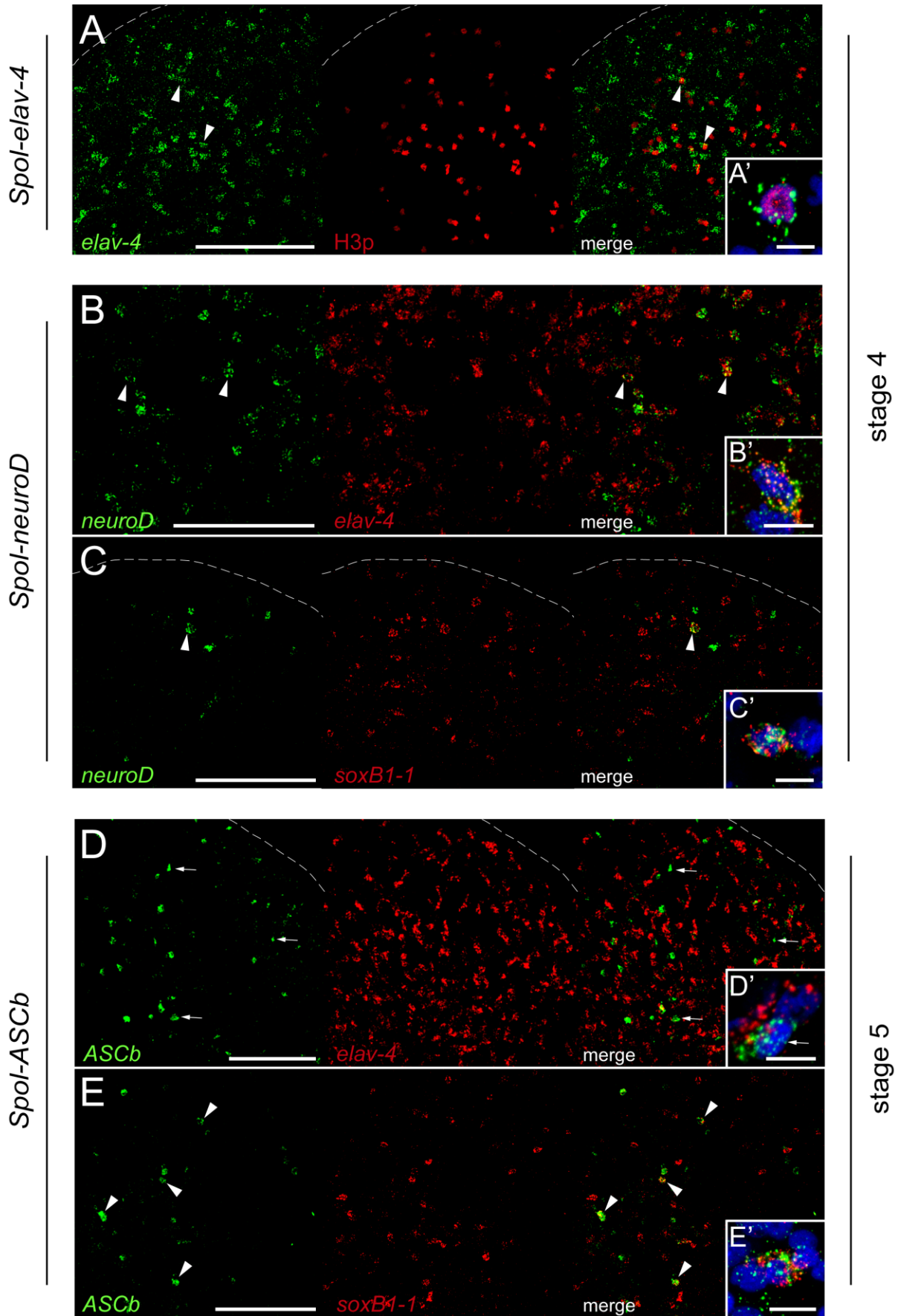


**Supplementary Figure 2. Expression in hatchlings of the genes reported in Figs. 1, 4, 6, 7, and 8.** (A-O) are whole-mount *in situ* hybridizations of *Spol-sec5*, *Spol-syt*, *Spol-mlgC*, *Spol-elav-1*, *Spol-elav-2*, *Spol-elav-3*, *Spol-elav-4*, *Spol-Soxb1-1*, *Spol-Soxb1-2*, *Spol-Soxb2-1*, *Spol-Soxb2-2*, *Spol-ASCa*, *Spol-ASCb*, *Spol-neuroD*, and *Spol-beta3* in hatchlings. The black arrows in (C) show the photoreceptors of the eyes. The black arrowheads in (E) point to expression in the brain. The large black arrowheads in (H) show the brain, the small black arrowhead points to the periphery of the head, and the arrow shows cells of the parenchyma. The black arrowheads in (I) indicate expression at the margin, while the black arrows indicate expression in scattered cells of the parenchyma. The black arrowheads in (J) show expression in an outer domain of the brain, and the black arrows point to both the inner part of the brain and to the anterior VNC. The black arrowhead in (K) marks the brain, and the black arrow points to cells of the head periphery. The black arrowhead in (L) indicates expression in a great number of cells in the prepharyngeal region, while the black arrows indicate expression

in cells at the margin. The black arrowhead in (M) points to the brain, and the black arrow points to the margin of the animal. The black arrowheads in (N) show cells of the parenchyma, and the black arrow shows the nerve plexus of the mature pharynx. All panels are ventral views where the anterior is to the left. e, eye.



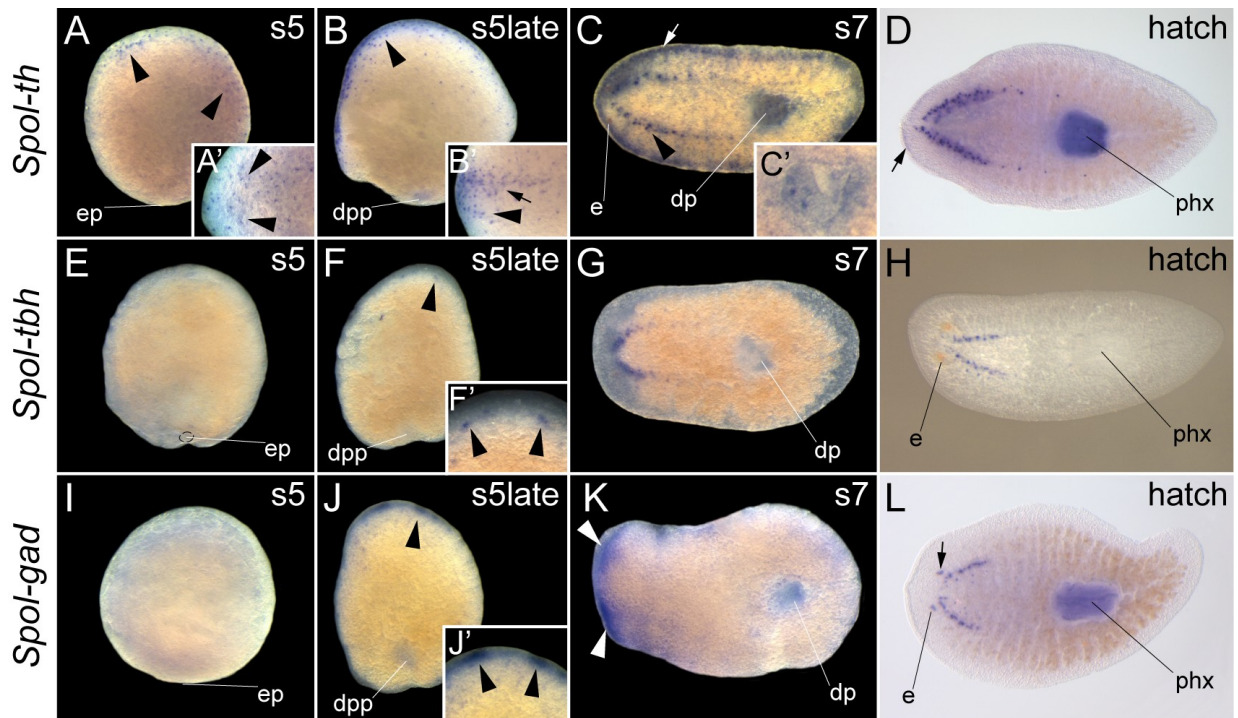
**Supplementary Figure 3. Phylogenetic analysis of *elav* genes.** The tree has been constructed using an alignment of the RRM1–3 domains without the hinge region of representative Elav proteins from different animals, and is rooted with CELF proteins as the outgroup. The different groups of orthology are indicated in different colors. A divergent clade of Elav/Hu proteins with an uncharacterized function is highlighted in green; based on this study, this group appears to be ancestral to metazoans. *Spol-elav-1*, *Spol-elav-3*, and *Spol-elav-4* belong to the neural clade of Elav/Hu proteins, while *Spol-elav-2* belongs to the divergent uncharacterized clade. The support values of the branches are posterior probabilities of Bayesian likelihood (only those above 0.5 are shown). *S. polychroa elav* sequences are highlighted in red.



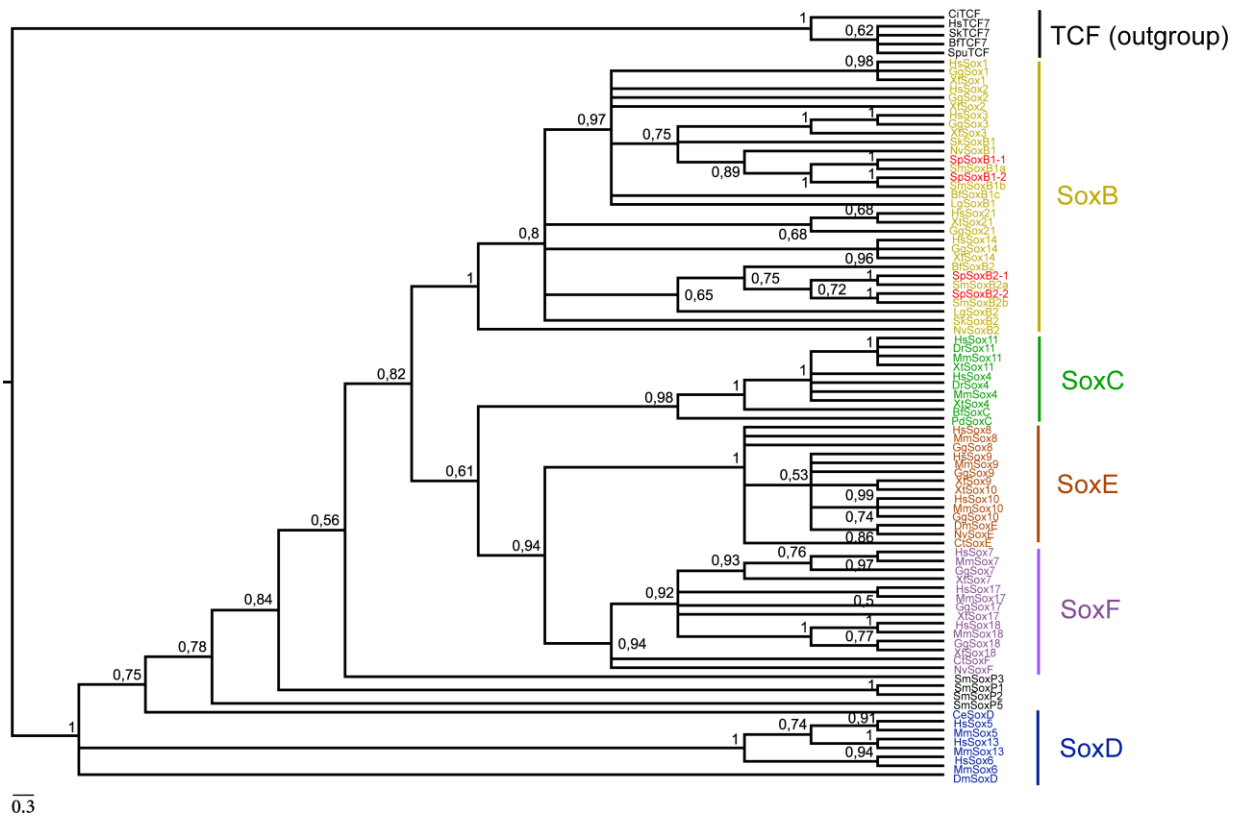
**Supplementary Figure 4. Characterization of putative neural progenitor populations. (A, A')** are z-projections of confocal stacks from whole-mount FISH with *Spol-elav-4* (in green)

and immunolabeling with anti-H3p (in red) in stage 4 embryos. **(B-E')** are DFISH with *Spol-neuroD* or *Spol-ASCb* (in green) and *Spol-elav-4* or *Spol-soxB1-1* (in red) in stage 4 or stage 5 embryos. The white arrowheads point to cells with colocalization of the indicated markers. The white arrows in (D) point to *Spol-ASCb* positive cells only; the expression of this gene did not overlap with that of the early-neural related marker *Spol-elav-4* in stage 5 embryos. In (A, C, D), the dashed line delimits the boundary of the embryo. Scale bars, A, B, C, D, and E, 75  $\mu\text{m}$ ; A', B', C', D', and E', 5  $\mu\text{m}$ .

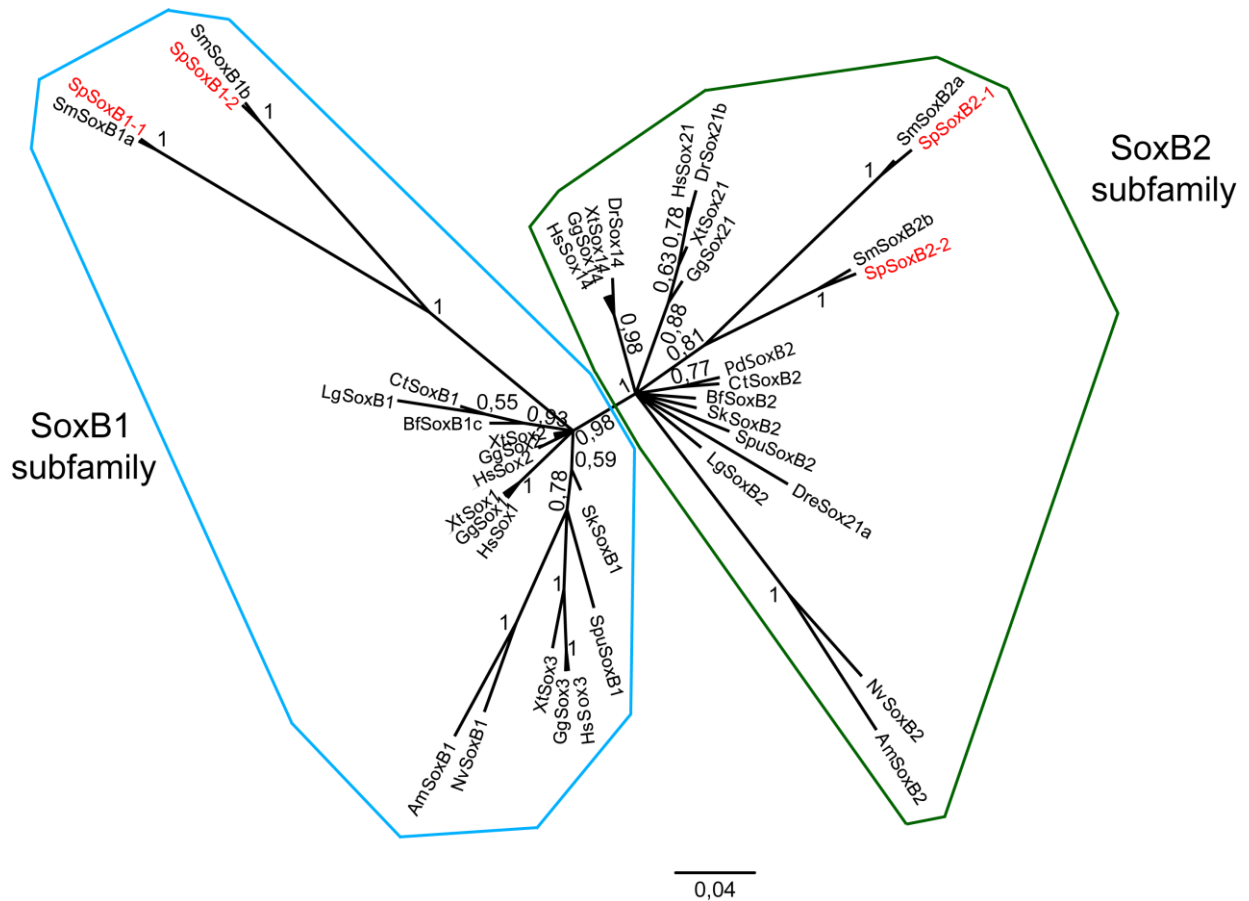




**Supplementary Figure 5. Temporal and spatial expression of neural cell type genes in embryos and hatchlings.** (A-L) are whole-mount *in situ* hybridizations of *Spol-th*, *Spol-tbh*, and *Spol-gad* in embryos at stage 5 (s5), late stage 5 (s5late), and stage 7 (s7), as well as in hatchlings (hatch). The black and white arrowheads indicate expression of the neural subpopulation markers. The black arrow in (L) points to the photoreceptors of the eyes, and the black and white arrows in (C, D) point to the sensory cells of the periphery of the head. Note that at late stage 5, *Spol-th* was expressed in two distinct domains: a ventral domain probably corresponding to neurons of the brain (black arrowhead in B') and a more dorsal domain probably corresponding to sensory cells of the periphery of the head (black arrow in B'). (A', B') are insets of the lateral-anterior region of the embryo, (C') is an inset of the pharynx, and (F', J') are insets of the anterior region of the embryo viewed from top. Embryos are oriented as shown in Fig. S1; hatchling panels are ventral views where the anterior is to the left. In (E), a dashed line encircles the embryonic pharynx. dp, definitive pharynx; dpp, definitive pharynx primordium; e, eye; ep, embryonic pharynx; phx, mature pharynx.

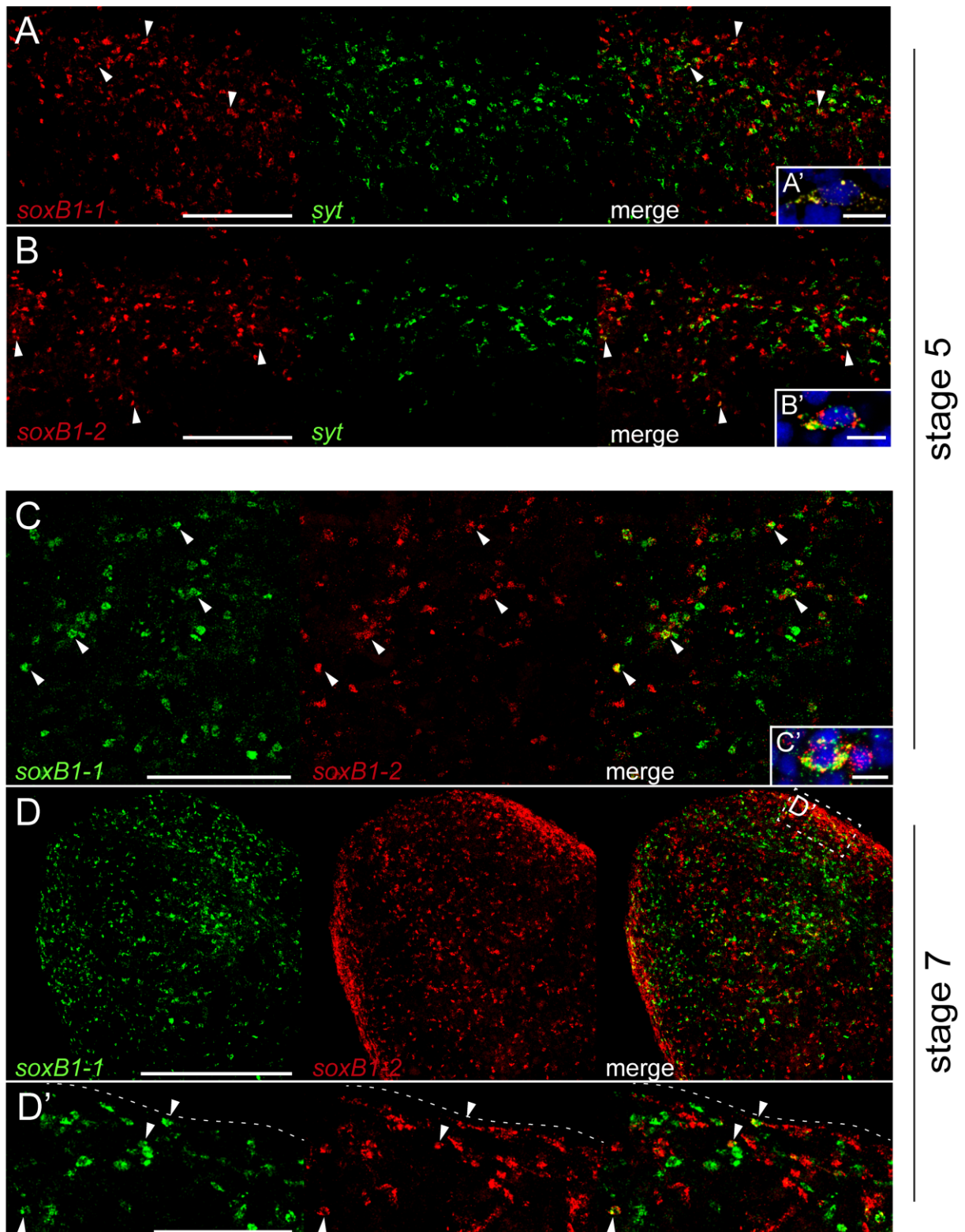


**Supplementary Figure 6. Phylogenetic analysis of sox genes.** The tree has been constructed using an alignment of the HMG domain of representative Sox proteins from the different families present in all bilaterians and has been rooted with TCF proteins as the outgroup. The different groups of orthology are indicated in different colors. All the sox genes isolated in this study group within the soxB family. The support values of the branches are posterior probabilities of Bayesian likelihood (only those above 0.5 are shown). *S. polychroa* SoxB sequences are highlighted in red.



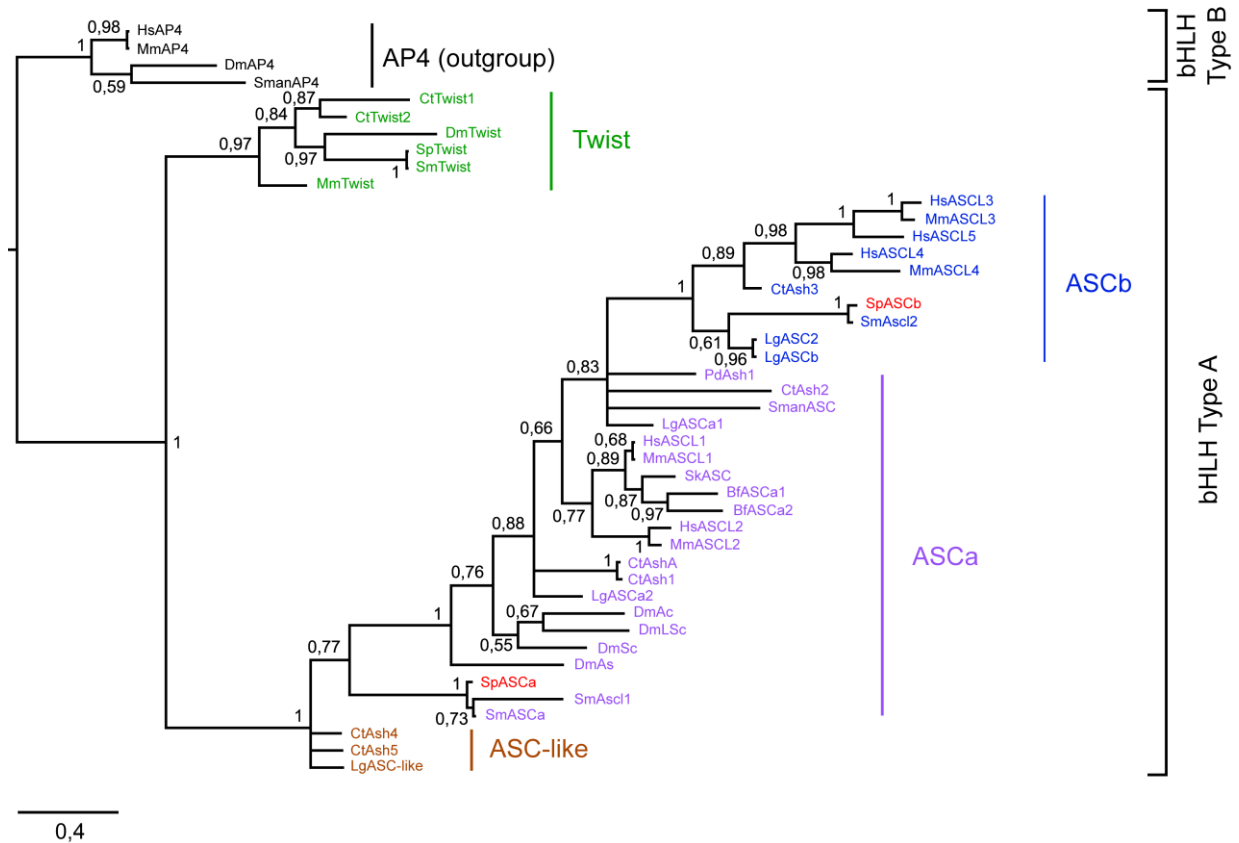
**Supplementary Figure 7. Assessment of the *soxB* group orthology of *S. polychroa* *sox* genes.** The tree has been constructed using an alignment of the HMG domain of representative *soxB1* and *soxB2* group proteins from different animals and has been left unrooted. The different groups of orthology are indicated in boxes of different colors. The support values of the branches are posterior probabilities of Bayesian likelihood (only those above 0.5 are shown). *S. polychroa* *SoxB1* and *SoxB2* sequences are highlighted in red.



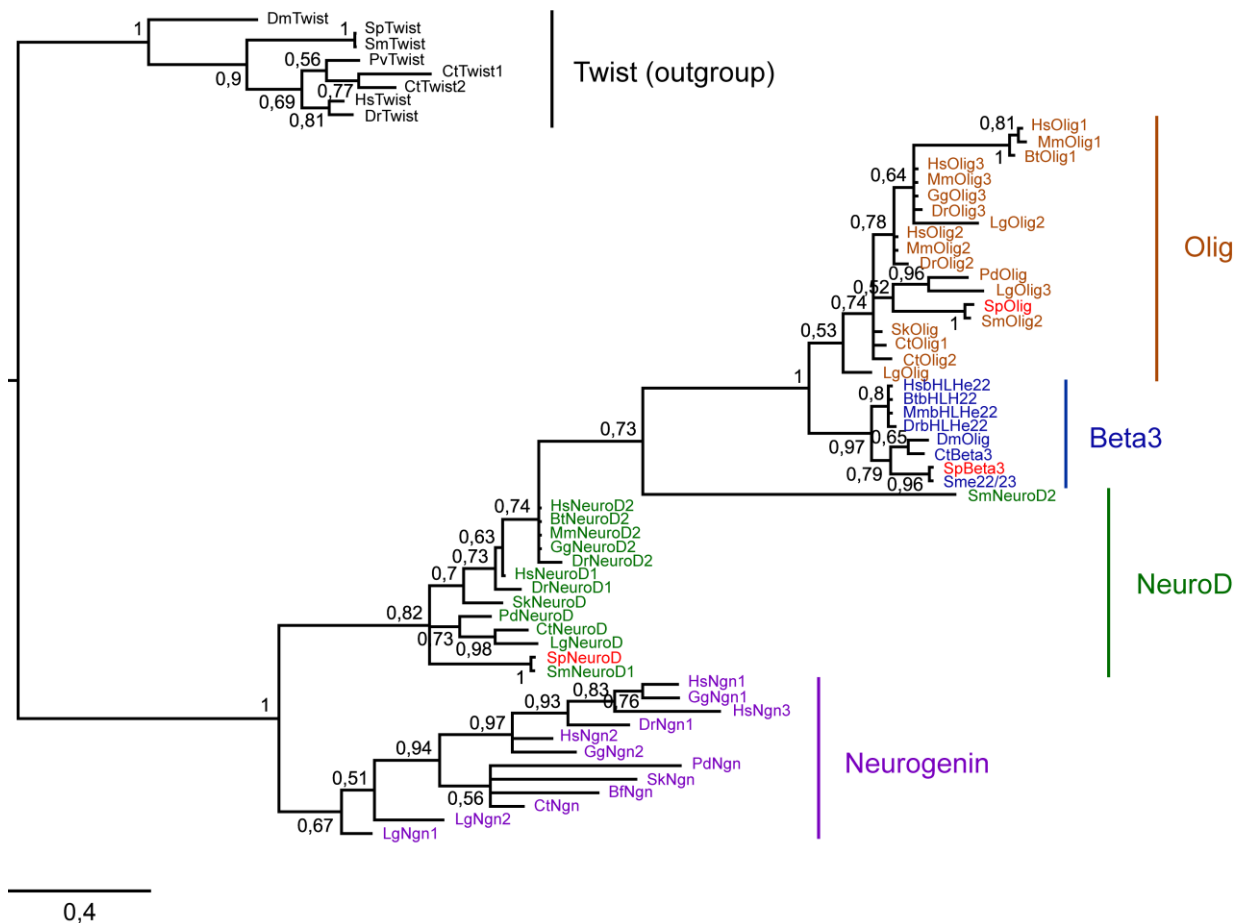


**Supplementary Figure 8. Additional characterization of *soxB1* expressing cells.** (A-D') are z-projections of confocal stacks from whole-mount DFISH with *soxB1* genes (in red) and the late panneural marker *Spol-syt* (in green) in stage 5 embryos, or with *Spol-soxB1-1* (in green) and *Spol-soxB1-2* (in red) in stage 5 and stage 7 embryos. The white arrowheads point to cells with coexpression of the indicated genes. (A-B') show that the two *soxB1* paralogs were detected in cells of the neural primordium. In (C-D'), *Spol-soxB1-1* and *Spol-soxB1-2* transcripts colocalized in some cells of the germ band in stage 5 embryos and in cells of the

parenchyma and the margin in stage 7 embryos. In (D), the anterior is to the top left. In (D'), the white dashed line delimits the boundary of the embryo. Scale bars, D, 400  $\mu\text{m}$ ; A and B, 75  $\mu\text{m}$ ; C, 50  $\mu\text{m}$ ; D', 25  $\mu\text{m}$ ; A', B' and C', 5  $\mu\text{m}$ .



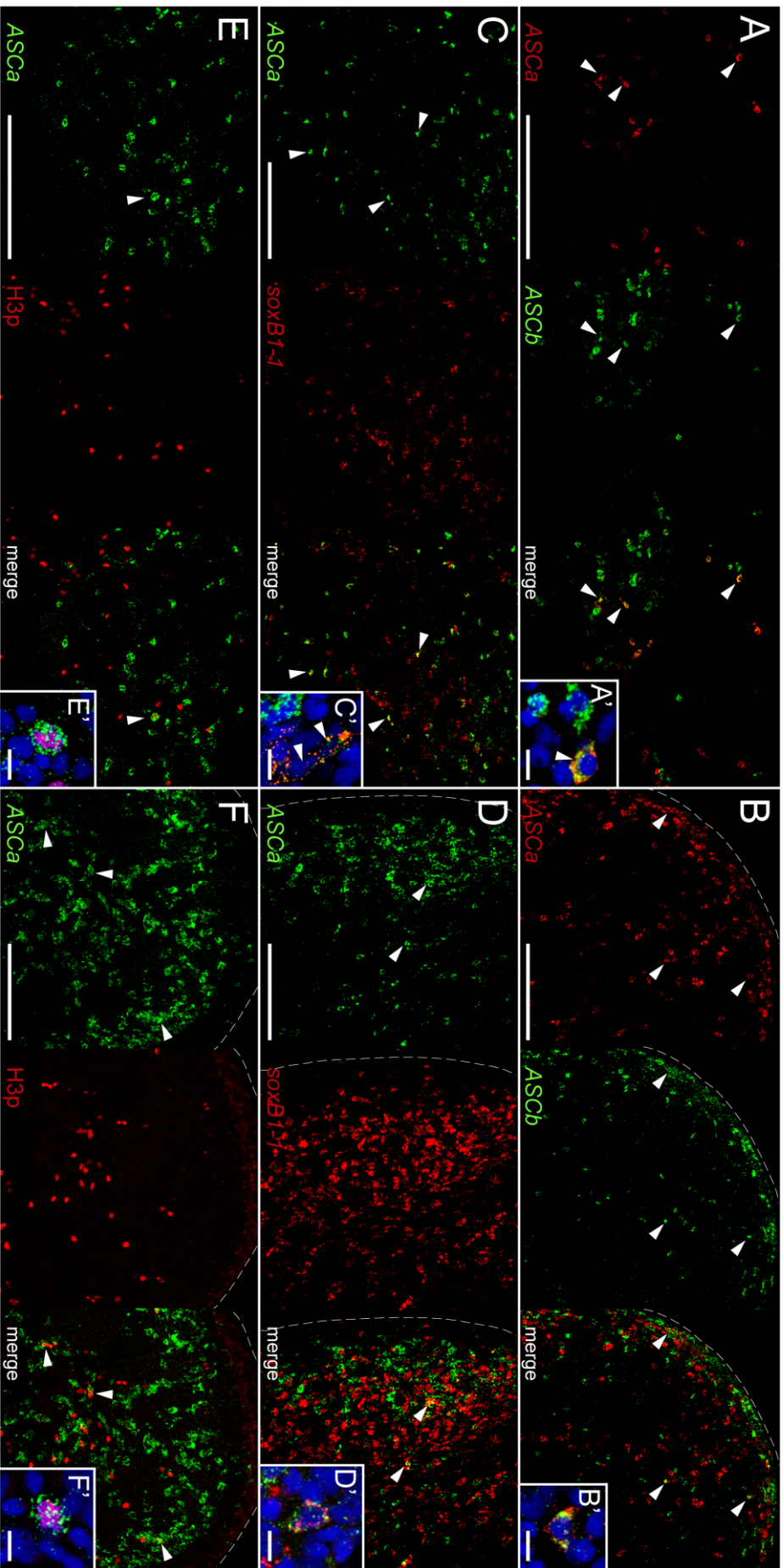
**Supplementary Figure 9. Phylogenetic analysis of *achaete-scute*-related genes.** The tree has been constructed using an alignment of the bHLH domain without the hinge region of representative bHLH type A proteins from different animals, including the non-proneural *twist* and *achaete-scute* sequences. The tree has been rooted with the bHLH type B protein AP4 as the outgroup. The different groups of orthology are indicated in different colors. Based on our analysis, *Spol-ASCb* corresponds to the gene *ascl-2* from *S. mediterranea*, while *Spol-ASCa* is an uncharacterized *ASCa* ortholog closely related to *Smed-ascl-1*. The support values of the branches are posterior probabilities of Bayesian likelihood (only those above 0.5 are shown). *S. polychroa* *achaete-scute*-related sequences are highlighted in red.



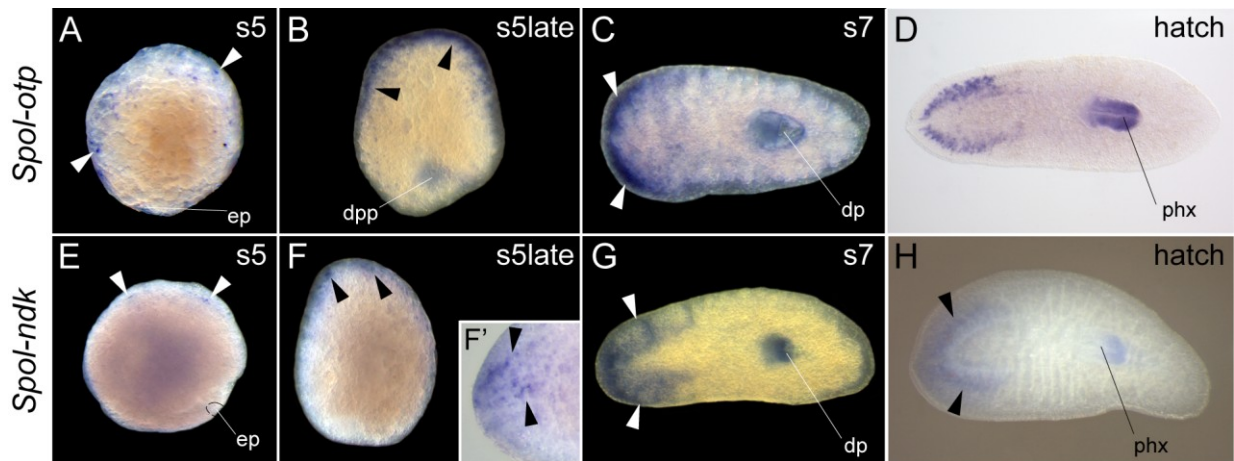
**Supplementary Figure 10. Phylogenetic analysis of *atonal*-related genes.** The tree has been constructed using an alignment of the bHLH domain of representative Atonal proteins from different animals and has been rooted with Twist as the outgroup. Based on our study, *Spol-olig*, *Spol-beta3*, and *Spol-neuroD* are orthologs of the *S. mediterranea* genes *olig2*, *e22/23*, and *neuroD*, respectively. The different groups of orthology are indicated in different colors. The support values of the branches are posterior probabilities of Bayesian likelihood (only those above 0.5 are shown). *S. polychroa atonal*-related bHLH sequences are highlighted in red.

stage 5

stage 7



**Supplementary Figure 11. Additional characterization of *Spol-ASCa* expressing cells.** (A-D') are z-projections of confocal stacks from whole-mount DFISH with *Spol-ASCa* (in red) and *Spol-ASCb* (in green), or with *Spol-ASCa* (in green) and *Spol-soxB1-1* (in red) in stage 5 and stage 7 embryos. In (E-F'), cells in division are labeled with the anti-H3p antibody (in red). The white arrowheads point to *Spol-ASCa* positive cells with coexpression of the indicated marker. (A-B') show that the expression of the two *achaete-scute* paralogs partially overlapped in a cellular subpopulation throughout embryonic development. (C-D') *Spol-ASCa* was also expressed in putative neural progenitors and (E-F') in embryonic cells in division and in stem cells. In (B, D, F), the anterior is to the top, and the white dashed line delimits the boundary of the embryo. Scale bars, B, D, and F, 100  $\mu\text{m}$ ; A, C, E, 750  $\mu\text{m}$ ; A', B', C', D', E', and F', 5  $\mu\text{m}$ .



**Supplementary Figure 12. Temporal and spatial expression of brain-related genes in embryos and hatchlings.** (A-H) are whole-mount *in situ* hybridizations of *Spol-otp* and *Spol-ndk* at stage 5 (s5), late stage 5 (s5late), and stage 7 (s7) and in hatchlings (hatch). Both genes are commonly used as markers of the brain and/or the anterior region in adult planarians (Cebrià et al., 2002, Iglesias et al., 2011). The black and white arrows in (A, B, E-F') show expression in cells of the anterior region and mark the brain/head in (C, G, H). (F') is an inset of the lateral-anterior region of the embryo with a white background. Embryos are oriented as shown in Fig. S1; hatchling panels are ventral views where the anterior is to the left. In (E), a dashed line encircles the embryonic pharynx. dp, definitive pharynx; dpp, definitive pharynx primordium; e, eye; ep, embryonic pharynx; phx, mature pharynx.

## Supplementary References

- 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.
- Iglesias, M., Almuedo-Castillo, M., Aboobaker, A.A., Saló, E., 2011. Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Dev. Biol.* 358, 68-78.
- Koinuma, S., Umesono, Y., Watanabe, K., Agata, K., 2000. Planaria *FoxA (HNF3)* homologue is specifically expressed in the pharynx-forming cells. *Gene*, 259, 171-176.
- Martín-Durán, J.M., 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.





**Article 2. Morphological and molecular development of the eyes during the embryogenesis of the freshwater planarian *Schmidtea polychroa***

José María Martín-Durán<sup>1,2</sup>, **Francisco Monjo**<sup>1</sup> i Rafael Romero<sup>1</sup>

Development Genes and Evolution, 222:45-54;

Índex d'impacte (2014): 2,441

<sup>1</sup> Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya

<sup>2</sup> actualment al Sars International Centre for Marine Molecular Biology, Bergen, Noruega



## Resum

L'habilitat de respondre a estímuls lluminosos (o fotorecepció) és una de les funcions sensorials més primitives dels metazous. En la majoria d'animals, els òrgans encarregats de captar la llum són els ulls o els ocells, i estan formats per, com a mínim, una cèl·lula pigmentària i una cèl·lula fotoreceptora. Recentment, diversos estudis moleculars han demostrat l'existència de xarxes gèniques conservades que regulen l'especificació i el desenvolupament dels tipus cel·lulars propis d'aquests òrgans. Alguns exemples de gens que componen aquestes xarxes són *pax6*, *sine oculis*, *eyes absent*, *dachshund*, *otx*, *Rx* i *atonal*. En les planàries s'ha caracteritzat la funció d'alguns d'aquests gens durant la regeneració, i s'ha determinat que *sine oculis*, *eyes absent* i *otxA*, un ortòleg de la família *otx*, juguen papers essencials en la formació de l'ull després de la decapitació de l'animal, i que, per contra, el gen *pax6*, considerat per molts com l'activador més important en el desenvolupament de l'òrgan, no sembla ser-hi necessari. En l'article X caracteritzem amb eines histològiques i marcadors moleculars específics el desenvolupament de l'ull de la planària *Schmidtea polychroa* durant la seva embriogènesi. A més, analitzem els patrons d'expressió de gens ortòlegs de la xarxa gènica *pax6-sine oculis-eyes absent-dachshund* i dels factors de transcripció *Rx*, *otx* i *atonal* en embrions de diferents estadis. Demostrem que la formació de l'ull en embrions de planària presenta grans semblances a nivell cel·lular i molecular amb la regeneració dels adults -en concret pel que fa a l'origen dels precursors de les cèl·lules pigmentàries i fotoreceptores- i concloem que, molt probablement, la seva organogènesi depèn de mecanismes moleculars alternatius als ancestrals de l'ull prototípic dels metazous.



# Morphological and molecular development of the eyes during embryogenesis of the freshwater planarian *Schmidtea polychroa*

José María Martín-Durán · Francisco Monjo · Rafael Romero

Received: 30 September 2011 / Accepted: 20 January 2012 / Published online: 12 February 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** Photoreception is one of the most primitive sensory functions in metazoans. Despite the diversity of forms and components of metazoan eyes, many studies have demonstrated the existence of a common cellular and molecular basis for their development. Genes like *pax6*, *sine oculis*, *eyes absent*, *dachshund*, *otx*, *Rx* and *atonal* are known to be associated with the specification and development of the eyes. In planarians, *sine oculis*, *eyes absent* and *otxA* play an essential role during the formation of the eye after decapitation, whereas *pax6*, considered by many authors as a master control gene for eye formation, does not seem to be involved in adult eye regeneration. Whether this is a peculiarity of adult planarians or, on the contrary, is also found in embryogenesis

remains unknown. Herein, we characterize embryonic eye development in the planarian species *Schmidtea polychroa* using histological sections and molecular markers. Additionally, we analyse the expression pattern of the *pax6*–*sine oculis*–*eyes absent*–*dachshund* network, and the genes *Rx*, *otxA*, *otxB* and *atonal*. We demonstrate that eye formation in planarian embryos shows great similarities to adult eye regeneration, both at the cellular and molecular level. We thus conclude that planarian eyes exhibit divergent molecular patterning mechanisms compared to the prototypic ancestral metazoan eye.

**Keywords** Planarian · Embryogenesis · Eye · *pax6*

Communicated by D. Weisblat

José María Martín-Durán and Francisco Monjo contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00427-012-0389-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. M. Martín-Durán · F. Monjo · R. Romero  
Departament de Genètica, Universitat de Barcelona,  
Avda. Diagonal 643,  
08028 Barcelona, Spain

F. Monjo  
e-mail: radiakis@gmail.com

R. Romero  
e-mail: rromero@ub.edu

*Present Address:*

J. M. Martín-Durán (✉)  
Sars International Centre for Marine Molecular Biology,  
University of Bergen,  
Thormøhlensgate 55,  
5008 Bergen, Norway  
e-mail: mdchemi7@gmail.com

## Introduction

The ability to respond to light stimuli is one of the most primitive sensory functions in metazoans. Already present in sponges (Leys and Degnan 2001), light perception involved the evolution of diverse visual organs among animal phyla (Schmidt-Rhaesa 2007). Despite large morphological differences, all eyes contain at least one photoreceptor cell and pigment cell (Arendt and Wittbrodt 2001). Photoreceptors are responsible for detecting light using a photosensitive molecule connected to a phototransduction cascade (Vopalensky and Kozmik 2009). That molecule is the apoprotein opsin, which forms the rhodopsin complex together with a chromophore. The complex accumulates in the photoreceptor in microvilli (rhabdomeric eyes) or cilia (ciliary eyes). The other essential component of the eye is the pigment cell, which gives information on the direction of light (Vopalensky and Kozmik 2009).

The anatomical diversity and differences in embryonic origin led to the proposal that eyes appeared between 40 and

65 separate and independent times during metazoan evolution (Salvini-Plawen and Mayr 1961). However, studies of the molecular mechanisms involved in eye formation have revealed common genetic pathways shared by distantly related animals (Gehring and Ikeo 1999; Arendt and Wittbrodt 2001; Vopalensky and Kozmik 2009). Genes such as *pax6*, *sine oculis*, *eyes absent*, *dachshund*, *otx*, *Rx* and *atonal* have been shown to play a conserved role in eye development in a wide variety of bilaterians and even cnidarians (Arendt 2003; Vopalensky and Kozmik 2009). Therefore, whether there was a prototypic eye in the ancestor of all bilaterians or whether eyes evolved more than once remains a matter of debate.

Planarians have simple inverted rhabdomeric eyes, composed of a photoreceptor cell and a pigment cell forming a cup (Hyman 1951). In highly divergent families (Dugesidae and Geoplaniidae), the eye is also composed of these two basic elements, but with multiple photoreceptors and pigment cells. Given their simplicity, some authors have proposed that planarian eyes exemplify the morphology of the putative ancestral metazoan eye (Gehring and Ikeo 1999). In this context, several studies have demonstrated the role of *sine oculis*, *eyes absent* and *otxA* in adult eye regeneration (Pineda et al. 2000, 2001; Mannini et al. 2004; Lapan and Reddien 2011), and the expression of *pax6* and *Rx* in the adult central nervous system, but not in the eyes (Callaerts et al. 1999; Pineda et al. 2001, 2002; Rossi et al. 2001; Mannini et al. 2008). However, little is known about eye formation and the expression of these eye-related genes during embryogenesis.

Despite the fact that planarians are members of the large Lophotrochozoan clade (Halanych et al. 1995; Aguinaldo et al. 1997), they exhibit divergent spiralian development, which has been divided into eight stages (Cardona et al. 2005). Planarians lay ectolecithal eggs, in which several zygotes are packaged together with multiple yolk cells within the same egg capsule. After laying, disperse cleavage takes place within a yolk-derived syncytium (stage 1) and several blastomeres differentiate into transient embryonic structures (stage 2) that are required to ingest the maternally supplied yolk cells (stage 3). After yolk ingestion, the undifferentiated blastomeres proliferate (stage 4) and give rise to the definitive planarian body plan (stages 5 and 6). Finally, the definitive organs develop and acquire their final morphology (stages 7 and 8). Although divergent, planarian development still shows the conservation of many of the molecular mechanisms involved in spiralian and metazoan embryonic development (Martín-Durán et al. 2010; Martín-Durán and Romero 2011).

In this work, we use the sexual species *Schmidtea polychroa* to shed light on the evolution of embryonic eye formation through the study of the formation and molecular patterning of this organ during planarian embryogenesis. We

describe the morphological events leading to eye development, and characterize the expression of the evolutionarily conserved eye-related genes *pax6*, *sine oculis*, *eyes absent*, *dachshund*, *Rx*, *otx* genes and *atonal*. Finally, we discuss our data in relation to knowledge of these genes in different metazoan taxa and during adult planarian regeneration.

## Materials and methods

### Animal culture

A sexual population of *S. polychroa* from Sant Celoni (Barcelona, Spain) was maintained in the lab as described elsewhere (Martín-Durán et al. 2008). Embryonic capsules were collected regularly and kept in Petri dishes at 20°C in culture water (tap water to distilled water, 1:1, v:v) until reaching the required stage.

### Histology

Embryonic capsules were fixed in 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in phosphate buffer saline (PBS) for 4 h at 4°C, followed by an overnight wash in PBS. Newborns and adults were fixed in Steinmann's fixative (concentrated nitric acid to saturated solution of mercuric chloride in 5% sodium chloride to distilled water, 1:1:1, v:v:v) for a few minutes and washed several times in distilled water. All specimens for histological studies were embedded in paraffin and sectioned as previously described (Cardona et al. 2005), counterstained with Mallory's solution (Sluys 1989) and mounted in di-*n*-butyl phthalate in xylene mounting medium (#44581, Sigma, St Louis, MO).

### Identification and cloning of *S. polychroa* genes

*S. polychroa* is closely related to the triclad model *Schmidtea mediterranea*. Partial fragments of the genes *arrestin*, *opsin*, *tryptophan phosphate hydroxylase (tph)*, *pax6*, *sine oculis (so)*, *eyes absent (eya)*, *Rx*, *otxA* and *otxB* (GenBank accession numbers JN785962, JN785961, JN785952, JN785957, JN785958, JN785959, JN785953, JN785955, JN785954, respectively) were cloned using interspecific primers designed against the respective *S. mediterranea* sequences. *dachshund (dach)* and *atonal (ath)* (GenBank accession numbers JN785960, JN785956, respectively) were cloned with primers designed against the predicted *S. mediterranea* genes. These predictions were established via BLAST searches (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) and genomic annotations available in SmedGD (<http://smedgd.neuro.utah.edu>). Elongation of the cloned fragments was achieved by classic RACE-PCR as described in Frohman (1994).

## Phylogenetic analysis

Amino acid alignments were carried out using MAFFT (Kato et al. 2002) and corrected by hand for obvious alignment errors. Nexus files of these are available upon request. In each case, ProtTest (Abascal et al. 2005) was used to select the best-fit model of protein evolution, and MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001; Ronquist and Huelsenbeck 2003) was used to conduct the Bayesian phylogenetic analysis. The models used for each analysis were: JTT with DACH and WAG with ATH. The results are a consensus of two converged runs of 4,000,000 (DACH) and 3,000,000 (ATH) generations, sampled every 1,000 generations. Trees were visualized with the software FigTree and edited in Adobe Illustrator CS5.

## Gene expression studies and immunohistochemistry

Single colorimetric whole-mount in situ hybridization in embryos was carried out as described previously (Martín-Durán et al. 2010). Whole-mount in situ hybridization in hatchlings and juveniles was performed as described in Umesono et al. (1997), using a robot (InsituPro VSi, Intavis), and developed using an alkaline phosphatase–nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate colorimetric assay. In all experiments, a sense riboprobe was used as the negative control (Fig. S1). Double fluorescent in situ hybridization was performed as described in Martín-Durán et al. (2010). Immunohistochemistry on whole-mount embryos was performed as described elsewhere (Martín-Durán et al. 2010), using 1% bovine serum albumin in PBS

0.3% Triton X-100 as blocking solution. The VC-1 antibody (kindly provided by Dr. H. Orii), which detects the Arrestin protein (Agata et al. 1998; Sakai et al. 2000), was used at a 1:10,000 dilution in blocking solution.

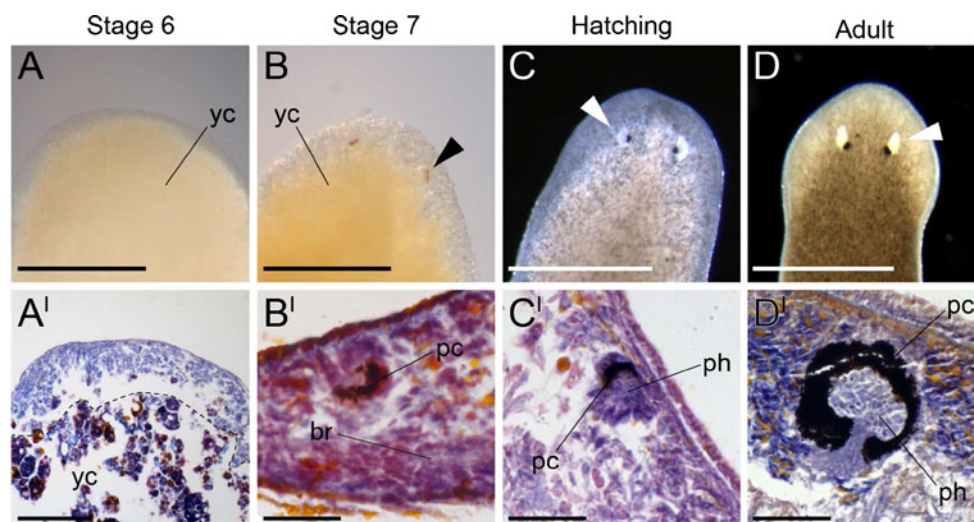
## Imaging

Whole-mount embryos, hatchlings and juveniles were observed under a Leica MZ16F stereomicroscope. Images from representative specimens of each experiment were captured with a ProgResC3 camera from Jenoptik. Histological sections were observed under a Zeiss Axiophot microscope equipped with a Leica DFC300FX camera. Fluorescent preparations were observed under a Leica TCS-SP2 confocal microscope. Images were analysed using Helicon Focus, Adobe Photoshop CS5, ImageJ and Adobe Illustrator CS5.

## Results

### Eye development in *S. polychroa* embryogenesis

Eye differentiation was first observed during the transition between stages 6 and 7 (Le Moigne 1963; Cardona et al. 2005, Fig. 1). Stage 6 embryos were anteroposteriorly elongated and dorsoventrally flattened, and there was no evidence of eyes at their anteriormost tip, either under the stereomicroscope [Fig. 1 (A)] or in histological sections [Fig. 1 (A')]. However, a small pigment cup was evident in stage 7 embryos [Fig. 1 (B)]. At this stage, a few pigment



**Fig. 1** Embryonic development of the eye in *S. polychroa*. Transmitted light microscopy images of the head region of embryos, hatchlings and adults (A–D). Paraffin sections counterstained with Mallory's solution (A'–D'). The first signs of eye differentiation are apparent in stage 7 embryos, with the appearance of a small pigment cup (black arrowhead). From stage 8 to hatching, the pigment cup adopts a more

spherical shape, and photoreceptors become visible in histological sections. After hatching, eyes mature into the typical adult morphology (in C and D, white arrowheads indicate the eyes). *br* developing brain, *pc* pigment cup, *ph* photoreceptors, *yc* yolk cells. Scale bars: 500  $\mu$ m (A–D), 50  $\mu$ m (A'), 25  $\mu$ m (B'–D')



cells were present in the head region, dorsally to the developing brain [Fig. 1 (B')]. The presence of photoreceptor cells at this point of development was not discernible with the counterstaining method used. Newborns showed typical planarian eyes [Fig. 1 (C, C')], similar to those present in the adult [Fig. 1 (D, D')]. Nevertheless, histological sections demonstrated that eyes were smaller and with fewer cells in hatchlings than in adults, although the general morphology was equivalent.

#### Embryonic development of eye cell types

Due to difficulties in studying the embryonic appearance of photoreceptors and pigment cells by means of histological staining, we decided to analyse the expression and localization of molecular markers specific to these two cell types (Fig. 2). VC-1 is a monoclonal antibody that labels photosensitive planarian cells (Agata et al. 1998; Sakai et al. 2000). VC-1 was first detected in two clusters of cells on each side of the anterior region of the embryo at stage 6 [Fig. 2 (A)]. As development proceeded, projections from these clusters towards the brain and the other side of the embryo were evident, such that the typical visual nerve connections were established by stage 7 [Fig. 2 (B)]. However, the optic chiasma and ventrolateral visual axons were shorter and wider than in the juvenile and adult. These differences had disappeared by the time of hatching [Fig. 2 (C)], when the photosensitive system stained with VC-1 was similar to that described for adult planarians (Agata et al. 1998).

Similar results were observed for the expression of *Spol-opsin*. We identified a fragment of the ortholog *opsin* gene in *S. polychroa*, which showed high similarity to other described planarian *opsin* genes (Table S1). At stage 6, *Spol-opsin* was first expressed in two clusters of cells [Fig. 2 (D)], in a similar fashion to that observed with VC-1. This expression was maintained during stage 7 and in hatchlings [Fig. 2 (E, F)], when the localization of *Spol-opsin*-positive cells was clearly associated with the eyes and photoreceptor cells.

We then analysed the expression of *Spol-tph*, a specific marker of the pigment cells (Nishimura et al. 2007). We isolated a fragment of the orthologous gene in *S. polychroa*, with high similarity to the *tph* genes characterized in other planarians (Table S1). Expression was first detected at stage 5 in a few isolated cells in the margins of the future anterior region of the embryo (data not shown). At stage 6, it was strongly expressed in the anterior part of the embryo in two clusters of cells [Fig. 2 (G)]. At stage 7 and in hatchlings, *Spol-tph* was specifically detected in the differentiated pigment cells [Fig. 2 (H, I)].

To address whether different eye cell types have a common origin, as suggested by Takeda et al. (2009), we performed double fluorescent in situ hybridization with *Spol-*

*arrestin* and *Spol-tph* [Fig. 2 (J, K)]. As observed during regeneration (Takeda et al. 2009), both markers were co-expressed in certain cells during early stages of eye development [Fig. 2 (J, J')]. As development proceeded, each marker became restricted to a single cell population [Fig. 2 (K, K')].

Overall, the morphological and molecular data demonstrate that the onset of eye differentiation during planarian embryogenesis occurs at stage 6 in a cluster of eye precursor cells. A summary of the morphological events leading to eye formation is presented in Fig. 2 (L).

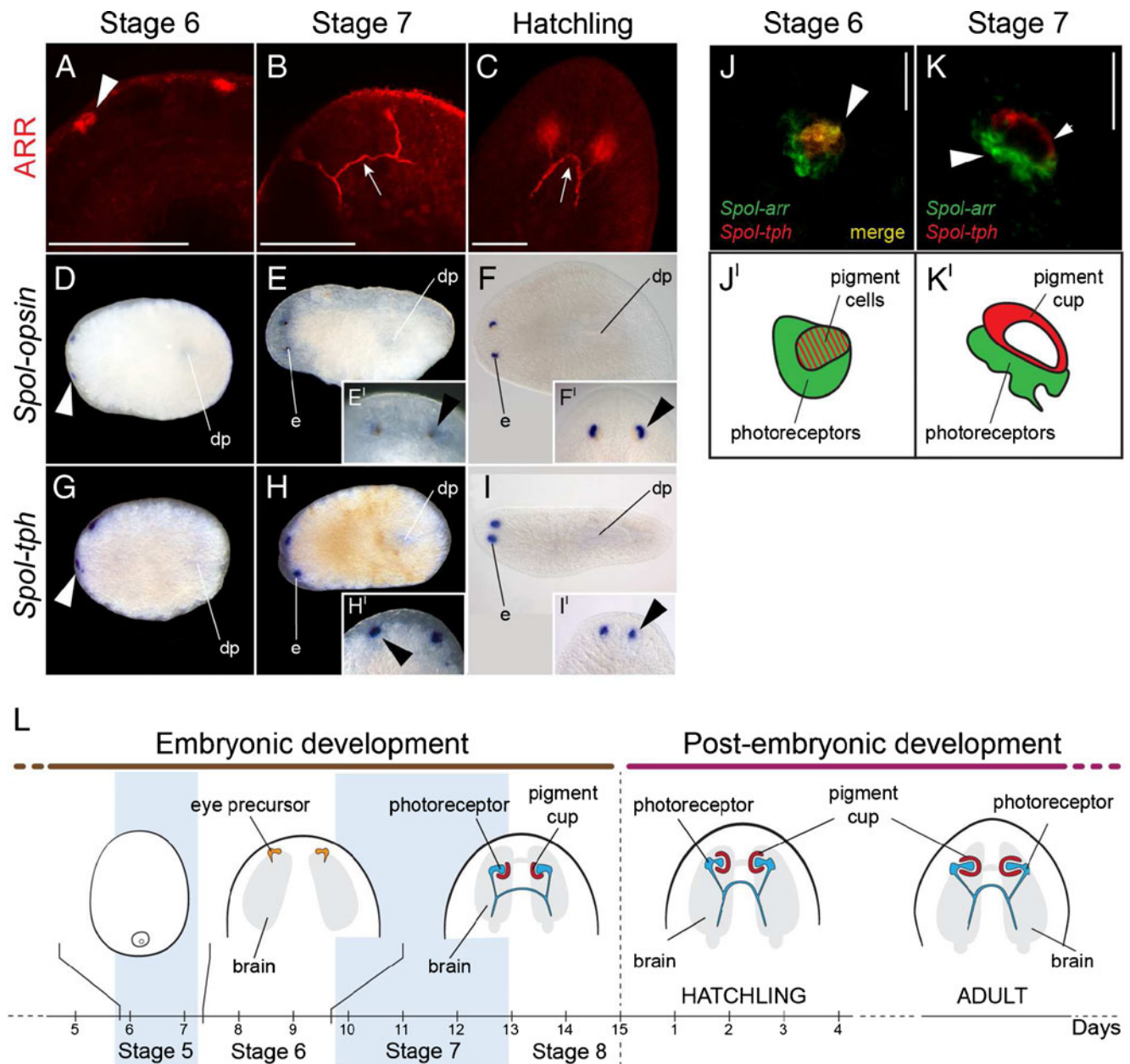
#### Expression of *pax6*, *so*, *eya* and *dach*

In order to study the involvement of the *pax6–so–eya–dach* gene network in the molecular specification of planarian eyes during embryogenesis, we identified partial fragments of *pax6*, *so*, *eya* and *dach* in *S. polychroa*. The first three genes showed high similarity with their respective orthologous genes from other planarian species (Table S1). The orthology of *Spol-dach* was assessed through phylogenetic analysis (Fig. S2A). We studied their expression during embryonic development and in hatchlings by means of whole-mount in situ hybridization (Fig. 3 and Fig. S3). *Spol-pax6* was first detected in stage 3–4 embryos, in isolated cells in the germ band (data not shown). At stage 5, the number of positive cells increased [Fig. 3 (A)]. As the embryo progressively adopted the definitive bilateral morphology and the definitive organs formed, expression became restricted to the central nervous system [Fig. 3 (B)]. At stage 7 and in hatchlings, *Spol-pax6* was detected in the brain and the ventral nerve cords [Fig. 3 (C) and Fig. S3]. *Spol-pax6* was not expressed in the developing eyes either at stage 6 or at stage 7 [Fig. 3 (B', C')].

*Spol-so* was detected in stage 5 embryos in a cluster of cells in the region opposite the embryonic pharynx [Fig. 3 (D, D')], which corresponds with the future anterior tip of the definitive embryo (Martín-Durán et al. 2010). As the embryo developed, this single group of *Spol-so*-positive cells divided into two lateral clusters (Fig. S4A, A'), and by stage 6, *Spol-so* was restricted to two clearly defined groups of cells in the anterior region [Fig. 3 (E, E')], which correspond to the developing eyes, as observed in stage 7 embryos [Fig. 3 (F, F')].

Analysis of the expression of *Spol-eya* revealed that it is first expressed at stage 6, in the developing central nervous system and eyes [Fig. 3 (H, H')]. This expression pattern was also observed in stage 7 embryos [Fig. 3 (I, I')] and hatchlings (Fig. S3), and matched the pattern already reported for adults (Mannini et al. 2004).

Finally, *Spol-dach* was first detected in stage 5 embryos, in isolated cells in the germ band [Fig. 3 (J)]. As development proceeded, expression became restricted to discrete



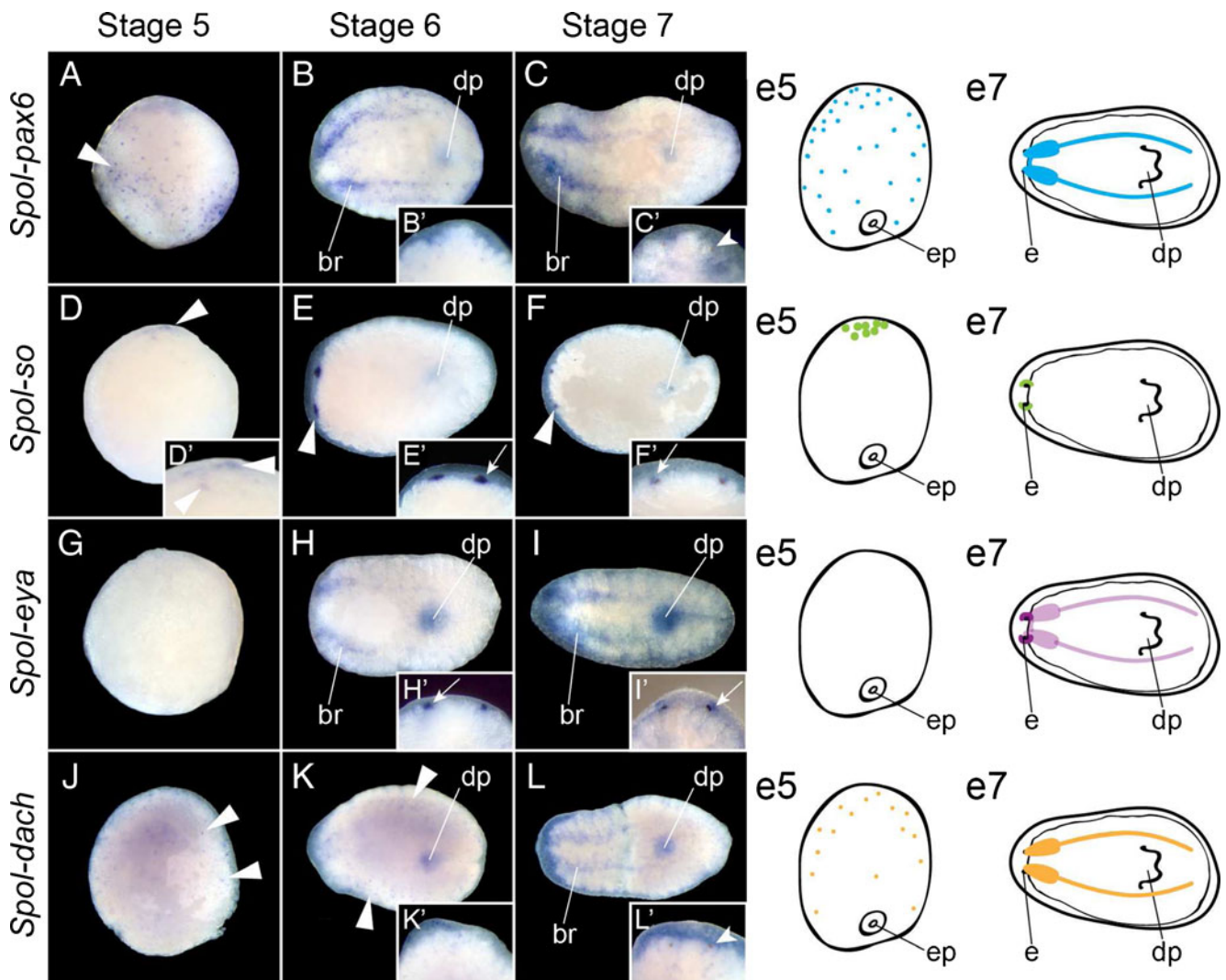
**Fig. 2** Embryonic development of eye cell types in *S. polychroa*. *A–C* z-projections of confocal stacks of the anterior region of embryos and hatchlings from whole-mount immunostaining with the VC-1 antibody. *D–I* whole-mount in situ hybridization on embryos and hatchlings with the photoreceptor-specific marker *Spol-opsin* and the pigment cell-specific marker *Spol-tph* (*E'–I'*, detail of the anterior region). *J, K* z-projections of confocal stacks of the eye in stage 6 and stage 7 embryos, respectively. Both photoreceptors and pigment cells are specified at stage 6, in two anterior clusters of about 20–30 cells (*A, D, G*). Within this clusters, *Spol-opsin* and *Spol-tph* are co-expressed in a subset of cells of the eye precursor (*J, J'*). At stage 7, the overall

morphology of the planarian eye is discernible (*B, E, H*), and the cell-specific differentiation markers *Spol-opsin* and *Spol-tph* become restricted to their respective cell populations (*K, K'*), although the eye is not morphologically mature until hatching (*C, F, I*). The process of embryonic eye differentiation is illustrated in *L*. In *A, D, G* and *J, J'*, white arrowheads point to the eye precursor; in *B* and *C*, white arrows indicate the optic chiasma; in *E', F', H'* and *I'* black arrowheads point to the eyes; in *K, K'* white arrowhead indicates the photoreceptors and white arrow points to the pigment cup. In *D–I*, anterior is to the left. Scale bars: 150  $\mu$ m (*A–C*), 30  $\mu$ m (*J, K*). In *L*, drawings are not to scale. *dp* definitive pharynx, *e* eye

cells probably associated with the formation of the central nervous system [Fig. 3 (*K, L*)]. *Spol-dach* was not detected in the eyes either in stage 6 or in stage 7 embryos [Fig. 3 (*K', L'*)].

Expression of *Rx*, *otxA*, *otxB* and *atonal*

To further investigate the expression of conserved genes involved in the specification and molecular patterning of



**Fig. 3** Expression of *pax6*, *so*, *eya* and *dach* in planarian embryos. Whole-mount in situ hybridization of *Spol-pax6*, *Spol-so*, *Spol-eya* and *Spol-dach* at different stages of eye development (A–L). On the right, diagrams representing the expression of each gene at stage 5 and stage 7. Drawings are not to scale. In all panels of stages 6 and 7, anterior is to the left and embryos are in ventral view, except in E and F. In A, white arrowheads point to *Spol-pax6*-positive cells. In D–F, white

arrowheads indicate the expression of *Spol-so*. In J and K, white arrowheads point to *Spol-dach*-positive cells. B'–L', higher magnification of the anterior region of the embryo in dorsal view (white arrows point to the expression domain in the eye, while white arrowheads indicate the eyes). *br* brain, *dp* definitive pharynx, *e* eye, *ep* embryonic pharynx

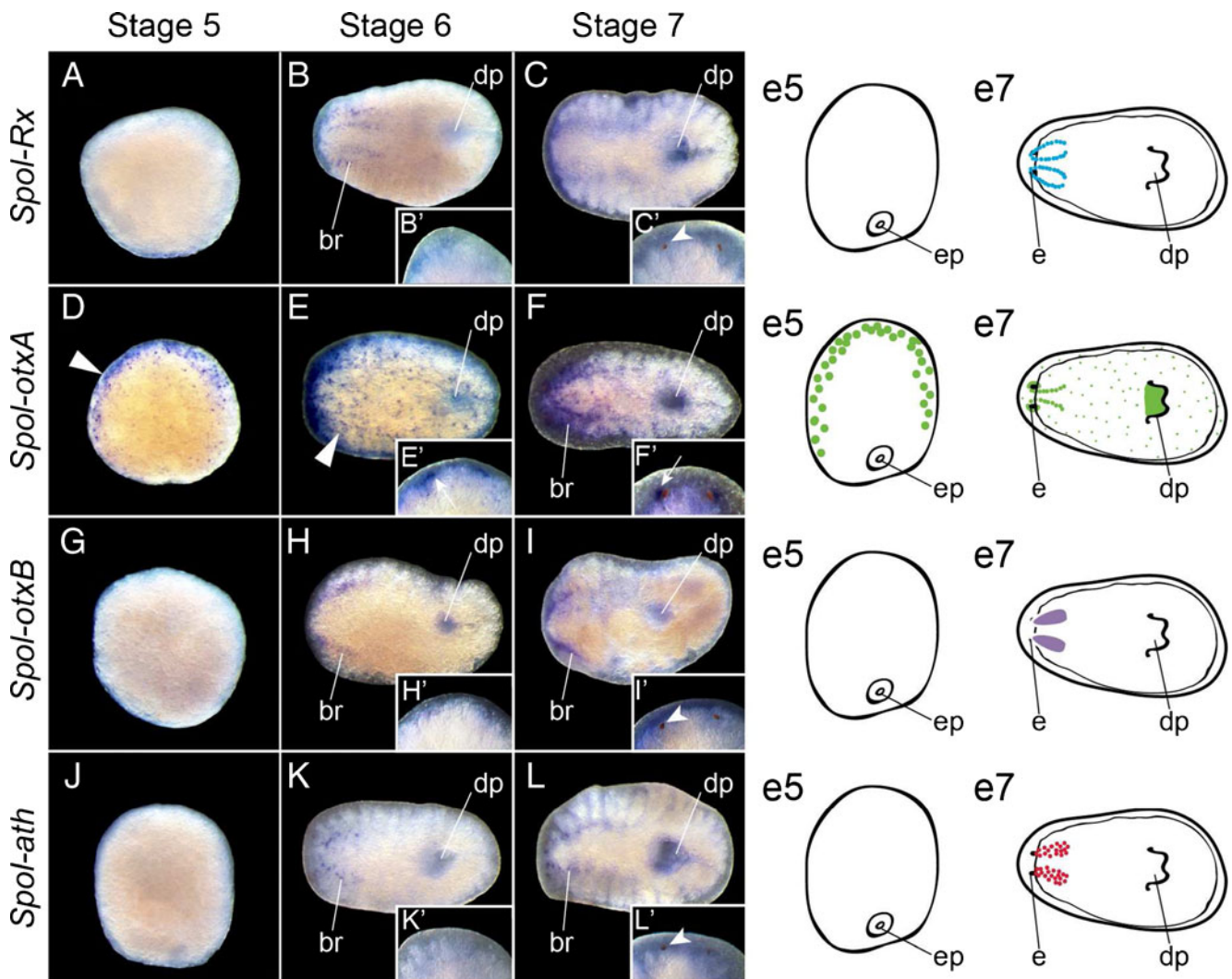
metazoan eyes, we isolated partial fragments of the transcription factors *retinal homeobox (Rx)* and *orthodenticle (otxA and otxB)*. Their sequences showed a high similarity with the orthologs identified in other planarians (Table S1). We also identified the bHLH transcription factor *atonal* and assigned its orthology through phylogenetic analysis (Fig. S2B). Finally, we analysed their expression by means of whole-mount in situ hybridization in embryos and hatchlings (Fig. 4 and Fig. S3).

*Spol-Rx* was not detected in stage 5 embryos [Fig. 4 (A)], being first detected in the medial and lateral region of the developing brain in stage 6 embryos [Fig. 4 (B)], but no expression was observed in the developing eyes [Fig. 4 (B')].

This pattern was similar to that reported during eye regeneration in the species *Dugesia japonica* (Mannini et al. 2008). At stage 7, staining in the brain was more faint, although it was still visible in the medial domain [Fig. 4 (C, C')]. No expression was observed in hatchlings, as reported for intact adult planarians (Mannini et al. 2008).

*Spol-otxA* was first detected at stage 5 in cells of the germ band distributed throughout the embryo, which later condensed into two marginal stripes running anteroposteriorly [Fig. 4 (D)]. As the embryo developed, expression became restricted to the developing brain, scattered cells in the parenchyma and the pharynx, and two anterior clusters that corresponded to the developing eyes [Fig. 4 (E, E')]. Finally,





**Fig. 4** Expression of *Rx*, *otxA*, *otxB* and *atonal* in planarian embryos. Whole-mount in situ hybridization of *Spol-Rx*, *Spol-otxA*, *Spol-otxB* and *Spol-ath* at different stages of eye development (A–L). On the right, diagrams representing the expression of each gene at stages 5 and 7. Drawings are not to scale. In all panels of stage 6 and 7, anterior is to the left and embryos are in ventral view. In D and E, white

arrowheads point to *Spol-otxA*-positive cells. B'–L', higher magnification of the anterior region of the embryo in dorsal view. In C', I' and L', arrowheads point to the eye. In E' and F', arrows indicate the expression of *Spol-otxA* in the eyes. br brain, dp definitive pharynx, e eye, ep embryonic pharynx

the expression pattern in stage 7 embryos and hatchlings matched that of adult planarians (Umesono et al. 1999; Iglesias et al. 2011), with specific expression in the photosensitive cells [Fig. 4 (F, F') and Fig. S3]. In contrast, *Spol-otxB* was detected only from stage 6 onwards in the developing brain [Fig. 4 (G–I)]. At stage 7 and in hatchlings, *Spol-otxB* was expressed in the medial region of the brain, but not in the eyes [Fig. 4 (I, I') and Fig. S3], as observed in adults (Umesono et al. 1999; Almuedo-Castillo et al. 2011).

Finally, *Spol-ath* was first detected at stage 6 in individual cells, showing a brain-like pattern [Fig. 4 (J, K)]. This expression pattern was maintained in stage 7 embryos [Fig. 4 (L)] and hatchlings (Fig. S3), with no evidence of expression in the eyes [Fig. 4 (K', L')].

## Discussion

### Embryonic development of the eye in *S. polychroa*

In this study we describe the morphogenesis and molecular patterning of the eyes during the embryogenesis of *S. polychroa*. The adult eye in this species is of the inverted type, with a multicellular pigment cup and multiple rhabdomeric photoreceptors [Fig. 1 (D, D')]. It is, therefore, a prototypic eye for freshwater planarians belonging to the family DugesIIDae (Carpenter et al. 1974).

Previous studies associated the onset of eye differentiation with the appearance of the pigment cup (Stevens 1904; Le Moigne 1963). However, our molecular data (Figs. 2 and 3) demonstrate that eyes are specified and differentiate

before the pigment cup is visible. Accordingly, the embryonic development of the visual organs can be divided into four major steps [Fig. 2 (L)]: specification of eye precursor cells (expression of *sine oculis*, co-expression of *arrestin* and *tph*), differentiation of photoreceptor cells and pigment cells (segregation of cell type-specific markers), establishment of the proper nervous visual connections (formation of the optic chiasma) and pigment cup, and finally, maturation of the visual organs to acquire the adult morphology and proportions. This model is consistent with observations made during adult eye regeneration (Mannini et al. 2004; Takeda et al. 2009; Lapan and Reddien 2011; Yamamoto and Agata 2011). Therefore, our data show that embryonic eye development and eye regeneration proceed in a similar way in planarians, and support a close relationship between late embryogenesis (stages 5–8) and adult regeneration in these organisms (Martín-Durán et al. 2010; Martín-Durán and Romero 2011).

#### Role of the *pax6–so–eya–dach* gene network in planarian eye embryogenesis

Many studies have shown a crucial role for *pax6* in the development of eyes in vertebrate and arthropod embryos (Hill et al. 1991; Quiring et al. 1994; Halder et al. 1995; Chow et al. 1999), as well as in many other bilaterians (reviewed in Arendt and Wittbrodt 2001), and even in cnidarians (Kozmik et al. 2003; Ruzickova et al. 2009). Based on this evidence, some authors have proposed that *pax6* is a master control gene in metazoan eye development (Gehring and Ikeo 1999).

Among the spiralian, the expression of *pax6* has been described in the annelids *Platynereis dumerilii* and *Helobdella robusta* (Arendt et al. 2002; Quigley et al. 2007), the nemertean *Lineus sanguineus* (Loosli et al. 1996), the mollusk *Loligo opalescens* (Tomarev et al. 1997), the brachiopod *Terebratalia transversa* (Passamanek et al. 2011), and the planarians *D. japonica* and *Girardia tigrina* (Callaerts et al. 1999; Pineda et al. 2001, 2002; Rossi et al. 2001). In all cases, with the exception of adult planarians, *pax6* is expressed during embryonic eye development, in particular during early embryonic stages or in larvae. In *P. dumerilii* and *L. opalescens*, *pax6* is not expressed in the adult eye nor in differentiated photoreceptors and pigment cells. However, *pax6* is expressed in the central nervous system in all the organisms studied. Our study shows that *pax6* is not expressed in the eyes during the embryonic development of *S. polychroa* [Fig. 3 (A–C)], indicating that, unlike in most spiralian, *pax6* is not required for the embryonic and post-embryonic formation of the visual organs in planarians.

The expression of *so* has been studied in fewer spiralian. In particular, there are expression data for the annelids *P. dumerilii* and *Helobdella* sp. (Arendt et al. 2002; Quigley et

al. 2010) and the planarians *D. japonica* and *G. tigrina* (Pineda et al. 2002; Mannini et al. 2004). In *P. dumerilii* and in planarians, *so* is expressed throughout the development of the eye. However, there are at least six members of this subfamily in the lineage leading to *Helobdella* sp., and the expression of only one of them, *Hau-Six1/2A* which is not expressed in the eyes, has been analysed. The remaining members should thus be analysed to confirm expression of this group in the eyes of the leech. Accordingly, the expression pattern described in our study for *so* [Fig. 3 (D–F)] matches the expression described in other spiralian, thus suggesting a conserved role for this gene in eye development in this group of protostomes. Moreover, the expression of *so* in stage 5 embryos suggests that planarian eyes are formed from a single anterior unpaired eye-forming field that later on divides into left and right eye anlagen, possibly by the action of midline-derived signals. This hypothesis was also proposed to explain planarian eye regeneration (Sakai et al. 2000). Nevertheless, more work is required to solidify these models and compare them with eye development in other animals.

The function of *eya* in spiralian has only been studied during adult planarian regeneration (Mannini et al. 2004). In the planarian *D. japonica*, *eya* is expressed in the eyes and the central nervous system, and is essential for proper eye regeneration. The expression pattern observed in *S. polychroa* embryos is thus similar to that reported in adult planarians, suggesting that it may play a similar role.

Finally, the expression of *dach* during embryogenesis has been studied in the annelids *P. dumerilii* and *Neanthes arenaeodentata* (Tomer et al. 2010; Winchell et al. 2010) and in the planarian *S. mediterranea* (Lapan and Reddien 2011). In *P. dumerilii*, *dach* is a specific marker of the mushroom bodies and in *N. arenaeodentata* it is detected in the central and peripheral nervous system and mesoderm, but not in the eyes. Similarly, *dach* is not expressed in the eyes in *S. mediterranea*. Thereby, the expression observed in *S. polychroa* embryos is similar to that described in adult planarians and annelids, indicating the involvement of this gene in the development of nervous structures, but not in the visual system.

Altogether, these results suggest that the *pax6–so–eya–dach* network is not assembled in planarians as it has shown to be in other organisms, such as *Drosophila* or vertebrates (Erclik et al. 2009), at least during the embryonic formation of the eye. Whereas the interaction between *so* and *eya* has been demonstrated in adult planarians (Mannini et al. 2004), expression and RNAi studies indicate that neither *pax6* nor *dach* is required for eye embryonic development and adult regeneration (Pineda et al. 2002; Lapan and Reddien 2011, this study). Further investigations have to be carried out to determine the upstream regulators and downstream effectors of the planarian *so–eya* circuit in the formation of the eye, as well as its similarity to other well-known models.

## Expression of *Rx*, *otx* genes, and *atonal*

*Rx* is expressed around the apical organ and ciliary photoreceptor cells in *P. dumerilii* (Arendt et al. 2004). In the planarians *S. mediterranea* and *D. japonica*, however, it is expressed in the medial and lateral regions of the brain during regeneration, but is not detected in the eyes nor in the intact adult (Mannini et al. 2008). The expression data obtained herein for planarian embryos are, therefore, similar to those reported for adult planarian regeneration and, overall, suggest that *Rx* may play a conserved role in central nervous system development in spiralian, while being required for the specific development of ciliary photoreceptors (Arendt et al. 2004).

*Otx* is known to play a conserved role in metazoan eyes (reviewed in Vopalensky and Kozmik 2009) and in spiralian. This role has been demonstrated in the annelids *P. dumerilii* and *Hydroides elegans* (Steinmetz et al. 2011; Arenas-Mena and Wong 2007) and the brachiopod *T. transversa* (Passamanek et al. 2011). The planarians *S. mediterranea* and *D. japonica* present two paralogs: *otxA*, expressed in the photoreceptors, the brain and the parenchyma and required for the proper regeneration of photoreceptors (Umesono et al. 1999; Iglesias et al. 2011; Lapan and Reddien 2011), and *otxB*, expressed only in the brain (Umesono et al. 1999; Almuedo-Castillo et al. 2011). Our data [Fig. 4 (D–I)] agree with the expression patterns reported for other planarians and demonstrate that *otxA* is also involved in eye development during embryogenesis, thus indicating the ancient role of this family of transcription factors in metazoan eye development.

Finally, *atonal* shows a conserved pattern of expression in the photoreceptor precursors of the annelid *P. dumerilii* (Arendt et al. 2002). Our study demonstrates that *atonal* is expressed in a brain-like pattern during late planarian development [Fig. 4 (J–L)], once neural differentiation has begun (Cardona et al. 2005). Our data thus do not indicate a role for this gene in planarian eye development.

## Conclusions

Using both morphological and molecular data, we have characterized the embryonic development and molecular patterning of the eye in planarian embryos. The expression and localization of cell type-specific molecular markers support a model of eye development in which both photoreceptors and pigment cells share a common precursor, as also suggested by adult planarian regeneration (Takeda et al. 2009). The similarities observed between eye formation in embryogenesis and regeneration are also supported by the commonality of conserved transcription factors associated with eye development in both processes.

Our study supports the notion that the development of eyes in planarians is a *pax6*-independent process. The absence of other conserved eye-related genes, such as *dach*, *Rx* and *atonal*, suggests that rather than being prototypic, planarian eyes show important differences to the inferred ancestral eye-patterning mechanisms. Although progress is being made in deciphering alternative molecular mechanisms involved in eye formation (Lapan and Reddien 2011), further work is required to gain an overall picture of eye development in planarians.

**Acknowledgements** We thank M. Vila-Farré and F. Cebrià for support and comments on this manuscript. JMM-D was an FPU fellow funded by the MICINN (Ministerio de Ciencia e Innovación), Spain. FM is an APIF fellow at the University of Barcelona, Spain. This work was supported by MEC BFU- 2007–63209, Spain, to RR.

## References

- Abascal F, Zardoya R, Posada D (2005) Protest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21:2104–2105
- Agata K, Soejima Y, Kato K, Kobayashi C, Umesono Y, Watanabe K (1998) Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. *Zool Sci* 15:433–440
- Aguinaldo AM, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, Lake JA (1997) Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387:489–493
- Almuedo-Castillo M, Saló E, Adell T (2011) *Dishevelled* is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:2813–2818
- Arenas-Mena C, Wong K (2007) *HeOtx* expression in an indirectly developing polychaete correlates with gastrulation by invagination. *Dev Genes Evol* 217:373–384
- Arendt D (2003) Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol* 47:563–571
- Arendt D, Wittbrodt J (2001) Reconstructing the eyes of urbilateria. *Phil Trans R Soc B* 356:1545–1563
- Arendt D, Tessmar K, de Campos-Baptista MI, Dorresteijn A, Wittbrodt J (2002) Development of pigment-cup eyes in the polychaete *Platynereis dumerilii* and evolutionary conservation of larval eyes in Bilateria. *Development* 129:1143–1154
- Arendt D, Tessmar-Raible K, Snyman H, Dorresteijn AW, Wittbrodt J (2004) Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. *Science* 306:869–871
- Callaerts P, Muñoz-Mármol AM, Gldon S, Castillo E, Sun H, Li WH, Gehring WJ, Saló E (1999) Isolation and expression of a *Pax-6* gene in the regenerating and intact planarian *Dugesia (G) tigrina*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:558–563
- Cardona A, Hartenstein V, Romero R (2005) The embryonic development of the triclade *Schmidtea polychroa*. *Dev Genes Evol* 215:109–131
- Carpenter KS, Morita M, Best JB (1974) Ultrastructure of the photoreceptor of the planarian *Dugesia dorotocephala*. I. Normal eye. *Cell Tissue Res* 148:143–158
- Chow RL, Altmann CR, Lang RA, Hemmati-Brivanlou A (1999) *Pax6* induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126:4213–4222
- Erclik T, Hartenstein V, McInnes RR, Lipshitz HD (2009) Eye evolution at high resolution: the neuron as a unit of homology. *Dev Biol* 332:70–79



- Frohman MA (1994) On beyond classic race (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Meth Appl* 4:40–58
- Gehring WJ, Ikeo K (1999) Pax6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* 15:371–377
- Halanych KM, Bacheller JD, Aguinaldo AM, Liva SM, Hillis DM, Lake JA (1995) Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. *Science* 267:1641–1643
- Halder G, Callaerts P, Gehring WJ (1995) Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267:1788–1792
- Hill RE, Favor J, Hogan BLM, Ton CCT, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, van Heyningen V (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354:522–525
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754–755
- Hyman LH (1951) The invertebrates, vol II. Platyhelminthes and Rhynchocoela. McGraw-Hill, New York, chap The Platyhelminthes
- Iglesias M, Almuedo-Castillo M, Aboobaker A, Saló E (2011) Early planarian brain regeneration is independent of blastema polarity mediated by the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Dev Biol* 358:68–78
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30:3059–3066
- Kozmik Z, Daube M, Frei E, Norman B, Kos L, Dishaw LJ, Noll M, Piatigorsky J (2003) Role of *pax* genes in eye evolution: a cnidarian *paxb* gene uniting *pax2* and *pax6* functions. *Dev Cell* 5:773–785
- Lapan SW, Reddien PW (2011) *dlx* and *sp6-9* control optic cup regeneration in a prototypic eye. *PLoS Genet* 7:e1002–e1226
- Le Moigne A (1963) Etude du développement embryonnaire de *Polycelis nigra* (Turbellarié, Triclade). *Bull Soc Zool Fr* 88:403–422
- Leys SP, Degnan BM (2001) Cytological basis of photosensitive behaviour in a sponge larva. *Biol Bull* 201:323–338
- Loosli F, Kmita-Cunisse M, Gehring WJ (1996) Isolation of a *Pax-6* homolog from the ribbonworm *Lineus sanguineus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2658–2663
- Mannini L, Rossi L, Deri P, Gremigni V, Salvetti A, Saló E, Batistoni R (2004) *Djeves absent (Djeva)* controls prototypic planarian eye regeneration by cooperating with the transcription factor *Djsix-1*. *Dev Biol* 269:346–359
- Mannini L, Deri P, Picchi J, Batistoni R (2008) Expression of a *retinal homeobox (Rx)* gene during planarian regeneration. *Int J Dev Biol* 52:1113–1117
- 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
- Martín-Durán JM, Duocastella M, Serra P, Romero R (2008) New method to deliver exogenous material into developing planarian embryos. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 310B:668–681
- Martín-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
- Nishimura K, Kitamura Y, Inoue T, Umeson Y, Yoshimoto K, Takeuchi K, Taniguchi T, Agata K (2007) Identification and distribution of *tryptophan hydroxylase (tph)*-positive neurons in the planarian *Dugesia japonica*. *Neurosci Res* 59:101–106
- Passamaneck YJ, Furchheim N, Hejzol A, Martindale MQ, Luter C (2011) Ciliary photoreceptors in the cerebral eyes of a protostome larva. *EvoDevo* 2:6
- Pineda D, González J, Callaerts P, Ikeo K, Gehring WJ, Saló E (2000) Searching for the prototypic eye genetic network: *sine oculis* is essential for eye regeneration in planarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4525–4529
- Pineda D, González J, Marsal M, Saló E (2001) Evolutionary conservation of the initial eye genetic pathway in planarians. *Belg J Zool* 131(Supplement 1):77–82
- Pineda D, Rossi L, Batistoni R, Salvetti A, Marsal M, Gremigni V, Falleni A, González-Linares J, Deri P, Saló E (2002) The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is *pax6* independent. *Development* 129:1423–1434
- Quigley IK, Xie X, Shankland M (2007) *Hau-Pax6A* expression in the central nervous system of the leech embryo. *Dev Genes Evol* 217:459–468
- Quigley IK, Schmerer MW, Shankland M (2010) A member of the six gene family promotes the specification of p cell fates in the o/p equivalence group of the leech *Helobdella*. *Dev Biol* 344:319–330
- Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ (1994) Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265:785–789
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574
- Rossi L, Batistoni R, Salvetti A, Deri P, Bernini F, Andreoli I, Falleni A, Gremigni V (2001) Molecular aspects of cell proliferation and neurogenesis in planarians. *Belg J Zool* 131(Supplement 1):83–87
- Ruzickova J, Piatigorsky J, Kozmik Z (2009) Eye-specific expression of an ancestral jellyfish *paxb* gene interferes with *pax6* function despite its conserved *pax6/pax2* characteristics. *Int J Dev Biol* 53:469–482
- 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. *Zool Sci* 17:375–381
- Salvini-Plawen L, Mayr E (1961) Evolutionary biology, vol 10. Plenum Press, New York, pp 207–263
- Schmidt-Rhaesa A (2007) The evolution of organ systems. Oxford University Press, Oxford, pp 118–147, chap Sensory organs
- Sluys R (1989) A monograph of the marine triclads. Rotterdam & Brookfield, Rotterdam
- Steinmetz PRH, Kostyuchenko RP, Fischer A, Arendt D (2011) The segmental pattern of *otx*, *gbx*, and *Hox* genes in the annelid *Platynereis dumerilii*. *Evol Dev* 13:72–79
- Stevens NM (1904) On the germ cells and the embryology of *Planaria simplicissima*. *Proc Acad Nat Sci Philadelphia* 56:208–220
- Takeda H, Nishimura K, Agata K (2009) Planarians maintain a constant ratio of different cell types during changes in body size by using the stem cell system. *Zool Sci* 26:805–813
- Tomarev SI, Callaerts P, Kos L, Zinovieva R, Halder G, Gehring WJ, Piatigorsky J (1997) Squid *Pax-6* and eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2421–2426
- Tomer R, Denes AS, Tessmar-Raible K, Arendt D (2010) Profiling by image registration reveals common origin of annelid mushroom bodies and vertebrate pallium. *Cell* 142:800–809
- 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. *Develop 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
- Vopalensky P, Kozmik Z (2009) Eye evolution: common use and independent recruitment of genetic components. *Phil Trans R Soc B* 364:2819–2832
- Winchell CJ, Valencia JE, Jacobs DK (2010) Expression of *Distal-less*, *dachshund*, and *optomotor blind* in *Neanthes arenaceodentata* (Annelida, Nereididae) does not support homology of appendage-forming mechanisms across the Bilateria. *Dev Genes Evol* 220:275–295
- Yamamoto H, Agata K (2011) Optic chiasm formation in planarian I: cooperative *netrin*- and *robo*-mediated signals are required for the early stage of optic chiasm formation. *Develop Growth Differ* 53:300–311



## Material Suplementari

Gene	Length (bp)	Orthologue	% Identity <sup>1</sup>
<i>Spol-opsin</i>	385 <sup>a</sup>	<i>Smed-opsin</i> (Sánchez Alvarado and Newmark 1999); <i>Gt-opsin</i> (Pineda et al 2000); <i>Dj-opsin</i> (Mannini et al 2004)	99.22 <sup>b</sup> ; 96.15 <sup>c</sup> ; 95.04 <sup>d</sup>
<i>Spol-tph</i>	711 <sup>a</sup>	<i>Smed-tph</i> (Fraguas et al 2011); <i>Dj-tph</i> (Nishimura et al 2007)	96.05 <sup>b</sup> ; 92.59 <sup>d</sup>
<i>Spol-pax6</i>	979 <sup>a</sup>	<i>Gt-pax6A</i> (Pineda et al 2002); <i>Dj-pax6A</i> (Pineda et al 2002)	96.63 <sup>c</sup> ; 98.47 <sup>d</sup>
<i>Spol-so</i>	998 <sup>a</sup>	<i>Gt-so</i> (Pineda et al 2000); <i>Dj-so</i> (Mannini et al 2004)	89.49 <sup>c</sup> ; 92.79 <sup>d</sup>
<i>Spol-eya</i>	844 <sup>a</sup>	<i>Dj-eya</i> (Mannini et al 2004)	96.44 <sup>d</sup>
<i>Spol-Rx</i>	601 <sup>a</sup>	<i>Smed-Rx</i> (Mannini et al 2008); <i>Gt-Rx</i> (Saló et al 2002); <i>Dj-Rx</i> (Mannini et al 2008)	99.49 <sup>b</sup> ; 100 <sup>c</sup> ; 95.95 <sup>d</sup> ;
<i>Spol-otxA</i>	1163 <sup>a</sup>	<i>Dj-otxA</i> (Umesono et al 1999)	83.3 <sup>d</sup>
<i>Spol-otxB</i>	409 <sup>a</sup>	<i>Dj-otxB</i> (Umesono et al 1999)	85.71 <sup>d</sup>

<sup>1</sup> comparing protein sequences

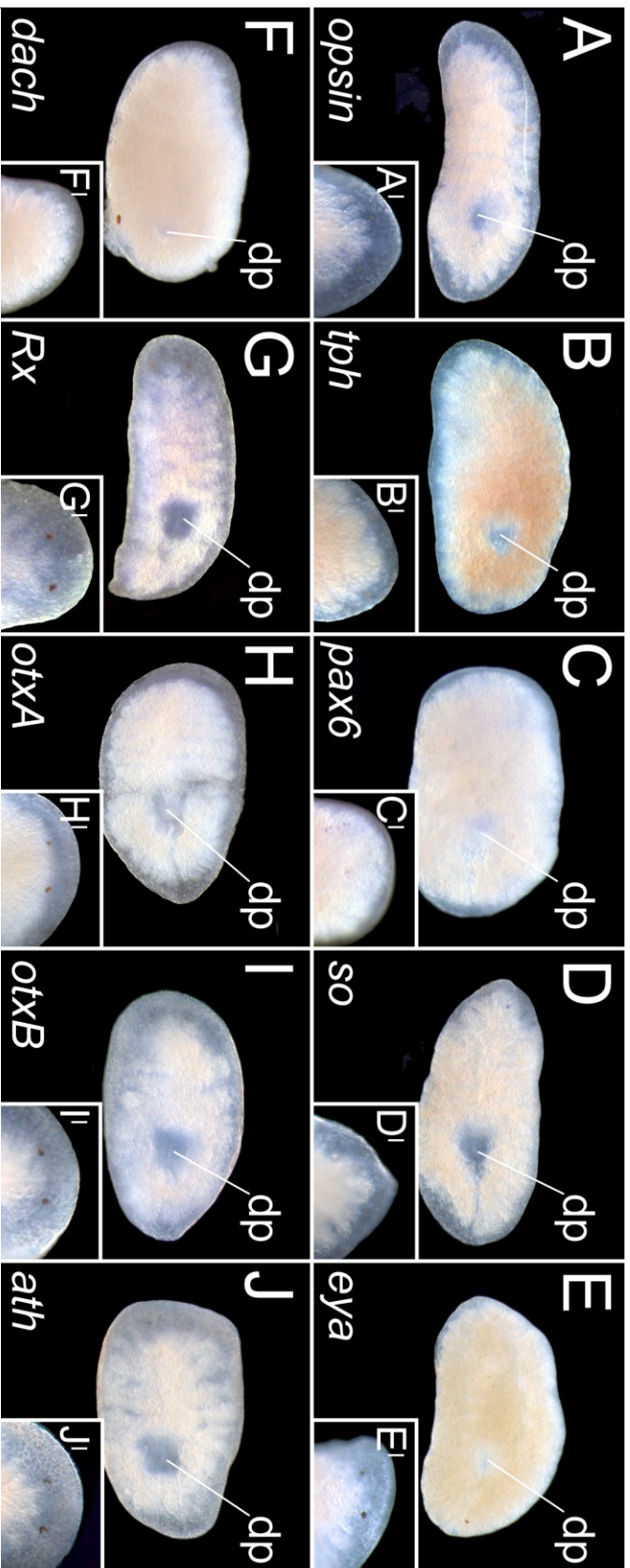
<sup>a</sup> partial CDS

<sup>b</sup> *S. polychroa* vs *S. mediterranea*

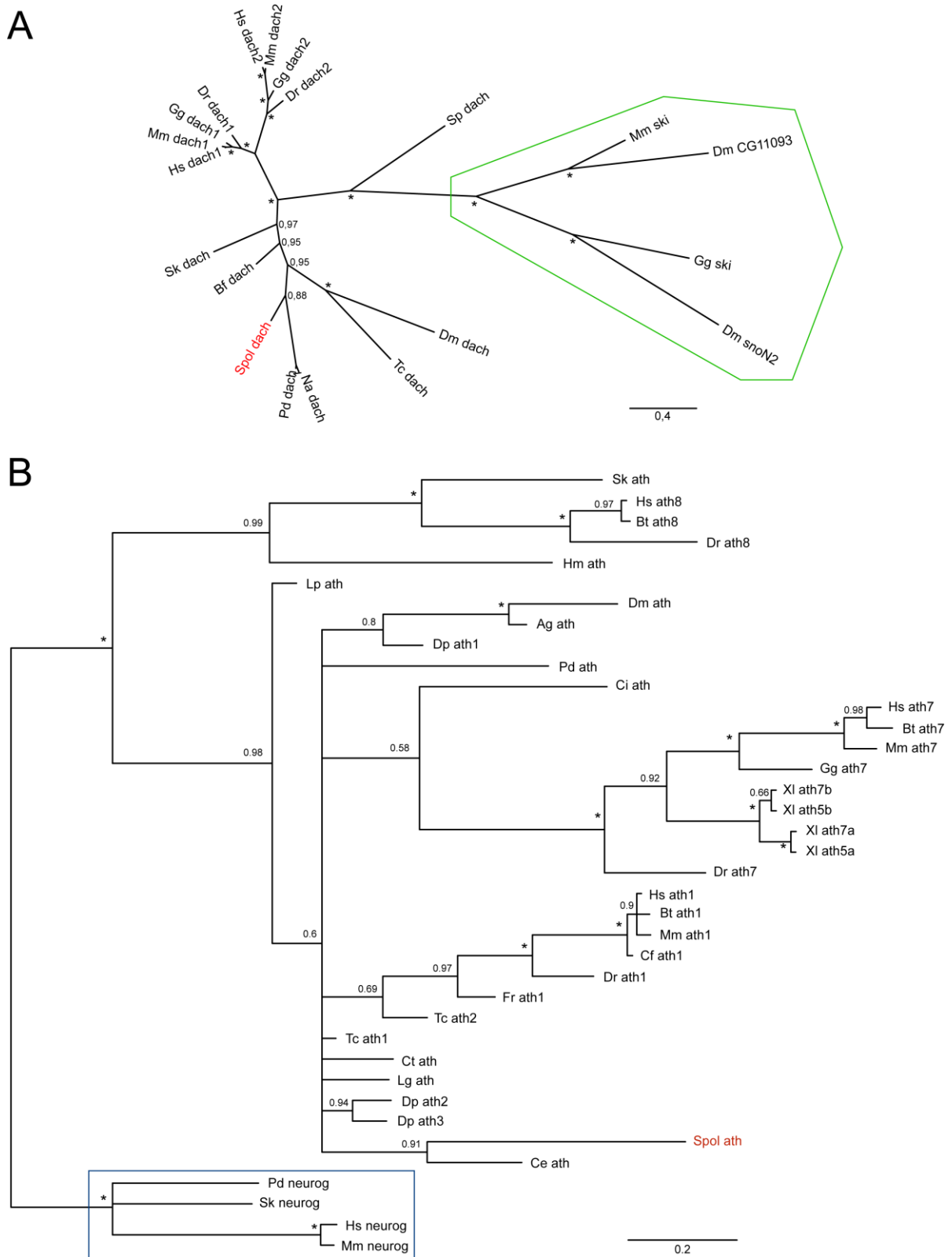
<sup>c</sup> *S. polychroa* vs *G. tigrina*

<sup>d</sup> *S. polychroa* vs *D. japonica*

**Table S1 – List of analyzed planarian eye genes and similarity with their orthologous genes in othe planarian species.**

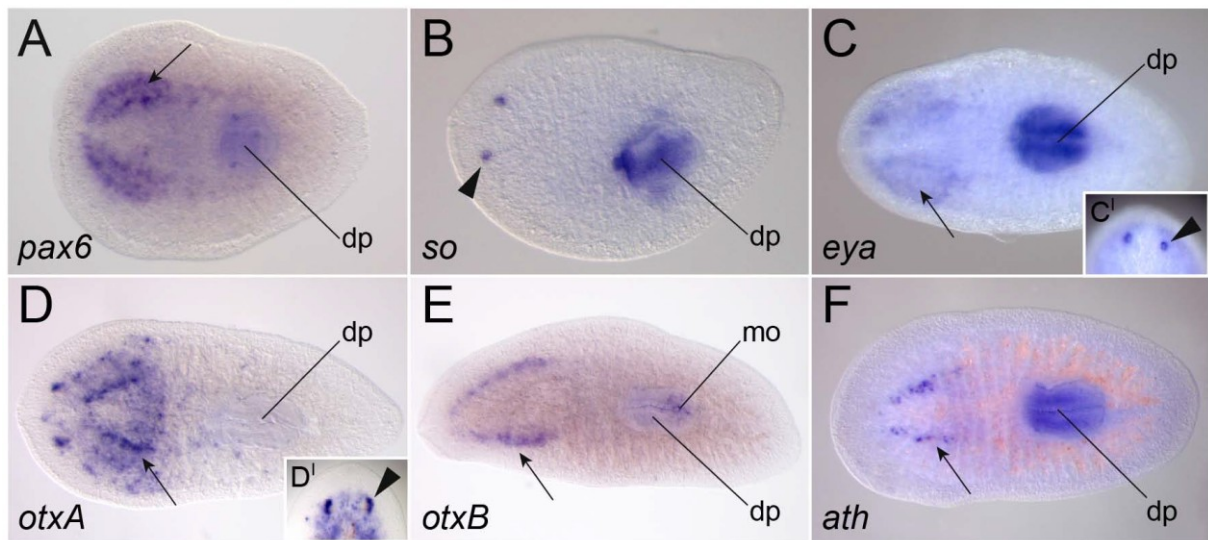


**Figure S1. Expression of the sense riboprobes of the analyzed genes in stage 7 embryos.** A-H, whole-mount *in situ* hybridization of the sense riboprobes of the studied genes. In all panes, anterior is to the left and views are ventral. A'-H', details of the anterior region of the embryos, in dorsal view. dp definitive pharynx.

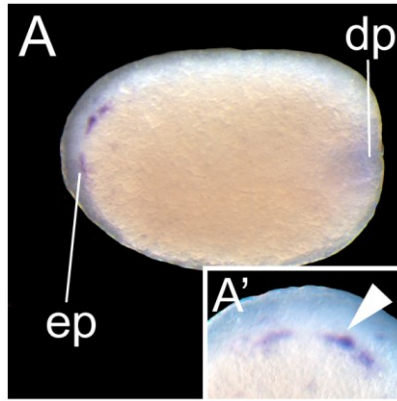


**Figure S2. Phylogenetic analysis of the orthology of *Spol-dach* and *Spol-ath*.** A, B, phylogenetic reconstruction of DACH and ATH affinities, respectively. Support value of branches are posterior probabilities of Bayesian likelihood (only those above 0.5 are shown. Posterior probabilities  $\geq 0.99$  are indicated with an asterisk). In both trees, *S. polychroa* sequences are highlighted in red, and outgroups are framed by a green and blue rectangle, respectively. Taxon names for gene sequences are abbreviated as follows: Ag *Anopheles*

*gambiae*, Bf *Branchiostoma floridae*, Bt *Bos taurus*, Ce *Caenorhabditis elegans*, Ci *Ciona intestinalis*, Cf *Canis familiaris*, Dm *Drosophila melanogaster*, Ct *Capitella teleta*, Dp *Daphnia pulex*, Dr *Danio rerio*, Fr *Fugu rubripes*, Gg *Gallus gallus*, Hs *Homo sapiens*, Lp *Limulus polyphemus*, Mm *Mus musculus*, Na *Neanthes arenaceodentata*, Pd *Platynereis dumerilii*, Sk *Saccoglossus kowalevskii*, Sp *Strongylocentrotus purpuratus*, Spol *S. polychroa*, Tc *Tribolium castaneum*, XI *Xenopus laevis*.



**Figure S3. Expression of eye-related genes in *S. polychroa* hatchlings.** A-F, whole-mount in situ hybridization of *Spol-pax6*, *Spol-so*, *Spol-eya*, *Spol-otxA*, *Spol-otxB*, and *Spol-ath*, respectively. C'-D', higher magnification of the anterior dorsal side. In all panels, anterior is to the left; A, C-F ventral view; B dorsal view; black arrows indicate the brain and black arrowheads the eyes. br brain, mo mouth opening, dp definitive pharynx.



**Figure S4. Expression of *Spol-so* in the transition from stage 5 to stage 6.** A, whole-mount *in situ* hybridization of *Spol-so* in a stage 5-stage 6 embryo. A', higher magnification of the anterior dorsal side. In A, anterior is to the left; dorsal view. In A', white arrowhead indicates the dividing eye precursor field. ep eye precursor field, dp definitive pharynx.

# **DISCUSSIÓ GENERAL**





## 1. El desenvolupament del sistema nerviós i d'altres derivats de l'ectoderma a l'embrió de *Schmidtea polychroa*

Al llarg d'aquest treball hem utilitzat dues estratègies diferents per analitzar la neurogènesi embrionària de la planària *S. polychroa*: amb la generació de nous marcadors moleculars mitjançant l'optimització de les tècniques d'hiperimmunització dirigida i de la fusió cel·lular (Annex 2), i, sobre tot, amb l'anàlisi dels patrons d'expressió i de tinció de gens i anticossos específics neuronals (Martín-Durán i altres, 2002a; Monjo i Romero, 2015). Els nostre treball suposa, per tant, el primer estudi molecular detallat d'aquella qüestió en un representant del clade dels Platyhelminthes. Fins ara en aquest clade el desenvolupament del sistema nerviós i dels òrgans visuals havia estat tractat només en organismes dels grups Macrostromorpha (*Macrostomum sp.*, Morris i altres, 2004), Polycladida (*Imogine mcgrathi*, Younossi-Hartenstein i Hartenstein, 2000; *Maritigrella crozier*, Rawlison, 2010) i Rhabdocoela (*Mesosotoma lingua*, Younossi-Hartenstein i altres, 2000; *Craspedella pedum*, Younossi-Hartenstein i altres, 2001), i amb aproximacions experimentals que utilitzaven eines no tan específiques (p. e. amb l'ús d'anticossos com l'anti-tubulina acetilada; Younossi-Hartenstein i altres, 2000; Younossi-Hartenstein i altres, 2001)

A continuació integrarem i discutirem globalment els resultats que s'obtingueren amb aquelles estratègies i que es descriuen en les publicacions de que consta aquesta tesi. En concret, en aquesta primera secció de la discussió ens centrarem en l'impacte que tenen aquelles dades per la comprensió de l'organogènesi i l'especificació dels teixits derivats de l'ectoderm, sobre tot dels d'origen nerviós, en embrions de planària. Més endavant també analitzarem quins aspectes de la neurogènesi primerenca d'aquest organisme semblen estan conservats respecte dels principals models animals d'estudi dels bilaterals.

### Òrgans epitelials: epidermis embrionària

L'epidermis embrionària és un teixit present durant les primeres etapes de l'embriogènesi que recobreix el sincici vitel·lí i, més tard, la banda germinal derivada d'aquell sincici a *S. polychroa*. És, per tant, un òrgan diferenciat d'origen ectodèrmic que forma part de l'embrió transitori. La formació de l'epidermis embrionària s'havia descrit amb l'ajuda d'eines de microscòpia òptica i electrònica, i també d'alguns marcadors moleculars no específics en un seguit de treballs on es confirmava la seva naturalesa cel·lular, així com alguns aspectes del seu procés de formació i també del recanvi durant l'embriogènesi tardana (Cardona i altres, 2005b; Cardona i altres 2006). Però la limitació de les metodologies experimentals per caracteritzar l'embrió de *S. polychroa* havia impedit aprofundir més en aquesta qüestió (Martín-Durán i altres, 2012b).

Amb la tècnica d'aïllament d'hibridomes productors d'anticossos monoclonals nosaltres hem desenvolupat un marcador molecular novell per a l'epidermis embrionària, l'anticòs monoclonal EpEmb (Annex 2). Aquesta mateixa tècnica ja s'havia utilitzat en la planària *D. tigrina*, en adults intactes i regenerants, per detectar molècules clau implicades en

la formació del patró durant la regeneració (Bueno i altres, 2001; Bueno i altres, 2002; Fernández-Rodríguez, 2005). Els nostres resultats, reforcen la validesa d'aquella aproximació per descobrir no solament molècules bàsiques sinó també potencials mecanismes moleculars de control del desenvolupament de les planàries.

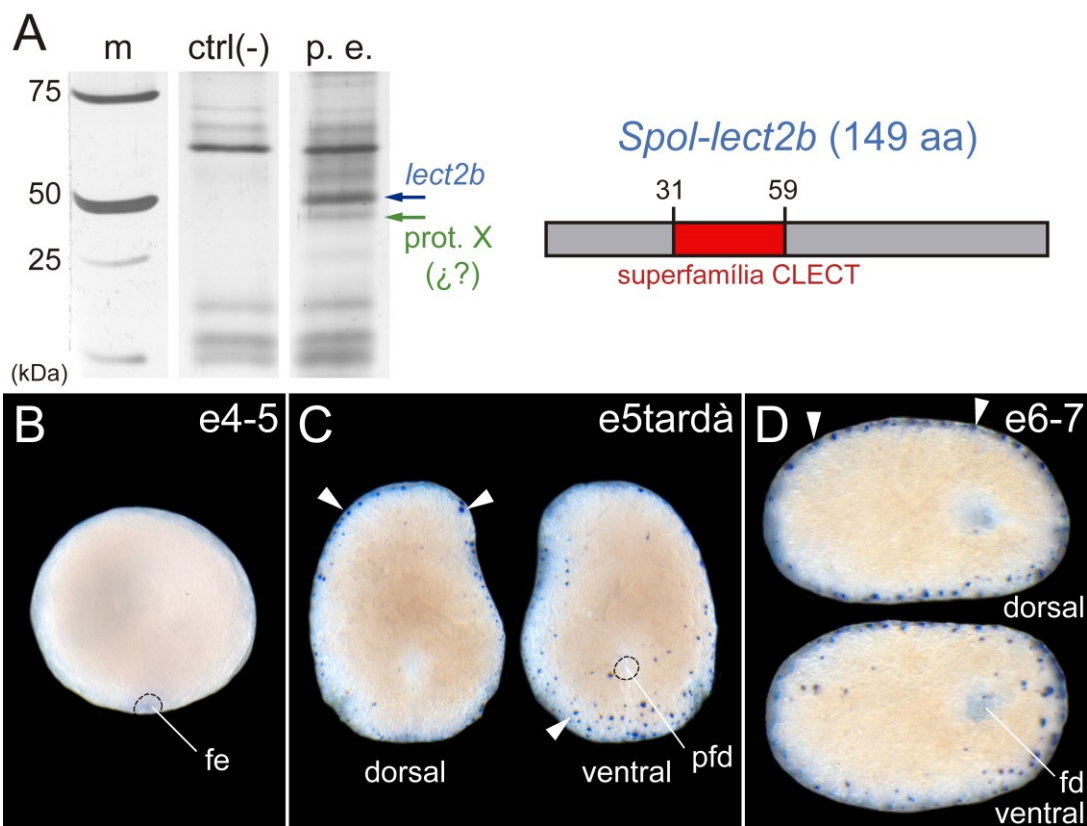
Les immunotincions efectuades amb el mAb EpEmb ens han ajudat a identificar els trets principals de la formació primerenca d'aquest teixit (Figura 6, Annex 2). Així, suggeríem l'origen dels putatius precursors epidèrmics en una població de blastòmers que ja estava especificada durant la segmentació del zigot. La dinàmica de tinció del mAb en embrions d'estadi 1-2 també apuntava a la diferenciació terminal de cèl·lules epidèrmiques després de la seva inserció a la superfície de la membrana sincicial en llocs tan distants com el primordi de la faringe embrionària o diversos punts del sincici. Finalment, aquells experiments revelaven que en embrions d'estadi 2, en paral·lel a la diferenciació de la faringe embrionària (Cardona i altres, 2006), l'epidermis cobria completament l'embrió. Per tant, demostraven que el desenvolupament d'aquest teixit precedia l'acumulació del vitel a la cavitat digestiva embrionària. En conjunt, les nostres dades corroboren i complementen les observacions preliminars d'altres autors en aquesta mateixa espècie (Cardona i altres, 2005b; Cardona i altres, 2006).

### **Quina molècula reconeix l'anticòs monoclonal EpEmb?**

El següent pas que ens plantejàvem era la caracterització de l'antigen reconegut amb l'anticòs per, d'aquesta manera, començar a destriar els mecanismes moleculars responsables d'establir la identitat de l'epidermis embrionària. L'estratègia d'hiperimmunització utilitzada per la producció dels mAbs -administració de barreges heterogènies de proteïnes d'embrions- impossibilitava el coneixement *a priori* d'aquella molècula. La solució a aquesta pregunta passava, doncs, per l'anàlisi químic molecular de la (o les) substàncies immunoreactives per l'anticòs.

En col·laboració amb el laboratori de proteòmica del CSIC/Universitat Autònoma de Barcelona del Dr. Joaquín Abián es va posar a punt un protocol d'immunoprecipitació de proteïna d'embrió de *S. polychroa* utilitzant columnes de proteïna A on s'hi havia enganxat prèviament el mAb EpEmb. D'acord amb experiments de transferència de proteïnes sabíem que aquest anticòs s'unia específicament a una molècula d'aproximadament 50kDa de pes molecular (dades no mostrades). Després d'immunoprecipitar i separar per electroforesi es varen observar dues bandes al voltant d'aquesta massa molecular (Figura 24A). Llavors vàrem analitzar per espectrometria de masses les dues bandes però només s'obtingueren lectures fiables per la banda de major pes molecular: en seqüenciar i comparar els aminoàcids seqüenciats amb una base de dades proteòmiques de l'espècie *S. mediterranea* es varen identificar com a pertanyents a una pèptid que contenia un domini de reconeixement de carbohidrats (o CLECT) que és característic de les lectines de tipus C (Figura 24A). En general, aquestes molècules actuen com a components del sistema immune, amb funcions variades que van des de la defensa contra els patògens al tràfic cel·lular, la regulació immune o la prevenció de l'autoimmunitat (Cambi i Figdor, 2003). El pèptid del mAb Epemb de *S.*

*polychroa* és, de fet, homòleg d'una lectina d'una nova família d'aquell grup que s'havia estudiat prèviament a l'espècie *Dugesia tigrina* (Shagin i altres, 2002). Shagin i col·laboradors (2002) mostraven en el seu treball que l'expressió de les lectines de *D. tigrina* segueix un patró consistent amb la distribució de cèl·lules glandulars del cos i la paret de l'animal i, per tant, són relacionades amb activitats de secreció de mucus protector d'agents externs. La lectina aïllada a *S. polychroa* es detecta per primer cop en els estadis més tardans del desenvolupament i ofereix un patró d'expressió similar al de la *lectin2b* de *D. tigrina*: es localitza en clústers de cèl·lules concentrats al marge i la part ventral de l'embrió a partir de l'estadi 5-6 (Figura 24B-D). Aquest patró és significativament diferent del mostrat amb la tinció del mAb i suggereix que aquell pèptid no és el present en les cèl·lules de l'epidermis embrionària.



**Figura 24. Experiments d'identificació de la proteïna candidat reconeguda pel mAb EpEmb.** **A** Imatge de l'esquerra: tinció de plata del gel de proteïnes de l'experiment d'immunoprecipitació amb el mAb EpEmb i els extractes proteïcs d'embrions. S'hi mostra el carril del marcador (m), el control negatiu on es va usar només la solució de proteïnes -les diferents bandes són, per tant, soroll de fons de l'experiment- (ctrl (-)), o la mostra amb extractes proteïcs immunoprecipitats amb l'anticòs (p. e.). Les fletxes assenyalen les dues bandes que contenen les proteïnes candidates. Imatge de la dreta: esquematització del pèptid lectin2b seqüenciat amb espectrometria de masses a partir de la banda de major pes molecular. S'hi indica la posició del domini CLECT (en vermell). **B-D** Hibridació *in situ* colorimètrica en embrions *in toto* pel gen codificant de *lectin2b* de *S. polychroa*. L'expressió es detecta per primer cop en embrions d'estadi 5 tardà, en un patró puntejat al voltant del marge dorsoventral (caps de fletxa blancs) i la superfície ventral de l'embrió. En etapes posteriors s'incrementa el nombre de cèl·lules positives però es manté el mateix patró. Als embrions d'estadi 4-5 (e4-5; 5 dies de desenvolupament) i 5 tardà (e5 tardà; 7 dies del desenvolupament) l'anterior es troba cap a la part superior de la imatge, mentre que als d'estadi 6-7 (e6-7; 9 dies del desenvolupament) és a l'esquerra. fd, faringe definitiva; fe, faringe embrionària; pfd, primordi de la faringe definitiva.

En resum, tot fa pensar que la proteïna present a la banda de menor massa molecular (Figura 24A) és la que efectivament es troba en les cèl·lules del teixit. Tot i els impediments tècnics per obtenir una seqüència de qualitat s'haurà de continuar dedicant esforços per incrementar la quantitat de mostra i optimitzar la lectura a l'espectròmetre de masses.

## **Òrgans epitelials: epidermis definitiva**

L'altra estructura d'origen ectodèrmic no nerviós de l'embrió de *S. polychroa* és l'epidermis definitiva. Aquesta es correspon amb el teixit ciliat típic amb el que naixerà el juvenil quan es produeixi la seva eclosió de la càpsula embrionària. La seva formació mostra una relació íntima amb la presència de l'epidermis transitòria ja que no és fins que comencen a desaparèixer les cèl·lules d'aquesta que les precursors d'aquella s'integren finalment per la superfície de l'embrió (Cardona i altres, 2005b). Les cèl·lules de l'epidermis definitiva, tant les epidèrmiques multiciliades com les glandulars parenquimàtiques, provenen de la diferenciació de cèl·lules embrionàries distribuïdes amb una certa uniformitat per la banda germinal. Així, una subpoblació de cèl·lules embrionàries en posició subepitelial forma, a partir de l'estadi 5, cilis intracel·lulars i vesícules que contenen els rabdits. Posteriorment aquesta població cel·lular s'insereix des de posicions basals entre les cèl·lules de l'epidermis embrionària per conformar el teixit adult. Un cop a la superfície, la progènie epidèrmica adquireix la morfologia definitiva, i, a l'estadi 7, cobreix del tot l'embrió i s'organitza en una capa monoestratificada columnar que està travessada pels canals de les cèl·lules glandulars (Cardona i altres, 2005b).

De nou, el mAb EpEmb i, en aquest cas, també l'anticòs anti- $\beta$ -catenina-2, un marcador de l'epidermis definitiva desenvolupat a *S. mediterranea* (Chai i altres, 2010), han contribuït a confirmar alguns aspectes d'aquest model de successió epidèrmica. Tal com es mostrem en els nostres resultats (Figura 7, Annex 2), la desaparició progressiva a diferents punts de l'embrió de l'epidermis embrionària i la presència de cèl·lules positives per l'anticòs anti- $\beta$ -catenina-2 tant a la banda germinal com a l'exterior de l'embrió reforça la idea del patró de reemplaçament del teixit transitori i l'origen de les cèl·lules de l'epiteli definitiu proposat per Cardona i col·laboradors (2005b). Les nostres dades, a més, suggereixen que el procés de recanvi molt probablement ja s'havia iniciat en embrions d'estadi 3, algun temps abans del que apuntaven aquells autors. Finalment, amb l'ús del mAb EpEmb també es pot destacar una dinàmica de substitució d'epitelis en sentit d'anterior cap a posterior i de ventral cap a dorsal en els estadis més tardans -estadis 6 i 7 del desenvolupament- que podria ser explicada per pressions selectives de tipus ecològic sobre l'embrió.

Tanmateix, aquests resultats i els de Cardona i col·laboradors (2005b, 2006) deixen obertes algunes qüestions com ara si les cèl·lules epidèrmiques i glandulars provenen de la mateixa cèl·lula precursora o si les cèl·lules que s'observen intercalades entre l'epidermis embrionària en embrions d'estadi 3 i 4 són realment cèl·lules immadures de l'epiteli definitiu. Actualment aquests problemes es podrien abordar mitjançant estudis d'hibridació *in situ* de gens d'epidermis que han descrit en un treball recent Van Wolfswinkel i col·laboradors (2014) i amb la localització de lectines fluorescents d'unió a poblacions de cèl·lules glandulars

(Zayas i altres, 2010), i també amb el mAb EpEmb per descartar la localització al teixit transitori d'aquells marcadors.

## **El sistema nerviós de l'estadi de larva intracapsular**

Les observacions prèvies a *S. polychroa* havien suggerit el desenvolupament d'un sistema nerviós elaborat -que conté cèl·lules nervioses amb projeccions axonals- a l'estadi de larva intracapsular (Cardona i altres, 2006). Aquest estaria constituït per les cèl·lules estrella, que són cèl·lules de funció sensorial que desenvolupen dues morfologies durant l'embriogènesi primerenca: estructura en quatre axons (Figura 19), o forma multipolar (Cardona i altres, 2006). La primera forma és característica dels embrions d'estadi 2 i la segona dels d'estadi 3 i 4.

A Monjo i Romero (2015) on és descriu el desenvolupament del sistema nerviós d'aquella espècie amb hibridacions *in situ* per gens d'expressió neural (p. e. gens pan-neurals o de subpoblacions nervioses), i amb immunohistoquímiques d'anticossos específics pel neurotransmissor serotonina i el neuropèptid FMRFamida no s'observa la presència de cèl·lules amb característiques similars a les cèl·lules estrella. De fet, l'únic marcador nerviós que s'expressa durant aquells estadis és el gen pan-neural *Spol-sec5*, però es detecta a la faringe embrionària i no a la banda germinal que és on s'haurien de localitzar les cèl·lules estrella. Per tant, les nostres dades no donen suport a la presència de cèl·lules nervioses semblants a les cèl·lules estrella a l'estadi de larva intracapsular.

Pel que fa al gen *Spol-sec5*, aquest es tracta d'un ortòleg de *secretogranin-V*, també anomenat proteïna neuroendocrina 7B2, que, en d'altres organismes, es localitza majoritàriament en teixits que són d'origen neuronal (p. e. el cervell) o endocrí (p. e. glàndules com la pituïtària o la tiroides), o en els quals es coneix la presència de cèl·lules neuroendocrines (p. e. els tractes gastrointestinals). *sec5* regula indirectament en aquells teixits la maduració de diversos neuropèptids a través del control sobre el transport i l'activació de l'enzim proteolític PC2 (Mbikay i altres, 2001); a la vegada, els neuropèptids sota el control de *sec5* s'encarreguen, entre d'altres funcions, de modificar les respostes de les cèl·lules musculars de l'animal (p. e. Clark i altres, 2008; Quintanar i altres, 2011). En embrions de planària, la hibridació *in situ* en seccions histològiques de *Spol-sec5* va demostrar la seva localització en una població de cèl·lules properes a l'aparell muscular de la faringe embrionària. En base a aquest patró i a la funció que té la molècula en altres models animals proposem que la seva expressió es correspon amb l'existència d'un plexe nerviós simple, l'únic sistema nerviós de l'embrió primerenc de *S. polychroa*, que controla els moviments de la faringe embrionària mitjançant una senyal neuroendocrina. A partir de l'estadi 5, amb la degeneració de la faringe (Cardona i altres, 2005b), el plexe desapareix sense deixar rastre i, per tant, no s'incorpora en el sistema nerviós de l'adult.

## Organogènesi del sistema nerviós definitiu

Monjo i Romero (2015) també mostra amb detall el procés de construcció del sistema nerviós definitiu de *S. polychroa*. Les dades d'aquest article es complementen amb l'estudi sobre la morfogènesi dels ulls, un dels principals òrgans sensorials de les planàries, que es mostra a Martín-Durán i altres (2012a). En conjunt, les observacions d'aquests dos treballs ens permeten formular el següent model de desenvolupament del sistema nerviós:

– Inici de la neurogènesi embrionària a l'estadi 4 en una població de cèl·lules embrionàries disperses per tot l'embrió positives pel marcador pan-neural primerenc *Spol-elav-4*. Donat el patró que mostren els gens de la família *elav* en altres organismes -expressió en neurones postmitòtiques o que estan a punt sortir del cicle cel·lular- (Ratti i altres, 2006; Berger i altres, 2007; Pascale i altres, 2008; Cunningham i Casey, 2014), i també l'absència d'expressió en aquell estadi de gens neurals més tardans com *syt*, *th* o *tph*, o de marcadors de poblacions neuronals com els anticossos anti-5-HT i anti-FMRFamida, hipotetitzem que la població positiva per *Spol-elav-4* configura una reserva de precursors nerviosos que en les properes hores finalitzaran la seva diferenciació a llinatges neuronals.

– Condensació d'algunes d'aquelles cèl·lules en un primordi nerviós que es visualitza com a dues bandes bilaterals que discorren al llarg de l'embrió d'estadi 5. Aquestes bandes ocupen una posició que hem determinat com a ventral (Figura S1, Monjo i Romero, 2015; secció "Polaritat dorsoventral a l'estadi 5", pàgines 158-160), i es troben desconnectades pel seu extrem posterior o pròxim a la faringe embrionària. Les bandes corresponen segurament als cordons nerviosos pioners detectats per Cardona i col·laboradors (2005b), i, malgrat la seva aparent homogeneïtat morfològica, ja estan regionalitzades en l'eix anteroposterior - gens específics de cervell com *otxA* i *otp*, i de la regió anterior com *ndk* demarquen la seva part anterior- i en l'eix dorsoventral -la població cel·lular FMRFamidèrgica es limita a la part més dorsal. L'expressió dels gens de cervell indica, a més, que la identitat dels principals òrgans del SNC està ben establerta dins d'aquell teixit.

En aquest estadi, però, persisteixen cèl·lules positives per *Spol-elav-4* que no formen part del primordi: estan aïllades a la meitat dorsal de l'embrió i també es concentren en un domini al voltant de la faringe embrionària que, probablement, s'associa amb la posterior formació del plexe nerviós de la faringe de l'adult. Per una altra banda, comencen a desenvolupar-se les cèl·lules de l'ull a partir d'un clúster de cèl·lules anterior. Aquest clúster es separarà en el camp d'ull dret i esquerre durant l'embriogènesi tardana.

– Desenvolupament progressiu del sistema nerviós fins assolir la morfologia definitiva del juvenil. A continuació, des del primordi nerviós es segreguen els cordons laterals del SNP, que ja són visibles en embrions tardans d'estadi 5, i es comença a organitzar el SNC, de manera que el cervell es fa visible com un engruïment dels cordons nerviosos ventrals. El cervell es condensa encara més en els estadis 6 i 7, moment en el qual, poc a poc, també s'estableixen les connexions i commissures entre els diferents elements del SNC i SNP, i es constitueixen els plexes dels òrgans com el de la faringe o el subepidèrmic. En tot moment s'observa un increment del nombre de cèl·lules del sistema nerviós.



Durant aquest període el sistema visual passa per la fase d'especificació dels precursors d'ulls -estadi 5-, i de diferenciació de les cèl·lules fotoreceptores i pigmentàries -estadi 6-, d'establiment de la copa pigmentària i de les connexions visuals -estadi 7-, i, finalment, de maduració dels òrgans visuals -final de l'estadi 7 i estadi 8. Però el quiasma òptic i els axons cerebrals dels ulls d'embrions que encara no han eclosionat són més curts i gruixuts que els de l'adult. Per tant, el ulls requereixen d'una certa maduració postembrionària per arribar a la seva morfologia típica.

En resum, el nostre model demostra el desenvolupament *de novo* del sistema nerviós a partir de l'estadi 4, i la diferenciació d'òrgans del SNP a partir de l'estadi 5, després de la formació al primordi nerviós d'un compartiment anterior o cerebral, i un altre de més posterior o associat amb els cordons nerviosos ventrals. Malgrat una certa immaduresa morfològica, en el juvenil el sistema nerviós ja és funcional i regula reaccions comportamentals com la fototaxi negativa -l'animal s'allunya d'una font de llum directa- o la quimiotaxi -l'animal capta i dirigeix el seu moviment cap una font d'aliment.

### **Comparació del model de neurogènesi embrionària de *S. polychroa* amb els mecanismes reguladors de la neurogènesi dels Bilateria**

Com s'ha vist a la introducció, l'anàlisi embriològic i molecular de la neurogènesi primerenca suggereix la presència d'una "caixa d'eines" ben establerta que estaria conservada entre diferents fílums d'animals bilaterals amb un SNC i que inclouria: la segregació durant o poc després de la gastrulació de la població de l'ectoderma epitelial i neurogènic; la posterior organització de l'ectoderma neurogènic en un teixit anomenat neuroectoderma; i la producció, internalització i especificació de progenitors neurals derivats d'aquell neuroectoderma (resumit a la secció "Un programa comú de neurogènesi als bilaterals?", pàgines 38-40). Altres elements d'aquesta "caixa d'eines" serien els gens de famílies amb un rol preeminent durant el desenvolupament del sistema nerviós que es descriuen a la secció "Mecanismes moleculars de control de la neurogènesi" (pàgines 40-44). Ara bé, procedeix d'una manera similar la neurogènesi embrionària de les planàries? Per respondre a aquesta pregunta primer discutiré si existeix o no un verdader ectoderma neurogènic a *S. polychroa* i quina forma hi adopta.

En altres organismes, l'ectoderma neurogènic es pot identificar amb una signatura morfològica i molecular pròpies. Per exemple, als vertebrats les cèl·lules del neuroectoderma són columnars (Lowery i Sive, 2004; Gilbert, 2010), i expressen gens com els factors de transcripció de la família *soxB1* i alguns *bHLH* proneurals (Bertrand i altres, 2002; Quan i Hassan, 2005; Guth i Wegner, 2008), o diversos gens homeobox (Boyl i altres, 2001; Pearson i Doe, 2004; Guillemot, 2007). De manera semblant, a *Drosophila* el neuroectoderma també te forma d'epiteli columnar i conté 100 cèl·lules de llargària i 8-9 cèl·lules de gruix en la part del tronc que es detecten amb una combinatòria de gens ortòlegs als de vertebrats (Buescher i altres, 2002; Zhao i Skeath, 2002; Hartenstein i Wodarz, 2013). En aquest organisme, però, el neuroectoderma del tronc es troba a ventral, mentre que a vertebrats està a dorsal. La separació d'aquest teixit de l'ectoderma epitelial i la seva formació a un cantó de l'embrió

depèn de l'acció d'un sistema molecular basat en elements de la via BMP: en general, el gen antineurogènic *bmp2/4* s'acumula a nivells elevats en el futur ectoderma epidèrmic mentre que *chordin*, el seu antagonista, s'expressa en cèl·lules de l'ectoderma neural o en teixits adjacents des d'on difon cap al futur neuroectoderma (Mizutani i Bier, 2008). Per tant, a vertebrats *bmp2/4* es restringeix a la part ventral de l'embrió i a *Drosophila* a la dorsal.

Moltes d'aquestes característiques també s'observen en membres dels Spiralia, (p. e. expressió de gens *soxB* i alguns *bHLH* al neuroectoderma; Le Gouar i altres, 2004; Kerner i altres, 2009; Demilly i altres, 2013). Gràcies a la presència de llinatges fixes i a experiments d'injecció de blastòmers sabem que el neuroectoderma d'aquests organismes prové de les cèl·lules derivades del primer, segon i tercer quartet de micròmers. En concret, les cèl·lules del primer quartet generen la porció més anterior de l'ectoderma que donarà lloc al cervell i els ulls, i el neuroectoderma del tronc es formarà sobre tot des del segon quartet (Lambert, 2010; Henry, 2014). El primer quartet de micròmers també és l'origen de l'òrgan apical, una estructura sensorial característica de l'estadi larvari que està present a la larva trocòfora d'anèlids com *P. dumerilii* (Ackermann i altres, 2005), i la larva velígera de mol·luscs com *Crepidula fornicata* (Nielsen, 2004; Hejnol i altres, 2007). Pel que fa al neuroectoderma del tronc, com el de la resta de protòstoms, es situa a la part ventral del cos (p. e. Denes i altres, 2007). Però a diferència de *Drosophila*, el sistema molecular de *bmp2/4* i *chordin* no sembla tenir un efecte clau sobre l'especificació d'aquell teixit *versus* l'ectoderma epitelial: a *Platynereis*, *bmp2/4* s'expressa dorsalment però només intervé en la formació del patró mediolateral del neuroectoderma (Denes i altres, 2007); i a *Helobdella robusta*, una altra espècie d'anèlid, el principal lligand i antagonista són ortòlegs de *bmp5/8* i *gremlin*, i no de *bmp2/4* i *chordin* -de fet, *chordin* ni està present al seu genoma-, i ambdós gens es detecten a la part dorsal de les bandes germinals d'ectoderma de l'embrió (Kuo i Weisblat, 2011). En aquest animal *bmp5/8* especifica destinacions dorsals i activa l'expressió de *gremlin* en la següent banda, que, a la vegada, prevé l'acció del lligand *bmp2/4* en les bandes més ventrals que donen lloc al sistema nerviós (Kuo i Weisblat, 2011).

A *S. polychroa* hem descrit dos esdeveniments de formació de teixits ectodèrmics separats en el temps: un primer associat a l'establiment de la larva transitòria i un altre de més tardà en que es desenvolupen els òrgans adults. Així, amb el primer s'acaben per formar l'epidermis embrionària i el plexe nerviós de la faringe embrionària, mentre que el segon es correspon amb la diferenciació del SNC, SNP i epidermis definitiva. Però d'on provenen les cèl·lules progenitores que constitueixen aquests teixits?

Pel que fa als teixits transitoris, les nostres dades indiquen que es troben en poblacions discretes de blastòmers del sincici de seguit de la segmentació del zigot; en concret, en cèl·lules disperses i en una subpoblació de les que constitueixen el primordi de la faringe embrionària en el cas de l'epidermis, i en altres cèl·lules del primordi en el cas del plexe faringi. En quant als òrgans definitius, els seus progenitors tenen l'origen en cèl·lules embrionàries de la banda germinal que, coincidint amb la degeneració de l'estadi de larva, comencen a diferenciar en les cèl·lules epidèrmiques i neuronals a partir de l'estadi 5. D'entre aquestes cèl·lules, com a mínim els presumptius progenitors neuronals mostren l'expressió de gens conservats durant la neurogènesi primerenca: a Monjo i Romero (2015) demostrem

que *Spol-soxB1-1*, pertanyent a la subfamília B1 dels gens *soxB*, s'expressa en alguns blastòmers indiferenciats a l'estadi 2-3, i en cèl·lules mitòtiques que colocalitzen amb el marcador primerenc neuronal *Spol-elav-4* a l'estadi 4. Aquest gen i també *Spol-soxB1-2*, un altre paràleg del grup B1, es detecten a partir de l'estadi 5 en un nombre creixent de cèl·lules en divisió que es podria correspondre amb una població de cèl·lules mare neuronals que s'han mantingut durant l'embriogènesi tardana. Malgrat això, en cap cas s'observa una zona de creixement preferencial o una concentració particularment evident de cèl·lules positives per aquells gens abans de la formació del primordi del sistema nerviós.

Paral·lelament, diverses evidències suggereixen que la separació dels tipus cel·lulars epidèrmics i neuronals probablement es regula per mecanismes moleculars alternatius a la via BMP ja que: no hi ha cap membre d'aquella via que es detecti en embrions d'estadi 1-4 - gens ortòlegs de *Smed-bmp4-1* i *Smed-admp-1*, que en planàries adultes regulen el patró dorsoventral (Orii i Watanabe, 2007; Reddien i altres, 2007; Gaviño i Reddien, 2011; Molina i altres, 2011) no s'expressen fins a l'estadi 5 o més tard (Figura 25; Martín-Durán i altres, 2010)-; i altres elements com *chordin* i *bmp5/8* o bé s'han perdut en aquest organisme o bé han derivat tant que no se n'ha pogut aïllar cap seqüència homòloga amb la qual establir un patró d'expressió (observacions pròpies; Reddien i altres, 2007; Molina i altres, 2011). No es pot descartar, però, l'activació d'aquesta via en els estadis primerencs ja que l'expressió d'altres transcrits com els del gen anti-neurogènic *nlg8* de *S. mediterranea* (Molina i altres, 2011) no s'han estudiat en embrions.

### *Spol-admp*



**Figura 25. Expressió durant l'embriogènesi de *Spol-admp*.** Totes les imatges mostren hibridacions *in situ* colorimètriques en embrions *in toto* per aquell gen. *Spol-admp* es detecta només en embrions d'estadi 7, en concret en cèl·lules del marge dorsoventral (caps de fletxa blancs) i en cèl·lules disperses ventrals (fletxes negres). Als embrions d'estadi 5 (e5; 5-6 dies de desenvolupament) i 5 tardà (e5 tardà; 7 dies del desenvolupament) l'anterior es troba cap a la part superior de la imatge, mentre que als d'estadi 6 (e6) i 7 (e7) és a l'esquerra. Els embrions d'estadi 5 tardà i 6 mostren visions ventrals. fd, faringe definitiva; fe, faringe embrionària; pfd, primordi de la faringe definitiva.

Així doncs, els resultats presentats en aquesta tesi suggereixen que en quant a la formació de l'ectoderma neurogènic, l'embrió de planària divergeix de manera significativa dels principals models animals: tot i que segrega fins a dos cops progenitors neuronals,

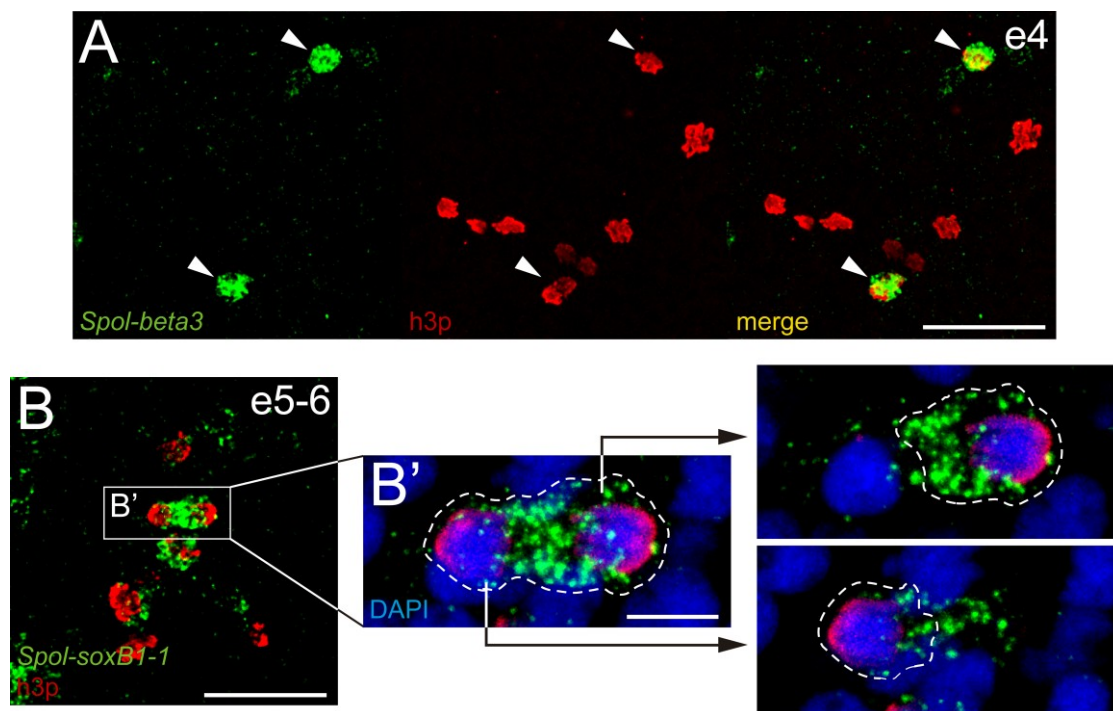
aquests mai s'organitzen en un neuroectoderma entès com un teixit amb una estructura morfològica similar al que s'observa a vertebrats o altres protòstoms. A més, l'absència de senyalització BMP durant aquells esdeveniments sembla indicar que són processos regulats per molècules desconegudes i/o alternatives a les d'altres organismes. Malgrat tot això, la presència durant l'etapa primerenca de mecanismes moleculars associats amb la determinació i manteniment de cèl·lules progenitores neuronals demostra una certa conservació del programa bàsic de la neurogènesi en aquesta espècie de tríclad.

Aquesta darrera idea també es veu reforçada amb l'anàlisi dels patrons d'expressió dels gens involucrats en l'especificació del sistema nerviós, com per exemple els gens de les famílies *atonal* i *achaete-scute*, els dos principals grups de gens *bHLH* proneurals (Bertrand i altres, 2002; Guillemot, 2007), els gens de la subfamília *soxB2*, associats amb la diferenciació dels progenitors a vertebrats (Sandberg i altres, 2005; Guth i Wegner, 2008), i de factors de transcripció d'ull com *Spol-so* i *Spol-eya* (Martín-Durán i altres, 2012a; Monjo i Romero, 2015). Tots aquests gens es detecten per primer cop en poblacions de cèl·lules embrionàries de la banda germinal que, en alguns casos, són positives pel marcador de progenitors *Spol-soxB1-1* i, més endavant, en grups reduïts de cèl·lules nervioses. Per tant, els seus patrons concorden amb l'expressió i la funció que tenen durant la neurogènesi primerenca als bilaterals. Però, sorprenentment, i a diferència del que s'observa en altres espirals, tots aquests gens activen l'expressió relativament tard durant el desenvolupament embrionari - entre l'estadi 4-5 i coincidint amb l'establiment de la polaritat definitiva de l'animal (Cardona i altres, 2005b; Martín-Durán i altres, 2010)-, i en cèl·lules que ja havien estat internalitzades. Aquesta darrer escenari recorda més al que succeeix durant la neurogènesi de *Hydra* i permet predir que, com en aquell organisme, els precursors assoliran la seva posició definitiva amb la migració pel parènquima de l'embrió.

Finalment, ens hem preguntat sobre la relació entre la divisió i el destí dels progenitors neuronals. Aquest és un aspecte important ja que les cèl·lules nervioses s'especifiquen dintre de teixits en creixement i proliferació on els progenitors es divideixen amb un patró asimètric semblant al d'una cèl·lula mare (p. e. els progenitors apicals del tub neural o els neuroblasts dels insectes), o, alternativament, amb un patró simètric (p. e. els progenitors basals o intermedis dels vertebrats). El primer mecanisme s'utilitza per mantenir la població de progenitors i, al mateix temps, aportar noves cèl·lules al sistema nerviós, mentre que el segon mecanisme s'usa per expandir puntualment només una de les dues poblacions (Morrison i Kimble, 2006). Als Spiralia, degut a la manca d'estudis amb cultius cel·lulars, es desconeix el tipus de patró dels progenitors del neuroectoderma però s'ha suggerit que seria asimètric com a conseqüència dels llinatges fixes del seu embrió (Hartenstein i Stollewerk, 2015). Curiosament, les divisions asimètriques s'observen no només durant la segmentació espiral del zigot sinó també durant la neurogènesi primerenca de, com a mínim, una espècie d'anèlid (Zhang i Weisblat, 2005).

A Monjo i Romero (2015) i amb experiments addicionals de colocalització entre gens neurogènics i l'anticòs anti-h3p (Figura 26A) hem identificat quatre poblacions de presumptius progenitors en expansió a *S. polychroa*: dues d'elles són les positives per als gens ortòlegs del grup *soxB1* que hem destacat anteriorment, i les altres dues expressen els gens *bHLH*

*Spol-ASCa* i *Spol-beta3*. Tot i això, no podem descartar la l'existència de més subpoblacions d'aquell tipus ja que gens com *Smed-ato1*, *-coe*, *-hes1-3*, *-six-1/2* o *-eya*, que es detecten en grups de neoblasts durant la regeneració del sistema nerviós i visual de *S. mediterranea* (Lapan i Reddien, 2011; Lapan i Reddien, 2012; Cowles i altres, 2013), també podrien estar expressant-se en cèl·lules embrionària del nostre model. D'entre aquelles quatre poblacions, la única que s'observa abans de l'inici de la diferenciació és la *Spol-soxB1-1* positiva que, a més, augmenta de nombre entre els estadis 2-4; per tant, fins aquell moment, s'ha d'estar comportant amb un patró de divisions simètriques. Però, que passa en els estadis posteriors? Si continuem agafant d'exemple aquella població, la tendència a partir de l'estadi 4-5 és la segregació de l'expressió en tres grups de cèl·lules: en cèl·lules nervioses, en cèl·lules en divisió, i en altres cèl·lules d'identitat desconeguda. Pel que fa a la població de cèl·lules en divisió, s'observa molt de tant en tant la presència de transcrits de *soxB1-1* en la fase final de la mitosi, quan els nuclis de les cèl·lules filles s'estan començant a condensar (Figura 26B). L'anàlisi d'imatge d'una d'aquestes mitosis demostra que sempre hi ha un nucli que conté més quantitat de mRNA's (Figura 26B'); això es pot explicar de dues maneres: perquè hi ha un repartiment asimètric dels mRNA's o, si ja s'ha iniciat de nou la maquinària de transcripció, perquè *Spol-soxB1-1* s'expressa més en una de les cèl·lules descendents. En qualsevol cas, ambdós fets podrien ser el reflex d'un esdeveniment de divisió asimètrica en la cèl·lula de la que provenen. Agafats en conjunt aquests resultats suggereixen que els progenitors neuronals de *S. polychroa* actuen amb diferents patrons de divisió, i, a més, recolzen la hipòtesi de que el mode de divisió asimètric podria ser ancestral al grup dels espirals. D'acord amb aquesta teoria, les planàries haurien reclutat de manera secundària el patró simètric per al funcionament dels seus progenitors.



**Figura 26. Caracterització de poblacions de presumptius progenitors en proliferació.** Totes les imatges mostren projeccions en z de sèries d'imatges d'hibridacions *in situ* fluorescents amb gens neurogènics (en verd) i

d'immunohistoquímiques amb anti-h3p (en vermell); nuclis contrastats amb el marcador fluorescent DAPI (en blau). **A** A l'estadi 4, algunes de les cèl·lules positives pel gen *bHLH Spol-beta3* es troben en divisió (caps de fletxa blancs). **B** Els transcrits de *Spol-soxB1-1* es detecten durant la fase final de la mitosi. **B'** L'anàlisi d'imatge d'una d'aquestes mitosis en un embrió d'estadi 5-6 demostra que els mRNA's del gen són més nombrosos en una de les cèl·lules filles: la imatge superior correspon a la projecció en z d'una secció de 5µm de gruix que abasta el nucli i part del citoplasma de la cèl·lula filla de la dreta; i en la imatge de sota es mostra la resta de la mateixa sèrie (la línia puntejada blanca dibuixa el límit teòric del citoplasma de cada cèl·lula); comparant les dues imatges s'observa que la quantitat de mRNA's de *soxB1-1* és més gran en la cèl·lula filla de la imatge superior. Escala de les barres, A i B, 25µm; B', 5 µm.

En definitiva, el nostre treball amplia el coneixement sobre els processos d'organogènesi i d'especificació cel·lular del sistema nerviós però també d'altres teixits d'origen ectodèrmic a les planàries. D'una banda, gràcies a l'anàlisi molecular de l'embrió de *S. polychroa* hem presentat un model de neurogènesi en que demostrem la conservació de diferents mòduls que controlen la formació del sistema nerviós als bilaterals, però també assenyalen algunes diferències que podrien ser explicades pel mode de desenvolupament divergent d'aquest organisme. D'una altra banda, els nostres resultats posen de relleu la importància de desxifrar els processos moleculars i cel·lulars subjacents a la neurogènesi en models animals no habituals per tal de dilucidar-ne els principis reguladors fonamentals. En el futur, estudis sobre la neurogènesi amb altres espècies de platihelmit i d'altres grups d'espivals han d'ajudar a concloure quins dels trets observats a *S. polychroa* són realment ancestrals a la neurogènesi d'aquells grups i quins s'han degut a l'evolució convergent del clade dels tríclads.

## **2. Relació entre el sistema nerviós, la miogènesi i l'establiment del patró en embrions de *S. polychroa***

L'estudi de la formació del sistema nerviós ens dona peu a poder discutir sobre altres aspectes més globals de l'embriogènesi de les planàries. Així, la presència de cèl·lules nervioses es pot posar en context amb la d'altres sistemes d'òrgans, com per exemple la musculatura, per entendre com es constitueix el sistema neuromuscular. O també ens pot ser d'utilitat per definir com es dona l'establiment de la polaritat de l'embrió. Com hem vist, el sistema nerviós als protòstoms es situa a ventral, i, per tant, en els embrions de planària també s'hauria de situar en aquella posició; però, és realment així des del principi? Quina relació hi ha entre el lloc que demarca el sistema nerviós i l'arquitectura dorsoventral dels embrions que encara tenen una forma esfèrica? Aquestes i altres qüestions havien estat tractades superficialment en alguna de les publicacions d'aquesta tesi i seran ampliades en aquesta segona secció de la discussió.

### **Sistema neuromuscular**

Típicament, les neurones motores del SNC s'associen amb la musculatura esquelètica per formar el sistema neuromuscular que, en altres organismes, es deriva de dos fulls

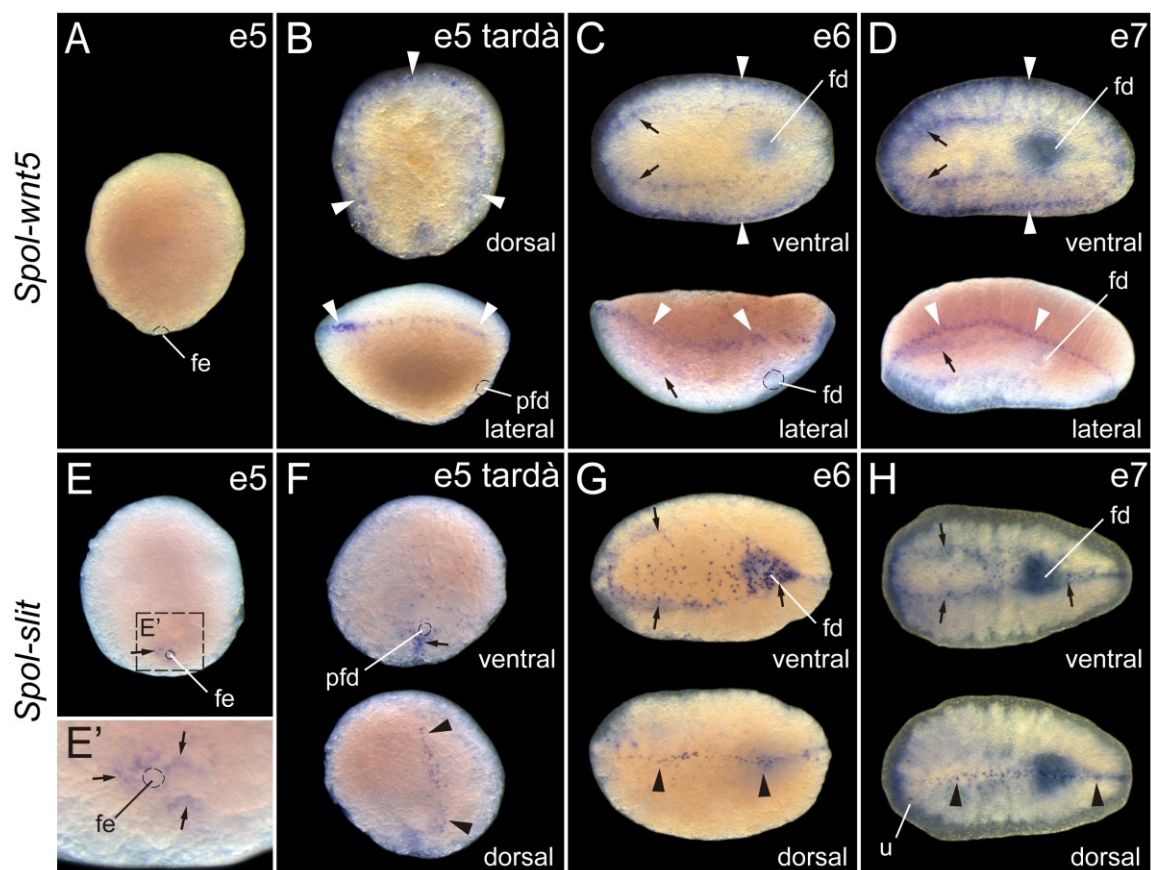
embrionaris independents: el mesoderma pels músculs i l'ectoderma per les neurones. Als platihelminths, però, no s'observa la formació de fulls embrionaris i els precursors d'aquells tipus cel·lulars es troben barrejats en les capes més profundes del parènquima embrionari. De fet, en aquella regió, a macrostòmids (Reiter i altres, 1996; Morris i altres, 2004), rhabdocels (Younossi-Hartenstein i altres, 2000), i políclads (Rawlinson, 2010) els miòcits i els progenitors neuronals del futur sistema neuromuscular estan tan propers entre ells que s'ha proposat que podrien interaccionar per regular la seva formació. Així, en base a quin d'aquells tipus cel·lulars diferencia primer, hi ha autors que defensen que és el sistema nerviós qui orquestra l'organització de la musculatura (p. e. Reiter i altres, 1996), o, alternativament, que és la musculatura qui guia a les cèl·lules nervioses (p. e. Rawlinson, 2010, Younossi-Hartenstein i altres, 2001), o, fins i tot, que es podrien estar donant interaccions recíproques entre els dos sistemes (Younossi-Hartenstein i altres, 2000). Per exemple, a l'espècie *Macrostomum hystrinicum* sembla ser que la migració i diferenciació del miòcits de les fibres longitudinals es veu restringida a la zona dels cordons nerviosos després de que aquests s'hagin estès al llarg de l'embrió (Reiter i altres, 1996); per contra, a *M. lignano*, aquesta relació no és tan evident i pot ser que el desenvolupament del sistema muscular (o miogènesi) segueixi amb aquell o amb un altre tipus de patró independent de la neurogènesi (Morris i altres 2004).

Pel que fa als triclads, les observacions preliminars a *S. polychroa* havien mostrat que la musculatura apareixia a l'estadi 5 i amb una distribució irregular per la banda germinal (Cardona i altres, 2005b). Les noves dades de miogènesi demostren, a més, la presència de miòcits immadurs positius per l'anticòs específic anti-TMUS13 (Cebrià i altres, 1997) abans d'aquella data, en concret en embrions d'estadi 4 i al voltant de la faringe embrionària (Figura 1, Annex 1). A l'estadi 5, aquests anticòs i també la fal·loïdina rodamina, una substància fluorescent que s'uneix als filaments rics en actina dels músculs (Cebrià i altres, 1997; Martín-Durán i altres, 2010), mostren que els miòcits diferenciats s'acumulen en quatre plexes: un de dorsal amb fibres longitudinals; un altre a la regió lateral de l'embrió on hi ha tant fibres longitudinals com circulars; un tercer plexe ventral format per miòcits d'orientació longitudinal; i, finalment, un feix de fibres a l'extrem posterior que, en part, correspon amb el primordi de la faringe definitiva (Figura 2, Annex 1; Monjo i Romero, 2015). La diferenciació d'aquests plexes, en particular dels de la regió lateral, dorsal i posterior, coincideix amb l'aplanament i elongació de l'embrió, el que suggereix que la força que exerceixen les cèl·lules d'aquells plexes seria una de les causes de la morfogènesi que es produeix entre l'estadi 5 i 6. Aquests resultats també demostren que la dinàmica de miogènesi de les planàries difereix força de la miogènesi primerenca d'altres clades de platihelminths, especialment dels macrostòmids, en els quals els precursors musculars s'organitzen en un patró estrictament ortogonal ja des del principi (Reiter i altres, 1996).

Què passa, però, amb la relació amb el sistema nerviós? Els esdeveniments de miogènesi dels estadis 4 i 5 de *S. polychroa* es donen al mateix temps que la primera expressió del marcador neural primerenc *Spol-elav-4* i que la diferenciació i organització del primordi nerviós -tal com veïem a Monjo i Romero (2015), aquest primordi es forma per sota del plexe muscular lateral. Per tant, sembla ser que en aquells embrions el sistema muscular i



nerviós desenvolupen amb el mateix patró temporal i amb una certa proximitat espacial l'un de l'altre. Agafant de referència les observacions d'altres platihelminths, aquestes dades indiquen que a planària també podria haver-hi alguna interacció entre el dos sistemes. Curiosament, a les planàries adultes les cèl·lules musculars de la capa subepidèrmica expressen constitutivament gens de control posicional que intervenen en la formació i manteniment del patró de l'animal (Witchley i altres, 2013). Entre aquells gens hi ha *Smed-slit* i *Smed-wnt5* que actuen com a senyals repulsives per al creixement de les cèl·lules nervioses durant la regeneració del SNC (Cebrià i altres, 2007; Adell i altres, 2009; Gurley i altres, 2010; Almuedo-Castillo i altres 2011), i que, en embrions, es detecten a partir de l'estadi 5, en dominis que són compatibles amb la presència de cèl·lules musculars (Figura 27A-H). Estudis de colocalització d'aquells gens i de marcadors musculars haurien de confirmar l'expressió en aquells tipus cel·lulars i, per tant, reforçar la hipòtesi d'una possible interacció entre les cèl·lules musculars i nervioses durant l'embriogènesi.



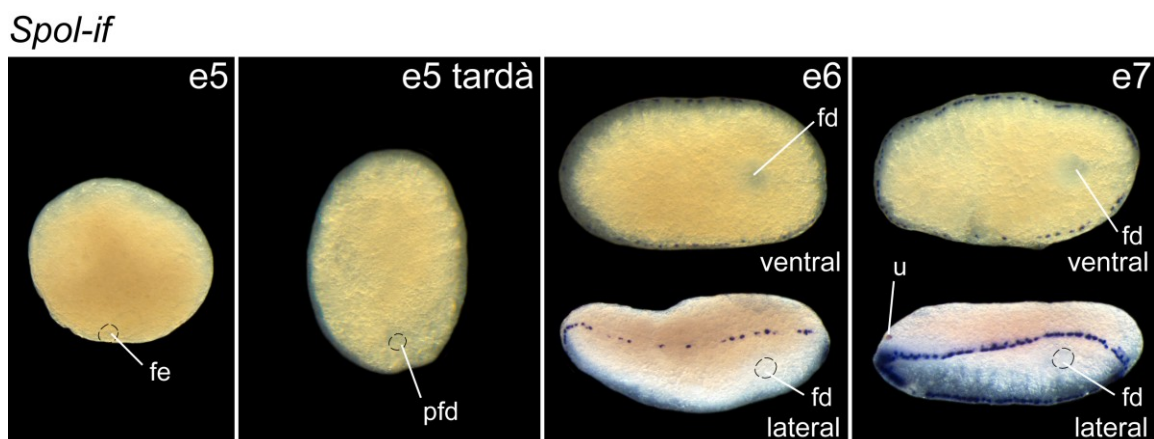
**Figura 27. Expressió durant l'embriogènesi de *Spol-wnt5* i *Spol-slit*.** Totes les imatges mostren hibridacions *in situ* colorimètriques en embrions *in toto* per als dos gens. **A-D** L'element de la via Wnt *Spol-wnt5* es localitza per primer cop en embrions d'estadi 5 tardà, en cèl·lules disposades al llarg del marge lateral (caps de fletxa blancs). Posteriorment també es detecta en cèl·lules distribuïdes amb un patró semblant al del SNC (fletxes negres). **E-H** *Spol-slit* s'expressa en cèl·lules del voltant de la faringe embrionària en embrions d'estadi 5 (fletxes negres). A l'estadi 5 manté aquell patró (fletxa negra), i, a més, es detecta en cèl·lules de la línia mitja dorsal (caps de fletxa negra). Durant l'embriogènesi més tardana apareix un segon domini ventral de cèl·lules positives situades al parènquima i entre les estructures del SNC (fletxes negres). Als embrions d'estadi 5 (e5; 5-6 dies de desenvolupament) i 5 tardà (e5 tardà; 7 dies del desenvolupament) menys al de la imatge B-lateral l'anterior es troba cap a la part superior de la

imatge, mentre que als d'estadi 6 (e6), 7 (e7) i al de la imatge B-lateral és a l'esquerra. fd, faringe definitiva; fe, faringe embrionària; pfd, primordi de la faringe definitiva; u, ull.

## Polaritat dorsoventral a l'estadi 5

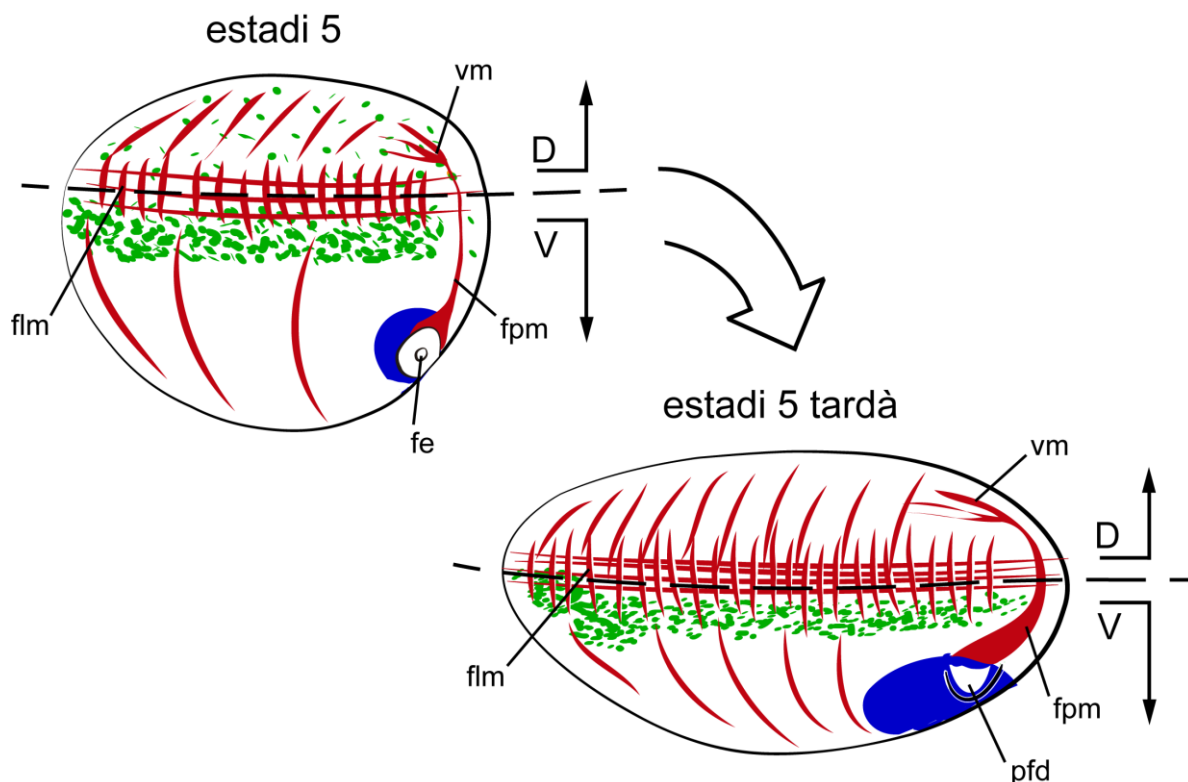
Per una altra banda, l'anàlisi combinat dels processos d'organogènesi nerviosa i la muscular ens han permès caracteritzar amb més detall l'adquisició de la polaritat definitiva dorsoventral, un altre tema controvertit del desenvolupament embrionari d'aquests organismes (Martín-Durán i altres, 2012b). Aquest procés s'inicia a l'estadi 5, quan l'embrió encara té forma ovalada (Martín-Durán i altres; 2010), i culmina als 7 dies del desenvolupament -el que en el nostre treball hem definit com a estadi 5 tardà- amb l'aplanament de l'embrió. Però com s'orienta l'embrió entre aquells estadis?

La polaritat de l'estadi 5 s'ha deduït tradicionalment amb la situació de la faringe embrionària, un caràcter fàcilment discernible des de l'exterior, i amb la del primordi de la faringe definitiva, que la majoria d'autors consideren de formació propera a l'òrgan transitori (Martín-Durán i altres, 2012b). Així, en general, hi ha un cert consens en reconèixer aquelles estructures com a posteriors, però la seva posició dorsoventral ha estat interpretada indistintament com a ventral o dorsal (Martín-Durán i altres, 2012b), o com a ventral per la faringe embrionària i dorsal pel primordi de la definitiva (Martín-Durán i altres, 2010). Aquesta disparitat de criteris o bé reflecteix una variabilitat real en la posició d'aquells òrgans entre grups de planàries -s'ha de tenir en compte que moltes de les descripcions han estat efectuades amb embrions de gèneres o poblacions diferents - o, en la meua opinió, també emmiralla una qüestió de fons que és la manca d'altres punts morfològics de referència amb els que poder-se guiar en aquell estadi. En aquest sentit, la caracterització de l'expressió de *Spol-if*, un gen que ens podria permetre fixar el límit teòric de l'eix dorsoventral (Tazaki i altres, 2002), tampoc sembla ser de gaire ajuda ja que no es comença a detectar fins que s'ha produït l'aplanament de l'embrió (Figura 28).



**Figura 28. Expressió durant l'embriogènesi de *Spol-if*.** Totes les imatges mostren hibridacions *in situ* colorimètriques en embrions *in toto* per aquell gen. *Spol-if* té la primera expressió al marge dorsoventral d'embrions d'estadi 6. Als embrions d'estadi 5 (e5; 5-6 dies de desenvolupament) i 5 tardà (e5 tardà; 7 dies del desenvolupament) l'anterior es troba cap a la part superior de la imatge, mentre que als d'estadi 6 (e6) i 7 (e7) és a l'esquerra. L'embrió d'estadi 5 tardà mostra una visió ventral. fd, faringe definitiva; fe, faringe embrionària; pfd, primordi de la faringe definitiva; u, ull.

De fet, no ha estat fins que hem analitzat els patrons d'immunotinció dels marcadors musculars que hem descobert una altra asimetria morfològica associada amb elements de la musculatura; com exposem a continuació, aquesta estructura té una relació directa amb posicions ventrals i dorsals dintre de l'embrió.



**Figura 29. Visió lateral de l'estructura de l'embrió d'estadi 5 i 5 tardà.** En les esquematitzacions s'hi mostra la musculatura (en vermell), el sistema nerviós (en verd), i l'expressió del gen *Spol-foxA* (en blau), que es detecta a la faringe definitiva i a cèl·lules ventrals del voltant (Koinuma i altres, 2000; Martín-Durán i altres, 2010). D, dorsal; fe, faringe embrionària; flm, feix lateral muscular; fpm, feix posterior muscular; pfd, primordi de la faringe embrionària; V, ventral; vm, "ventall" muscular.

A Monjo i Romero (2015), però sobre tot a l'annex 1 (Figures 1 i 2), mostrem el desenvolupament entre els estadis 5 i 5 tardà d'un feix muscular posterior que creix des de la faringe embrionària i que creua en el seu camí la musculatura lateral de l'embrió. Aquest feix consta de dos extrems amb morfologies ben diferenciades i, a l'estadi 5 tardà, demarca pols oposats dorsoventrals: hi ha un extrem que finalitza al voltant de la faringe embrionària i que acumula nombrosos miòcits que es situa a ventral; i hi ha l'altre extrem que es desplega a dorsal en forma de ventall i des d'on creixen més fibres musculars. A la vegada, també mostrem en aquell annex que, d'acord amb el que s'havia anticipat, la faringe definitiva es forma durant el mateix període de temps en una posició immediatament adjacent a l'òrgan transitori en degeneració (Figura 3, Annex 1); aquesta localització és consistent amb l'expressió en aquell domini de gens que detecten el futur plexe nerviós i cèl·lules de la gastrodermis de la faringe adulta (Martín-Durán i Romero, 2011; Monjo i Romero, 2015). Així, si suposem posicions equivalents entre l'estadi 5 i l'estadi 5 tardà per les diferents estructures

nervioses i musculars detectades tenim que l'organització d'aquell estadi queda de la manera següent (Figura 29): a la part més ventral, la faringe embrionària i les primeres cèl·lules del primordi de la faringe definitiva; una mica més a dorsal, però encara en posicions ventrals, el primordi del sistema nerviós; per sobre d'aquest, el plexe muscular lateral, que seria un punt de referència per fixar el futur límit dorsoventral de l'organisme; i, finalment, el "ventall" de musculatura a la part més dorsal. Aquest nou model anatòmic que proposem millora la comprensió que teníem de l'estadi 5 i, alhora, proporciona un marc de treball per estudis posteriors del desenvolupament embrionari de les planàries.

### 3. Relació entre el desenvolupament embrionari i la regeneració

Les espècies sexuades de planària com *S. polychroa* també són bons models per determinar quines són les semblances i diferències entre els processos de regeneració i desenvolupament embrionari i, en definitiva, per plantejar-se quin és l'origen dels mecanismes de la regeneració.

Inicialment el punt de partida dels dos processos és diferent. La regeneració d'una estructura implica la identificació de la part del cos que falta i la seva posterior integració en un patró preexistent (Handberg-Thorsager i altres, 2008). L'embriogènesi de la mateixa estructura, en canvi, es dona amb l'organització d'un conjunt difús de cèl·lules indiferenciades que adopten el patró definitiu gradualment (Cardona i altres, 2005b). A més, en el cas de la regeneració, allò s'aconsegueix amb els descendents d'una població de neoblasts (Shibata i altres, 2010; Baguñà 2012; Rink, 2013), i l'embriogènesi s'esdevé des de grups de blastòmers que són morfològicament diferents dels neoblasts (Cardona i altres, 2005b; Cardona i altres, 2006). D'aquesta manera, la regeneració no suposa una recapitulació idèntica de l'embriogènesi i, *a priori*, ha d'estar molt més regulada que l'embriogènesi ja que requereix de mecanismes addicionals per destriar què ha de ser regenerat. Tot i això, alguns estudis han demostrat l'existència de paral·lelismes notables entre la segona meitat del desenvolupament -estadis 5 a 8- i la regeneració d'alguns sistemes d'òrgans com el sistema digestiu (Fernández-Rodríguez, 2005; Martín-Durán i Romero, 2011) o l'excretor (Cardona i altres, 2005b). El nostre treball recolza aquesta idea amb dades noves referents al sistema nerviós, els ulls, i l'epidermis definitiva:

–En les diferents publicacions d'aquesta tesi hem demostrat que a nivell cel·lular els patrons de morfogènesi del sistema nerviós i dels ulls s'assemblen amb els de l'adult només a partir de l'embriogènesi més tardana (Martín-Durán i altres, 2012a; Monjo i Romero, 2015). En el cas del desenvolupament de l'ull també hem observat que aquesta semblança s'adapta perfectament al model en tres estadis proposat per Inoue i col·laboradors (2004) per a l'espècie *Dugesia japonica*. A més, hem confirmat que les cèl·lules de l'epidermis definitiva recanvien les de l'epidermis embrionària des de l'estadi 5 i amb el mateix tipus de mecanisme -la intercalació des del parènquima embrionari i entre les cèl·lules preexistents- que te lloc

durant la renovació cel·lular i la regeneració (Annex 2; Morita i Best, 1974; Cardona i altres, 2005b).

—A nivell molecular, hem destacat que la majoria de patrons d'expressió definitius de gens que es detecten a neurones i a poblacions de progenitors/precursors neuronals s'estableix progressivament a partir d'aquella etapa (Figura 26; Monjo i Romero, 2015). Caldrà, però, confirmar aquesta fita en per alguns gens dels quals només se'n té dades d'expressió en juvenils, com per exemple *Spol-soxB1-2* i *Spol-elav-4*. També hem observat que la seqüència temporal d'activació dels gens involucrats en el desenvolupament dels ulls - *so* i *eya* primer a l'estadi 5-6, *opsin* i *tph* després a l'estadi 6- és equivalent a la descrita prèviament en planàries adultes (Pineda i altres, 2000; Mannini i altres, 2004; Martín-Durán i altres, 2012a;).

## **El sistema nerviós i la capacitat de regeneració de l'embrió**

Als embrions de planària la regeneració és possible des de l'estadi 6 (Le Moigne, 1966; Le Moigne, 1968). Le Moigne va arribar a aquesta conclusió després d'irradiar càpsules embrionàries senceres i juvenils de l'espècie *Polycelis nigra*. En els seus treballs, aquest autor informava que els embrions irradiats abans d'aquell estadi no podien sortir de la closca, i que els d'estadi 6 o posteriors es desenvolupaven amb èxit però morien als pocs dies de l'eclosió i no podrien regenerar després de ser-los-hi aplicat el mateix tractament. Per tant, deduïa que és durant aquesta etapa, o fins i tot una mica abans, que un subconjunt de cèl·lules embrionàries havien d'especificar-se en neoblasts, conservant així la capacitat de proliferar i, alhora, adquirir les característiques de les cèl·lules mare adultes.

Uns pocs estudis de principis del segle XX varen postular que la regeneració d'aquells embrions es veuria regulada parcialment per les cèl·lules del sistema nerviós en formació (Martín-Durán i altres, 2012b). El primer en afrontar aquest tema fou Bardeen (1902), que, a *Planaria maculata*, practicà seccions per davant de la faringe definitiva per comprovar si els fragments resultants regeneraven correctament. Ell observà que, en aquella espècie, les meitats anteriors tornen a desenvolupar la faringe i la cua, i que les meitats posteriors no són capaces de regenerar excepte en els embrions d'edat molt avançada. Bardeen explica aquest potencial de regeneració amb la presència de cordons nerviosos ben formats, que encara no s'haurien organitzat suficientment en les meitats posteriors dels embrions més primerencs. Segons la seva proposta, el poder de regeneració augmentaria amb el desenvolupament d'aquells cordons. Anys més tard, Liotti i Bruschelli (1964) arribaren a conclusions semblants amb l'estudi de la regeneració de *Dugesia lugubris*.

Le Moigne (1966) també va profunditzar en aquesta qüestió, però la seva interpretació final fou diferent de la dels autors anteriors. Le Moigne constata que, efectivament, les meitats regenerants anteriors de *P. nigra* regeneren millor que les posteriors i que durant la regeneració s'edifica un blastema per acumulació de neoblasts. Però la formació d'aquest blastema es veu diferida si alguns òrgans, incloent-hi el sistema nerviós, no han assolit un cert grau de diferenciació. Per tot això, sosté que el sistema nerviós constitueix un suport anatòmic per aquell gradient de poder de regeneració ja que el cervell es forma abans a

anterior i no és fins més tard que creixen els cordons nerviosos des de zones de l'embrió separades. Però la funció que ell atorga al sistema nerviós és el de guiar la migració dels neoblasts cap a la zona de la ferida; així, prediu que els neoblasts d'estadis 5 i 6 es troben relativament inactius, i que s'estimulen i canvien d'estat amb l'acció de les cèl·lules nervioses.

Contràriament a Le Moigne, nosaltres hem observat que el cervell es diferencia alhora que els cordons nerviosos al primordi nerviós de *S. polychroa*. En aquest sentit, és possible que fragments anteriors i posteriors d'embrions d'estadi 5 siguin capaços de regenerar ja que disposen d'un sistema nerviós que, tot i ser rudimentari, disposa de connexions entre neurones (Monjo i Romero, 2015). Però contenen els embrions d'aquell estadi la població dels neoblasts o aquests es diferencien més tard? Per contestar a aquesta pregunta hem de partir de la base que a *S. polychroa* encara no s'han replicat els experiments amb que Le Moigne demostrà la regeneració dels embrions. Així, la prova més rigorosa que tenim del moment d'aparició d'aquelles cèl·lules és la localització dels mRNA's de gens d'expressió als cossos cromatòids, que canvia durant l'etapa intermèdia del desenvolupament (Solana i altres, 2009; Solana i Romero, 2009). Aquest canvi sembla anar lligat amb el canvi de posició d'aquelles estructures en blastòmers i neoblasts -passa de perinuclear a citoplasmàtica-, i suggereix un fenomen de diferenciació dels neoblasts anàleg al de l'estadi 6 de *P. nigra*. En conseqüència, creiem que durant aquella etapa es donen els mínims teòrics necessaris per a la regeneració a *S. polychroa*.

Tot això ens porta a preveure que els embrions d'aquesta espècie de planària seran un bon sistema on poder testar l'efecte real del sistema nerviós sobre la diferenciació o el comportament dels neoblasts. L'inhibició de l'expressió de gens com *Spol-elav-4* o *-soxB1-1*, els primers gens en ser detectats massivament durant la neurogènesi primerenca, hauria d'abolir teòricament el desenvolupament de la majoria de cèl·lules d'aquell teixit. Si això fos així, es podria seccionar els embrions tractats per comprovar si mantenen les propietats de regeneració, i aplicar tècniques com les immunotincions i les hibridacions *in situ* per detectar si les poblacions de neoblasts s'ha format sense problemes. Però tot això només serà possible si s'aconsegueix adaptar la metodologia del RNAi -o un altre mode d'inhibició de l'expressió gènica- per als embrions de *S. polychroa* per als quals, a dia d'avui, ja se'n disposa d'un mètode eficaç amb el que accedir als primers estadis (Martín-Durán i altres, 2008). L'èxit d'aquesta empresa segurament requerirà d'una gran inversió d'esforços materials i personals però ha de ser clau per obrir nous camins per a l'embriologia de les planàries.





# CONCLUSIONS



Les **conclusions** d'aquesta tesi doctoral són:

1. Els marcadors moleculars utilitzats indiquen que l'embrió primerenc de *Schmidtea polychroa* disposa d'un sol sistema nerviós simple connectat amb el plexe muscular de la faringe embrionària.
2. Aquest sistema nerviós rudimentari degenera junt amb la faringe embrionària un cop s'ha finalitzat la ingesta de les cèl·lules vitel·lines externes.
3. La caracterització del patró espacial i temporal de l'anticòs monoclonal EpEmb demostra la localització a l'epidermis embrionària, un teixit d'origen ectodèrmic no nerviós, i en blastòmers del sincici del seu llinatge.
4. En estadis embrionaris tardans -estadis 6 i 7- la dinàmica de recanvi de l'epidermis embrionària segueix una direcció d'anterior-ventral cap a posterior-dorsal de l'embrió.
5. Els patrons d'expressió gènica i els anticossos específics per cèl·lules nervioses suggereixen que l'organogènesi del sistema nerviós definitiu s'inicia *de novo* a l'estadi 4 i a partir d'una població de cèl·lules embrionàries disperses que expressen el gen neuronal *Spol-elav-4*.
6. A l'estadi 5, les cèl·lules del sistema nerviós s'organitzen en un primordi situat ventralment i regionalitzat en els eixos dorsoventral i anteroposterior que, més tard, segregaran els principals òrgans del sistema nerviós central i perifèric.
7. *Spol-soxB1-1* es detecta en blastòmers del sincici i en progenitors del sistema nerviós durant la neurogènesi primerenca de *S. polychroa*.
8. Com en d'altres bilaterals, l'expressió d'ortòlegs de gens *bHLH* proneurals i del grup *soxB*, particularment dels paràlegs *Spol-soxB2-1* i *Spol-soxB2-2*, s'associa amb l'especificació i la diferenciació de poblacions de cèl·lules nervioses durant la neurogènesi.
9. Durant l'embriogènesi, els fotoreceptors i les cèl·lules pigmentàries de l'ull provenen de la progressiva diferenciació d'una mateixa cèl·lula progenitora d'ull.
10. Els ulls es desenvolupen a partir l'estadi 5 i amb procés molt similar al descrit per la regeneració de l'adult.
11. La manca d'expressió en cèl·lules relacionades amb l'ull de *pax6* i *dach* indica que la xarxa gènica que regula la formació del sistema visual en altres metazous (*pax6-so-eya-dach*) no està conservada durant el desenvolupament embrionari de l'ull de les planàries.
13. L'expressió al sistema nerviós dels factors de transcripció *rx* i *atonal* suggereix que la formació de l'ull en l'embrió està basada en mecanismes moleculars alternatius als establerts per altres models bilaterals.



# **BIBLIOGRAFIA**

- Abril, J. F., Cebrià, F., Rodríguez-Esteban, G., Horn, T., Fraguas, S., Calvo, B., Bartscherer, K., Saló, E., 2010. Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea*. BMC Genomics 11, 731.
- Ackermann, C., Dorresteijn, A., Fischer, A., 2005. Clonal domains in postlarval *Platynereis dumerilii* (Annelida:Polychaeta). J. Morphol. 266, 258-280.
- Adamidi, C., Wang, Y., Gruen, D., Mastrobuoni, G., You, X., Tolle, D., Dodt, M., Mockowiak, S. D., Gogol-Doering, A., Oenal, P., Rybak, A., Ross, E., Sánchez Alvarado, A., Kempa, S., Dietrich, C., Rajewsky, N., Chen, W., 2011. De novo assembly and validation of planarian transcriptome by massive parallel sequencing and shotgun proteomics. Genome Res. 21, 1993-200.
- 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.
- Agata, K., Umesono, Y., 2008. Brain regeneration from pluripotent stem cells in planarian. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 363, 2071-2078.
- 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.
- Almuedo-Castillo, M., Sureda-Gómez, M., Adell, T., 2012. Wnt signalling in planarians: new answers to old questions. Int. J. Dev. Biol. 56, 53-65.
- Altun, Z. F., Hall, D. H., 2011. Nervous system, general description. WormAtlas doi:10.3908/wormatlas.1.18.
- Amiel, A. R., Henry, J. Q., Seaver, E. C., 2013. An organizing activity is required for head patterning and cell fate specification in the polychaete annelid *Capitella teleta*: new insights into cell-cell signalling in Lophotrochozoa. Dev. Biol. 379, 107-122.
- Arendt, D., Denes, A. S., Jékely, G., Tessmar-Raible, K., 2008. The evolution of nervous system centralization. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 363, 1523-1528.
- Arendt, D., Nübler-Jung, K., 1994. Inversion of dorsoventral axis? Nature 371, 26.
- Arendt, D., Tessmar, K., de Campos-Baptista, M. I., Dorresteijn, A., Wittbrodt, J., 2002. Development of pigment-cup eyes in the polychaete *Platynereis dumerilii* and evolutionary conservation of larval eyes in Bilateria. Development 129, 1143-1154.
- Arendt, D., Wittbrodt, J., 2001. Reconstructing the eyes of Urbilateria. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 356, 1545-1563.
- Asami, M., Nakatsuka, T., Hayashi, T., Kou, K., Kagawa, H., Agata, K., 2002. Cultivation and characterization of planarian neuronal cells isolated by fluorescence activated cell sorting (FACS). Zoolog. Sci. 19, 1257-1265.
- Ashraf, S. I., Ip, Y. T., 2001. The Snail protein family regulates neuroblast expression of *inscuteable* and *string*, genes involved in asymmetry and cell division in *Drosophila*. Development 128, 4757-4767.
- Auladell, C., García-Valero, J., Baguñà, J., 1993. Ultrastructural localization of RNA in the chromatoid bodies of undifferentiated cells (neoblasts) in planarians by the RNase-gold complex technique. J. Morphol. 216, 319-329.
- Baguñà, J., 2012. The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. Int. J. Dev. Biol. 56, 19-37.
- Baguñà, J., Ballester, R., 1978. The nervous system on planarians: peripheral and gastrodermal plexuses, pharynx innervation, and the relationship between central nervous system structure and the acoelomate organization. J. Morph. 155, 237-252.
- Baguñà, J., García-Fernández, J., 2003. Evo-Devo: the long and winding road. Int. K. Dev. Biol. 47, 705-713.

- Baguñà J., Romero, R., 1981. Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia* 84, 181-194.
- 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, 77-86.
- Bardeen, C. R., 1902. Embryonic and regenerative development in planarians. *Biol. Bull.* 3, 262-288.
- Beane, W. S., Morokuma, J., Adams, D. S., 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.
- Beatus, P., Lendahl, U., 1998. Notch and neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* 54, 125-136.
- Benazzi Lentati, G., 1970. Gametogenesis and egg fertilization in planarians. *Int. Rev. Cytol.* 27, 101-179.
- Berger, C., Renner, S., Lüer, K., Technau, G. M., 2007. The commonly used marker ELAV is transiently expressed in neuroblasts and glial cells in the *Drosophila* embryonic CNS. *Dev. Dyn.* 236, 3562-3568.
- Bertrand, N., Castro, D. S., Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cells types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517-530.
- Blythe, M. J., Kao, D., Malla, S., Rowsell, J., Wilson, R., Evans, D., Jowett, J., Hall, A., Lemay, V., Lam, S., Aboobaker, A. A., 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.
- Bocchinfuso, D. G., Taylor, P., Ross, E., Ignatchenko, V., Kisingler, T., Pearson, B. J., Moran, M. F., 2012. Proteomic profiling of the planarian *Schmidtea mediterranea* and its mucous reveals similarities with human secretions and those predicted for parasitic flatworms. *Mol. Cell Proteomics* 11, 681-691.
- Bode, H. R., 1996. The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J. Cell Sci.* 109, 1155-1164.
- Böser, A., Drexler, H. C., Reuter, H., Schmitz, H., Wu, G., Schöler, H. R., Gentile, L., Bartscherer, K., 2013. SILAC proteomics of planarians identifies Ncoa5 as a conserved component of pluripotent stem cells. *Cell Rep.* 5, 1142-1155.
- Brody, T., 1999. The Interactive Fly: gene networks, development and the internet. *Trends Genet.* 15, 333-334.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q., Technau, G. M., 1996. The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* 179, 41-64.
- Boyl, P. P., Signore, M., Annino, A., Barbera, J. P., Acampora, D., Simeone, A., 2001. *Otx* genes in the development and evolution of the vertebrate brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 353-363.
- Brusca, R. C., Brusca, G. J., 2003. Invertebrates. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Budd, G., 2009. Animal evolution: genomes, fossils and trees, part I: Origins of animals, capítulo 1: The earliest fossil record of the animals and its significance 3-14. Oxford University Press, Oxford.
- Bueno, D., Baguñà, J., Romero, R., 1996. A central body region defined by a position-specific molecule in the planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*: spatial and temporal variations during regeneration. *Dev. Biol.* 178, 446-458.
- Bueno, D., Baguñà, J., Romero, R., 1997. Cell-, tissue-, and position-specific monoclonal antibodies against the planarian *Gugesia (Girardia) tigrina*. *Histochem. Cell. Bio.* 107, 139-149.



- Bueno, D., Fernández-Rodríguez, J., Cardona, A., Hernández-Hernández, V., Romero, R., 2002. A novel invertebrate trophic factor related to invertebrate neurotrophins is involved in planarian body regional survival and asexual reproduction. *Dev. Biol.* 252, 188-201.
- Bueno, D., Vispo, M., Sancho, V., Romero, R., 2001. Maintenance of A/P body regions in planarians by TCEN49, a putative cystine-knot neurotrophin. *Belg. J. Zool.* 131, 89-95.
- Buescher, M., Hing, F. S., Chia, W., 2002. Formation of neuroblasts in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster* is controlled by *SoxNeuro*. *Development* 129, 4193-4203.
- Cambi, A., Figdor, C. G., 2003. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 539-546.
- Cardona, A., Fernández-Rodríguez J., Solana, J., Romero, R., 2005a. An in situ hybridization protocol for planarian embryos: monitoring myosin heavy chain gene expression. *Dev. Genes Evol.* 215, 482-488.
- Cardona, A., Hartenstein, V., Romero, R., 2005b. The embryonic development of the triclad *Schmidtea polychora*. *Dev. Genes Evol.* 215, 109-131.
- Cardona, A., Hartenstein, V., Romero, R., 2006. Early embryogenesis of planarian: a cryptic larva feeding on maternal resources. *Dev. Genes Evol.* 216, 667-681.
- Carpenter, K. S., Morita, M., Best, J. B., 1974. Ultrastructure of the photoreceptor of the planarian *Dugesia dorotocephala*. I. Normal eye. *Cell Tissue Res.* 148, 143-158.
- Cau, E., Blader, P., 2009. Notch activity in the nervous system: to switch or not to switch? *Neural Dev.* 4:36.
- Cayouette, M., Raff, M., 2002. Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from *Drosophila* to mammals. *Nat. Neurosci.* 5, 1265-1269.
- 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, 375-381.
- Cebrià, F., Guo, T., Jopek, J., 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., Agata, K., 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., Ikeo, K., Gojobori, T., 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., Agata, K., 2002c. Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Dev. Growth Differ.* 44, 135-146.
- 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., Vispo, M., Newmark, P. A., Bueno, D., Romero, R., 1997. Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian *Girardia tigrina*. *Dev. Genes Evol.* 207, 306-316.
- Chai, G., Ma, C., Bao, K., heng, 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 signalling 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. *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.
- Choksi, S. P., Southall, T. D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B. E., van Steensel, B., Micklem, G., Brand, A. H., 2006. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Dev. Cell* 11, 775-789.
- Chong, T., Stary, J. M., Wang, Y., Newmark, P. A., 2011. Molecular markers to characterize the hermaphroditic reproductive system of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *BMC Dev. Biol.* 11:69.
- Clark, J., Milakovic, M., Cull, A., Klose, M. K., Mercier, A. J., 2008. Evidence for postsynaptic modulation of muscle contraction by a *Drosophila* neuropeptide. *Peptides* 29, 1140-1149.
- Collins, 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.
- Colombrita, C., Silani, V., Ratti, A., 2013. ELAV proteins along evolution: back to the nucleus? *Mol. Cell. Neurosci.* 56, 447-455.
- Colwin, A. L., Colwin, L. H., 1953. The normal embryology of *Saccoglossus kowalevskii*. *J. Morphol.* 92, 401-453.
- Coward, S. J., 1974. Chromatoid bodies in somatic cells of the planarian: observations on their behavior during mitosis. *Anat. Rec.* 180, 533-545.
- Cowles, M. W., Brown, D. D., Nisperos, S. V., Stanley, B. N., Pearson, B. J., Zayas, R. M., 2013. Genome-wide analysis of the bHLH gene family in planarians identifies factors required for adult neurogenesis and neuronal regeneration. *Development* 140, 4691-4702.
- Cowles, M. W., Omuro, K. C., Stanley, B. N., Quintanilla, C. G., Zayas, R. M., 2014. COE loss-of-function analysis reveals a genetic program underlying maintenance and regeneration of the nervous system in planarians. *PLoS Genet.* 10:e1004746.
- Cunningham, D., Casey, E. S., 2014. Spatiotemporal development of the embryonic nervous system of *Saccoglossus kowalevskii*. *Dev. Biol.* 386, 252-263.
- Currie, K. W., 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.
- Dalyell, J. G., 1814. Observations on some interesting phenomena in animal physiology, exhibited by several species of planariae. London, United Kingdom.
- Darras, S., Gerhart, J., Terasaki, M., Kirschner, M., Lowe, C. J., 2011.  $\beta$ -catenin specifies the endomesoderm and defines the posterior organizer of the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii*. *Development* 138, 959-970.
- David, C. N., 2012. Interstitial stem cells in *Hydra*: multipotency and decision-making. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 489-497.
- Davidson, E. H., Erwin, D. H., 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* 311, 796-800.
- Degnan, B. M., Vervoort, M., Larroux, C., Richards, G. S., 2009. Early evolution of metazoan transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 591-599.
- Demilly, A., Steinmetz, P., Gazave, E., Marchand, L., Vervoort, M., 2013. Involvement of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in neuroectoderm architecture in *Platynereis dumerilii*. *Nat. Commun.* 4:1915.
- Denes, A. S., Jékely, G., Steinmetz, P. R., Raible, F., Snyman, H., Prud'homme, B., Ferrier, D. E., Balavoine, G., Arendt, D., 2007. Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization bilateria. *Cell* 129, 277-288.
- De Robertis, E. M., 2008. Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell* 132, 185-195.

- De Robertis, E. M., Sasai, Y., 1996. A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* 380, 37-40.
- Dill, K. K., Thamm, K., Seaver, E. C., 2007. Characterization of *twist* and *snail* gene expression during mesoderm and nervous system development in the polychaete annelid *Capitella* sp. I. *Dev. Genes Evol.* 217, 435-447.
- Drukker, M., Muscat, C., Weissman, I. L., 2007. Generation of monoclonal antibody library against human embryonic stem cells. *Methods Mol. Biol.* 407, 63-81.
- D'Souza, T. G., Michiels, N. K., 2009. Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis, capítulo 18 Sex in Parthenogenetic Planarians: Phylogenetic Relic or Evolutionary Resurrection? 377-397. Springer Netherlands.
- Edgecombe, G. D., Giribert, G., Dunn, C. W., Hejnal, A., Kristensen, R. M., Neves, R. C., Rouse, G. W., Worsaae, K., Sorensen, M. V., 2011. Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Org. Divers. Evol.* 11, 151-172.
- Egger, C., Chell, J. M., Brand, A. H., 2008. Insights into neural stem cell biology from flies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 39-56.
- Egger, B., Gschwentner, R., Rieger, R., 2007. Free-living flatworms under the knife: past and present. *Dev. Genes Evol.* 217, 89-104.
- Eisenhoffer, G. T., 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.
- Emmons, S. W., 2015. The beginning of connectomics: a commentary on White et al. (1986) "The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*". *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370:20140309.
- 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.
- Fernández-Rodríguez, 2005. Análisis del mAb TNEX-59 y del gen *Gtboblet*: paralelismos entre la regeneración y el desarrollo embrionario en planarias de agua dulce. Tesis Doctoral, Barcelona.
- Fernández-Taboada, E., Rodríguez-Esteban, G., Saló, E., Abril, J. F., 2011. A proteomics approach to decipher the molecular nature of planarian stem cells. *BMC Genomics* 12, 133.
- Finnerty, J. R., Pang, K., Burton, P., Paulson, D., Martindale, M. Q., 2004. Origins of bilateral symmetry: *Hox* and *Dpp* expression in a sea anemone. *Science* 304, 1335-1337.
- Fischer, A., Gessler, M., 2007. Delta-Notch—and then? Protein interactions and propose modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res.* 35, 4583-4596.
- Florio, M., Huttner, W. B., 2014. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development* 141, 2182-2194.
- Forsthoefel, D. J., Newmark, P. A., 2009. Emerging patterns in planarian regeneration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 412-420.
- Forsthoefel, D. J., Park, A. E., Newmark, P. A., 2011. Stem cell-based growth, regeneration, and remodeling of the planarian intestine. *Dev. Biol.* 356, 445-459.
- Fraguas, S., Barberán, Cebrià, C., 2011. EGFR signalling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Dev. Biol.* 354, 87-101.
- Fraguas, S., Barberán, S., Ibarra, B., Stöger, L., Cebrià, C., 2012. Regeneration of neuronal cell types in *Schmidtea mediterranea*: an immunohistochemical and expression study. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 143-153.
- Freeman, M., 1996. Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 87, 651-660.
- Friedländer, M. R., Adamidi, C., Hen, T., Lebedeva, S., Isenbarger, T. A., Hirst, M., Marra, M., Nusbaum, C., Lee, W. L., Jenkin, J. C., Sánchez Alvarado, A., Kim, J. K., Rajewsky, N., 2009.

- High-resolution profiling and discovery of planarian small RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 11546-11551.
- Fröblius, A. C., Matus, D. Q., Seaver, E. C., 2008. Genomic organization and expression demonstrate spatial and temporal *Hox* gene colinearity in the lophotrochozoan *Capitella* sp. I. *PLoS One* 3:e4004.
- Fusaoka, E., Inoue, T., Mineta, K., Agata, K., 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., Quiquand, M., 2011. A two-step process in the emergence of neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 34, 847-862.
- Galliot, B., Quiquand, M., Ghila, L., de Rosa, R., Milijakovic-Licina, M., Chera, S., 2009. Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Dev. Biol.* 332, 2-24.
- Gaviño, M. A., Reddien, P. W., 2011. A Bmp/Admp regulatory circuit controls maintenance and regeneration of dorsal-ventral polarity in planarians. *Curr. Biol.* 21, 294-299.
- Gilbert, S. F., 2010. *Developmental Biology*, Ninth Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Giribert, G., Distel, D. L., Polz, M., Sterrer, W., Wheeler, W. C., 2000. Triploblastic relationships with emphasis on the acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cycliophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: a combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* 49, 539-562.
- González-Sastre, A., Molina, M. D., Saló, E., 2012. Inhibitory Smads and bone morphogenic protein (BMP) modulate anterior photoreceptor cell number during planarian eye regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 155-163.
- Goodman, C. S., Doe, C. Q., 1993. The Development of *Drosophila melanogaster*, capítulo Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system 1131-1206. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Götz, M., Huttner, W. B., 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6, 777-788.
- Grabel, L., 2012. Developmental origin of neural stem cells: the glial cell that could. *Stem Cell Rev.* 8, 577-585.
- Gröger, H., Schmid, V., 2001. Larval development in Cnidaria: a connection to Bilateria? *Genesis* 29, 110-114.
- Guillemot, F., 2007. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* 134, 3771-3780.
- Gulino, A., Di Marcotullio, L., Screpanti, I., 2010. The multiple functions of Numb. *Exp. Cell Res.* 316, 900-906.
- Gurley, K. A., Rink, J. C., Sánchez Alvarado, A., 2008. Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science* 319, 323-327.
- Gurley, K. A., Elliot, S. A., Simakov, O., Schmidt, H. A., Holstein, T. W., Sánchez Alvarado, A., 2010. Expression of secreted Wnt pathway components reveals unexpected complexity of the planarian amputation response. *Dev. Biol.* 347, 24-39.
- Guth, S. I., Wegner, M., 2008. Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3000-3018.
- Hadwiger, G., Dour, S., Arur, S., Fox, P., Nonet, M. L., 2010. A monoclonal antibody toolkit for *C. elegans*. *PLoS One* 5:e10161.
- Handberg-Thorsager, M., Fernández, E., Saló, E., 2008. Stem cells and regeneration in planarians. *Front. Biosci.* 13, 6374-6394.
- Harlow, E., Lane, D., 1999. *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor.

- Harrington, M. J., Hong, E., Brewster, R., 2009. Comparative analysis of neurulation: first impressions do not count. *Mol. Reprod. Dev.* 76, 954-965.
- Harris, W. A., 2001. Temporal coordinates: the genes that fix cell fate with birth order. *Dev. Cell* 1, 313-314.
- Hartenstein, V., Ehlers, U., 2000. The embryonic development of the rhabdocoel flatworm *Mesostoma lingua* (Abildgaard, 1789). *Dev. Genes Evol.* 210, 399-415.
- Hartenstein, V., Stollewerk, A., 2015. The evolution of early neurogenesis. *Dev. Cell* 32, 390-407.
- Hartenstein, V., Wodarz, A., 2013. Initial neurogenesis in *Drosophila*. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2, 701-721.
- Hartmann, B., Lee, P. N., Kang, Y. Y., Tomarev, S., de Couet, H. G., Callaerts, P., 2003. *Pax6* in the sepioid squid *Euprymna scolopes*: evidence for a role in eye, sensory organ and brain development. *Mech. Dev.* 120, 177-183.
- Hartline, D. K. 2011. The evolutionary origins of glia. *Glia* 59, 1215-1236.
- 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.
- Hejnal, A., Martindale, M. Q., Henry, J. Q., 2007. High-resolution fate map of the snail *Crepidula fornicata*: the origins of ciliary bands, nervous system, and muscular elements. *Dev. Biol.* 305, 63-76.
- Hejnal, A., Obst, M., Stamatakis, A., Ott, M., Rouse, G. W., Edgecombe, G. D., Martínez, P., Baguñà, J., Bailly, X., Jondelius, U., Wiens, M., Müller, W. E., Seaver, E., Wheeler, W. C., Martindale, M. Q., Giribert, G., Dunn, C. W., 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc. Biol. Sci.* 276, 4261-4270.
- Henry, J. Q., 2014. Spiralian model systems. *Int. J. Dev. Biol.* 58, 389-401.
- Hickman Jr., C. P., Roberts, L. S., Keen, S. L., Larson, A., l'Anson, H., Eisenhour, D. J., 2006. *Integrated Principles of Zoology, Fourteenth Edition*. McGraw-Hill Higher Education, New York.
- Hirth, F., Reichert, H., 2007. *Evolution of Nervous Systems, volum 1 Theories, Development, Invertebrates*, capítulo 1.04 Basic Nervous System Types: One or Many? 55-72. Academic Press, Amsterdam.
- Hobert, O., 2010. Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 1-24.
- Hofbauer, A., Ebel, T., Walternspiel, B., Oswald, P., Chen, Y. C., Halder, P., Biskup, S., Lewandrowski, U., Winkler, C., Sickmann, A., Buchner, S., Buchner, E., 2009. The Wuerzburg hybridoma library against *Drosophila* brain. *J. Neurogenet.* 23, 78-91.
- Holland, L. Z., Carvalho, J. E., Escrava, H., Laudet, V., Schubert, M., Shimeld, S. M., Yu, Jr-K., 2013. Evolution of bilaterian central nervous system: a single origin? *EvoDevo* 4:27.
- Hori, I., 1982. An ultrastructural study of the chromatoid body in planarian regenerating cells. *J. Electron. Microsc.* 31, 63-72.
- Hori, I., 1991. Role of fixed parenchyma cells in blastema formation of the planarian *Dugesia japonica*. *Int. J. Dev. Biol.* 35, 101-108.
- Hori, I., Kishida Y., 2003. Quantitative changes in nuclear pores and chromatoid bodies induced by neuropeptides during cell differentiation in the planarian *Dugesia japonica*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 35, 439-444.
- Hyman, L. H., 1951. *The invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchocoela*. McGraw-Hill, New York.
- Iglesias, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Saló, E., Adell, T., 2008. Silencing of *Smed-βcatenin1* generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* 135, 1215-1221.
- Inoue, T., Hayashi, T., Takechi, K., 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.

- Inoue, T., Kumamoto, H., Okamoto, K., Umesono, Y., Sakai, M., Sánchez Alvarado, A., Agata, K., 2004. Morphological and functional recovery of the planarian photosensing system during head regeneration. *Zool. Sci.* 21, 275-283.
- Izergina, N., Balmer, J., Bello, B., Reichert, H., 2009. Postembryonic development of transit amplifying neuroblast lineages in the *Drosophila* brain. *Neural Dev.* 4:44.
- Jacob, M. H., 1984. Neurogenesis in *Aplysia californica* resembles nervous system formation in vertebrates. *J. Neurosci.* 4, 1225-1239.
- Jarriault, S., Schwab, Y., Greenwald, I., 2008. A *Caenorhabditis elegans* model for epithelial-neuronal transdifferentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 3790-3795.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Kobayashi, T., 2008. Roles of *Hes* genes in neural development. *Dev. Growth Differ.* 50, S97-S103.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S. J., Odenwald, W. F., 1998. Regulation of POU genes by *castor* and *hunchback* established layered compartments in the *Drosophila* CNS. *Genes Dev.* 12, 246-260.
- Kao, D., Felix, D., Aboobaker, A., 2013. The planarian regeneration transcriptome reveals a shared but temporally shifted regulatory program between opposing head and tail scenarios. *BMC Genomics* 14:797.
- Kato, K., Orii, H., Watanabe, K., Agata, K., 2001. Dorsal and ventral position cues required for the onset of planarian regeneration may reside in differentiated cells. *Dev. Biol.* 233, 109-121.
- Kaul, S., Stach, T., 2010. Ontogeny of the collar cord: neurulation in the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii*. *J. Morphol.* 271, 1240-1259.
- Kerner, P., Simionato, E., Le Gouar, M., Vervoort, M., 2009. Orthologs of key vertebrate neural genes are expressed during neurogenesis in the annelid *Pletynereis dumerilii*. *Evol. Dev.* 11, 513-524.
- Killeen, M. T., Sybingco, S. S., 2008. Netrin, Slit and Wnt receptors allow axons to choose the axis of migration. *Dev. Biol.* 323, 143-151.
- Kobayashi, C., Kobayashi, S., Orii, H., Watanabe, K., Agata, K., 1998. Identification of two distinct muscles in the planarian *Dugesia japonica* by their expression of myosin heavy chain genes. *Zool. Sci.* 15, 861-869.
- Kobayashi, C., Saito, Y., Ogawa, K., Agata, K., 2007. Wnt signalling is required for antero-posterior patterning of the planarian brain. *Dev. Biol.* 306, 714-724.
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kohwi, M., Doe, C. Q., 2013. Temporal fate specification and neural progenitor competence during development. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 823-838.
- Koinuma, S., Umesono, Y., Watanabe, K., Agata, K., 2000. Planaria *FoxA* (*HNF3*) homologue is specifically expressed in the pharynx-forming cells. *Gene* 259, 171-176.
- Kormish, J. D., Sinner, D., Zorn, A. M., 2010. Interactions between SOX factors and Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in development and disease. *Dev. Dyn.* 239, 56-68.
- Kuo, D. H., Weisblat, D. A., 2011. A new molecular logic for BMP-mediated dorsoventral patterning in the leech *Helobdella*. *Curr. Biol.* 21, 1282-1288.
- Lambert, J. D., 2010. Developmental patterns in spiralian embryos. *Curr. Biol.* 20, R72-R77.
- Lapan, S. W., Reddien, P. W., 2011. *dlx* and *sp6-9* control optic cup regeneration in a prototypic eye. *PLoS Genet.* 7:e1002226.
- Lapan, S. W., Reddien, P. W., 2012. Transcriptome analysis of the planarian eye identifies *ovo* as a specific regulator of eye regeneration. *Cell Rep.* 2, 294-307.
- Larroux, C., Luke, G. N., Koopman, P., Rokhsar, D. S., Shimeld, S. M., Degnan, B. M., 2008. Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol. Biol. Evol.* 25, 980-996.

- Laumer, C. E., Bekkouche, N., Kerbl, A., Goetz, F., Neves, R. C., Sorensen, M. V., Kristensen, R. M., Hejnal, A., Dunn, C. W., Giribert, G., Worsaae, K., 2015a. Spiralian phylogeny informs the evolution of microscopic lineages. *Curr. Biol.* 25, 2000-2006.
- Laumer, C. E., Hejnal, A., Giribert, G., 2015b. Nuclear genomic signals of the “microturbellarian” roots of platyhelminth evolutionary innovation. *Elife* 4:eLife.05503.
- Layden, M. J., Boekhout, M., Martindale, M. Q., 2012. *Nematostella vectensis* *achaete-scute* homolog *NvashA* regulates embryonic ectodermal neurogenesis and represents an ancient component components of the metazoan neural specification pathway. *Development* 139, 1013-1022.
- Le Gouar, M., Guillou, A., Vervoort, M., 2004. Expression of a *SoxB* and a *Wnt2/13* gene during the development of the mollusc *Patella vulgata*. *Dev. Genes Evol.* 214, 250-256.
- Le Moigne, A., 1963. Etude du développement embryonnaire de *Polycelis nigra* (Turbellarié, Triclade). *Bull. Soc. Zool. Fr.* 88, 403-422.
- Le Moigne, A., 1966. Etude du développement embryonnaire et recherches sur les cellules de régénération chez l'embryon de la Planaire *Polycelis nigra* (Turbellarié, Triclade). *J. Embryol. Exp. Morph.* 15, 39-60.
- Le Moigne, A., 1968. Etude au microscope électronique de l'évolution des structures embryonnaires de Planaires après irradiation aux rayons X. *J. Embryol. Exp. Morph.* 19, 181-192.
- Lespinet, O., Nederbragt, A. J., Cassan, M., Dictus, W. J., van Loon, A. E., Adoutte, A., Characterization of two *snail* genes in the gastropod mollusc *Patella vulgata*. Implications for understanding the ancestral function of the *snail*-related genes in Bilateria. *Dev. Genes Evol.* 212, 186-195.
- Lichtneckert, R., Reichert, H., 2007. Evolution of Nervous Systems, volum 1 Theories, Development, Invertebrates, capitolo 1.19 Origin and Evolution of the First Nervous System 289-315. Academic Press, Amsterdam.
- Liotti, F. S., Bruscellini, G., 1964. Rapporti tra sistema nervoso e rigenerazione nelle planarie. Prime osservazioni sulle capacità rigenerative di esemplari di *Dugesia lugubris* prima e dopo l'apertura dei cocon. *Riv. Biol.* 57, 121-149.
- Lowe, C. J., Wu, M., Salic, A., Evans, L., Lander, E., Stange-Thomann, N., Gruber, C. E., Gerhart, J., Kirschner, M., 2003. Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of chordate nervous system. *Cell* 113, 853-865.
- Lowery, L. A., Sive, H., 2004. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mech. Dev.* 121, 1189-1197.
- Lüer, K., Technau, G. M., 2009. Single cell cultures of *Drosophila* neuroectodermal and mesectodermal central nervous system progenitors reveal different degrees of developmental autonomy. *Neural Dev.* 4:30.
- Mackie, G. O., 2004. Central neural circuitry in the jellyfish *Aequorea victoria*: a model “simple nervous system”. *Neurosignals* 5:19.
- Maduro, M. F., 2010. Cell fate specification in the *C. elegans* embryo. *Dev. Dyn.* 239, 1315-1329.
- Magie, C. R., Pang, K., Martindale, M. Q., 2005. Genomic inventory and expression of *Sox* and *Fox* genes in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev. Genes Evol.* 215, 618-630.
- Mannini, L., Rossi, L., Deri, P., Gremigni, V., Salvetti, A., Saló, E., Batistoni, R., 2004. *Djeyes absent* (*Djeya*) controls prototypic planarian eye regeneration by cooperating with the transcription factor *Djsix-1*. *Dev. Biol.* 269, 346-359.
- Martin, V. J., 1992. Characterization of a RFamide-positive subset of ganglionic cells in the hydrozoan planarian nerve net. *Cell Tissue Res.* 269, 431-438.
- Martín-Durán, J. M., 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., 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.
- Martín-Durán, J. M., Duocastella, M., Serra, P., Romero, R., 2008. New method to deliver exogenous material into developing planarian embryos. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 310, 668-681.
- Martín-Durán, J. M., Monjo, F., Romero, R., 2012a. Morphological and molecular development of the eyes during embryogenesis of the freshwater planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev. Genes Evol.* 222, 45-54.
- Martín-Durán, J. M., Monjo, F., Romero, R., 2012b. Planarian embryology in the era of comparative developmental biology. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 39-48.
- 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.
- Mbikay, M., Seidah, N. G., Chrétien, M., 2001. Neuroendocrine secretory protein 7B2: structure, expression and functions. *Biochem. J.* 357, 329-342.
- McKanna, J. A., 1968a. Fine structure of the protonephridial system in Planaria. I. Flame cells. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 92, 509-523.
- McKanna, J. A., 1968b. Fine structure of the protonephridial system in Planaria. II. Ductules, collecting ducts and osmoregulatory cells. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 92, 524-535.
- Meyer, N. P., Boyle, M. J., Martindale, M. Q., Seaver, E. C., 2010. A comprehensive fate map by intracellular injection of identified blastomeres in the marine polychaete *Capitella teleta*. *EvoDevo* 1:8.
- Meyer, N. P., Carrillo-Baltodano, A., Moore, R. E., Seaver, E. C., 2015. Nervous system development in lecithotrophic larval and juvenile stages of the annelid *Capitella teleta*. *Front. Zool.* 12:15.
- Meyer, N. P., Seaver, E. C., 2009. Neurogenesis in an annelid: characterization of brain precursors in the polychaete *Capitella* sp. I. *Dev. Biol.* 335, 237-252.
- Meyer, N. P., Seaver, E. C., 2010. Cell lineage and fate map of the primary somatoblast of the polychaete annelid *Capitella teleta*. *Integr. Comp. Biol.* 50, 756-767.
- Mizutani, C. M., Bier, E., 2008. EvoD/Vo: the origins of BMP signalling in the neuroectoderm. *Nat. Rev. Genet.* 9, 663-677.
- Molina, M. D., 2011. Estudio funcional de la vía BMP en la especificación del eje dorsoventral durante la regeneración y homeostasis de la planaria *Schmidtea mediterranea*. Tesis Doctoral, Barcelona.
- Mollina, M. D., Neto, A., Maeso, I., Gómez-Skarmeta, J. L., Saló, E., Cebrià, F., 2011. *Noggin* and *noggin-like* genes controls dorsoventral axis regeneration in planarians. *Curr. Biol.* 21, 300-305.
- Mollina, M. D., 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.
- Monjo, F., Romero, R., 2015. Embryonic development of the nervous system in the planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev. Biol.* 397, 305-319.
- Morita, M., Best, J. B., 1984. Electron microscopic studies of planarian regeneration. IV. Cell division of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. *J. Exp. Zool.* 229, 425-436.
- Morita, M., Best, J. B., Noel, J., 1969. Electron microscopic studies in planarian regeneration. I. Fine structure of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. *J. Ultrastruct. Res.* 27, 7-23.
- Moroz, L. L., Kocot, K. M., Citarella, M. R., Dosung, S., Norekian, T. P., Povolotsakaya, I. S., Grigorenko, A. P., Dailey, C., Berezikov, E., Buckley, K. M., Ptitsyn, A., Reshetov, D., Mukherjee, K., Moroz, T. P., Bobkova, Y., Yu, F., Kapitonov, V. V., Jurka, J., Bobkov, Y. V., Swore, J. J., Girardo, D. O., Fodor, A., Gusev, F., Sanford, R., Bruders, R., Kittler, E., Mills, C. E., Rast, J. P., Derelle, R., Solovyev, V. V., Kondrashov, F. A., Swalla, B. J., Sweedler, J. V.,

- Rogaev, E. I., Halanych, K. M., Kohn, A. B., 2014. The ctenophore genome and the evolutionary origins of neural systems. *Nature* 510, 109-114.
- Morris, J., Nallur, R., Ladurner, P., Egger, B., Rieger, R., Hartenstein, V., 2004. The embryonic development of the flatworm *Macrostomum sp.* *Dev. Genes Evol.* 214, 220-239.
- Morrison, S. J., Kimble, J., 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068-1074.
- Nakanishi, N., Renfer, E., Technau, U., Rentsch, F., 2012. Nervous system of the sea anemone *Nematostella vectensis* are generated by ectoderm and endoderm and shaped by distinct mechanisms. *Development* 139, 347-357.
- Nakanishi, N., Yuan, D., Jacobs, D. K., Hartenstein, V., 2008. Early development, pattern, and reorganization of the planula nervous system in *Aurelia* (Cnidaria, Scyphozoa). *Dev. Genes Evol.* 218, 511-524.
- Nederbragt, A. J., te Welscher, P., van den Driesche, S., van Loon, A. E., Dictus, W. J., 2002a. Novel and conserved roles for *orthodenticle/otx* and *orthopedia/opt* orthologs in the gastropod mollusc *Patella vulgata*. *Dev. Genes. Evol.* 212, 330-337.
- Nederbragt, A. J., van Loon, A. E., Dictus, W. J., 2002b. Expression of *Patella vulgata* orthologs of *engrailed* and *dpp-BMP2/4* in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism. *Dev. Biol.* 246, 341-355.
- Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldron, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K., Murray, P. G., 2000. Monoclonal antibodies. *Mol. Pathol.* 53, 111-117.
- Newmark, P. A., Reddien, P. W., Cebrià, F., Sánchez Alvarado, A., 2003. Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 Suppl. 1, 11861-11865.
- Newmark, P. A., 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 signalling specifies bilaterian body axes. *Development* 137, 845-857.
- Nielsen, C., 2004. Trochophora larvae: cell-lineages, ciliary bands, and body regions. 1. Annelida and Mollusca. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 302, 35-68.
- Nielsen, C., 2008. Six major steps in animal evolution: are we derived sponge larvae? *Evol. Dev.* 10, 241-257.
- Nielsen, C., 2012. *Animal evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Sano, S., Yoshimoto, K., Inden, M., Takata, K., Taniguchi, T., Shimohama, S., Agata, K., 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., Agata, K., 2007b. Identification and distribution of tryptophan hydroxylase (TPH)-positive neurons in the planarians *Dugesia japonica*. *Neurosci. Res.* 58, 101-106.
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Yoshimoto, K., Taniguchi, T., Agata, K., 2008a. Characterization of tyramine  $\beta$ -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., Agata, K., 2008b. Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience* 153, 1103-1114.
- Nishimura, O., Hirao, Y., Tarui, H., Agata, K., 2012. Comparative transcriptome analysis between planarian *Dugesia japonica* and other platyhelminth species. *BMC Genomics* 12, 289.

- Nogi, T., Zhang, D., Chan, J. D., Merchant, J. S., 2009. A novel biological activity of praziquantel requiring voltage-operated  $Ca^{2+}$  channel beta subunits: subversion of flatworm regenerative polarity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3:e464.
- Nomaksteinsky, M., Röttinger, E., Dufour, H. D., Chettouh, Z., Lowe, C. J., Martindale, M. Q., Brunet, J. F., 2009. Centralization of the deuterostome nervous system predates chordates. *Curr. Biol.* 19, 1264-1269.
- Nübler-Jung, K., Arendt, D., 1996. Enteropneusts and chordate evolution. *Curr. Biol.* 6, 352-353.
- Okamoto, K., Takeuchi, K., Agata, K., 2005. Neural projections in planarian brain revealed by fluorescent dye tracing. *Zoolog. Sci.* 22, 535-546.
- Okano, H., Imai, T., Okabe, M., 2002. Musashi: a translational regulator of cell fate. *J. Cell Sci.* 115, 1355-1359.
- Onal, P., Grün, D., Adamidi, C., Rybak, A., Solana, J., Mastrobuoni, G., Wang, Y., Rahn, H. P., Chen, W., Kempa, S., Ziebod, U., Rajewsky, N., 2012. Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *EMBO J.* 31, 2755-2769.
- Orii, H., Ito, H., Watanabe, K., 2002. Anatomy of the planarian *Dugesia japonica* I. The muscular system revealed by antisera against myosin heavy chains. *Zoolog. Sci.* 19, 1123-1231.
- Orii, H., Mochii, M., Watanabe, K., 2003. A simple "soaking method" for RNA interference in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev. Genes Evol.* 213, 138-141.
- Orii, H., Sakurai, T., Watanabe, K., 2005. Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev. Genes Evol.* 215, 143-157.
- 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, N. J., Morokuma, J., Walentek, P., Kema, I. P., Gu, M. B., Ahn, J. M., Hwang, J. S., Gojobori, T., Levin, M., 2010. Long-range neural and gap junction protein-mediated cues control polarity during planarian regeneration. *Dev. Biol.* 339, 188-199.
- Pallas, P. S., 1774. *Spicilegia zoologica quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque commentariis illustrantur.* Berolini, Prostant, Apud. Gottl.
- Pascale, A., Amadio, M., Quattrone, A., 2008. Defining a neuron: neuronal ELAV proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 128-140.
- Passamaneck, Y. J., Furchheim, N., Hejnal, A., Martindale, M. Q., Lüter, C., 2011. Ciliary photoreceptors in the cerebral eyes of a protostome larva. *EvoDevo* 2:6.
- Pearson, B. J., Doe, C. Q., 2004. Specification of temporal identity in the developing nervous system. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20, 619-647.
- Pellettieri, J., Fitzgerald, P., Watanabe, S., Mancuso, J., Green, D. R., Sánchez Alvarado, A., 2010. Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev. Biol.* 338, 76-85.
- Petersen, C. P., Reddien, P. W., 2008. *Smed-betacatenin-1* is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. *Science* 319, 327-330.
- Philippe, H., Brinkmann, H., Copley, R. R., Moroz, L. L., Nakano, H., Poustka, A. J., Wallberg, A., Peterson, K. J., Telford, M. J., 2011. Acoelomorph flatworms are deuterostomes related to *Xenoturbella*. *Nature* 470, 255-258.
- Pineda, D., González, J., Callaerts, P., Ikeo, K., Gehring, W. J., Saló, 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.
- Piraino, S., Zaga, G., Di Benedetto, C., Leone, A., Dell'Anna, A., Pennati, R., Camevali, D. C., Schmid, V., Reichert, H., 2011. Complex neural architecture in the diploblastic larva of *Clava multicornis* (Hydrozoa, Cnidaria). *J. Comp. Neurol.* 519, 1931-1951.
- Quan, X. J., Hassan, B. A., 2005. From skin to nerve: flies, vertebrates and the first hélix. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2036-2049.

- Quintanar, J. L., Gutiérrez-García, K., Castillo-Hernández, L., 2011. The neuropeptide Gonadotropin-releasing hormone modifies the spontaneous muscular contraction in the earthworm: *Eisenia foetida*. *Invert. Neurosci.* 11, 113-116.
- Raff, R. A., 1996. *The Shape of Life. Genes, Development and the Evolution of Animal Form.* University of Chicago Press, Chicago.
- Rajasekharan, S., Kennedy, T. E., 2009. The netrin protein family. *Genome Biol.* 10:239.
- Ratti, A., Fallini, C., Cova, L., Fantozzi, R., Calzarossa, C., Zennaro, E., Pascale, A., Quattrone, A., Silani, V., 2006. A role for the ELAV RNA-binding proteins in neural stem cells: stabilization of *Msi1* mRNA. *J. Cell Sci.* 119, 1442-1452.
- Rawlinson, K. A., 2010. Embryonic and post-embryonic development of the polyclad flatworm *Maritigrella crozieri*; implications for the evolution of spiralian life history traits. *Front. Zool.* 7:12.
- Reddien, P. W., 2011. Constitutive gene expression and the specification of tissue identity in adult planarian biology. *Trends Genet.* 27, 277-285.
- Reddien, P. W., Bermange, A. L., Kicza, A. M., Sánchez Alvarado, 2007. BMP signal regulates the dorsal midline and is needed for asymmetric regeneration. *Development* 134, 4043-4051.
- Reddien, P. W., Oviedo, N. J., Jennings, J. R., Jenkin, J. C., Sánchez Alvarado, A., 2005. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulated planarian stem cells. *Science* 310, 1327-1330.
- Reisinger, E., Kelbetz, S., 1964. Fine structure and discharge mechanism of rhabdites. *Z. Wiss. Mikrosk.* 65, 472-508.
- Reiter, D., Ladurner, G., Mair, W., Salvenmoser, R., Rieger, R., Boyer, B., 1996. Differentiation of the body wall musculature in *Macrostomum hystricinum marinum* and *Hoploplana inquilina* (Platyhelminthes), as models for muscle development in lower Spiralia. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 205, 410-423.
- Reuter, M., Sheiman, I. M., Gustafsson, M. K. S., Halton, D. W., Maule, A. G., Shaw, C., 1996. Development of the nervous system in *Dugesia tigrina* during regeneration after fission and decapitation. *Invert. Reprod. Dev.* 29, 199-211.
- Richards, G. S., Rentzsh, F., 2014. Transgenic analysis of a *soxB* gene reveals neural progenitor cells in the cnidarians *Nematostella vectensis*. *Development* 141, 4681-4689.
- Rieger, R. M., Tyler, S., Smith III, J. P. S., Rieger, G. E., 1991. *Microscopic Anatomy of Invertebrates, 3: Platyhelminthes and Nemertinea, capítulo Platyhelminthes: Turbellaria* 7-140. Wiley-Liss, New York.
- Rink, J. C., 2013. Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev. Genes Evol.* 223, 67-83.
- Rink, J. C., Vu, H. T., Sánchez Alvarado, A., 2011. The maintenance and regeneration of the planarian excretory system are regulated by EGFR signalling. *Development* 138, 3769-3780.
- Riutort, M., Álvarez-Presas, M., Lázaro, E., Solà, E., Paps, J., 2012. Evolutionary history of the Tricladida and the Platyhelminthes: an up-to-date phylogenetic and systematic account. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 5-17.
- Robb, S. M., Sánchez Alvarado, A., 2002. Identification of immunological reagents for use in the study of freshwater planarians by means of whole-mount immunofluorescence and confocal microscopy. *Genesis* 32, 293-298.
- Robb, S. M. C., Ross, E., Sánchez Alvarado, A., 2008. SmedGD: the *Schmidtea mediterranea* genome database. *Nucleic Acids Res.* 36, 599-606.
- Roberts-Galbraith, R. H., Newmark, P. A., 2013. Follistatin antagonizes Activin signaling and acts with Notum to direct planarian head regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 1363-1368.
- Roberts-Galbraith, R. H., Newmark, P. A., 2015. On the organ trail: insights into organ regeneration in the planarian. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 32, 37-46.

- Rodríguez-Esteban, G., González-Sastre, A., Rojo-Laguna, J. I., Saló, E., Abril, J. F., 2015. Digital gene expression approach over multiple RNA-Seq data sets to detect neoblast transcriptional changes in *Schmidtea mediterranea*. *BMC Genomics* 16:361.
- Romero, R., Baguñà, J., 1981. Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia* 84, 181-194.
- Romero, R., Baguñà, J., 1991. Quantitative cellular analysis of growth and reproduction in freshwater planarians (Turbellaria; Tricladida). I. A cellular description of the intact organism. *Inv. Repr. Dev.* 19, 157-165.
- Romero, R., Fibla, J., Bueno, D., Sumoy, L., Soriano, M., Baguñà, J., 1991. Monoclonal antibodies as markers of specific cell types and regional antigens in the freshwater planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*. *Hydrobiologia* 227, 73-79.
- Rossi, L., Salvetti, A., Marincola, F. M., Lena, A., Deri, P., Mannini, L., Batistoni, R., Wang, E., Gremigni, V., 2007. Deciphering the molecular machinery of stem cells: a look at the neoblast gene expression profile. *Genome Biol.* 8:R62.
- Ruiz-Trillo, I., Riutort, M., Littlewood, D., T., Herniou, E. A., Baguñà, J., 1999. Acoels flatworms: earliest extant bilaterian Metazoans, not members of Platyhelminthes. *Science* 283, 1919-1923.
- Ryan, J. F., 2014. Did the ctenophore nervous system evolve independently? *Zoology (Jena)* 117, 225-226.
- Saló, E., 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.* 883, 63-80.
- Samoilovich, M. P., Kuznetsov, S. G., Pavlova, M. S., Klimovich, V. B., 2001. Monoclonal antibodies to *Hydra vulgaris* and *Hydra oligactis* antigens. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 37, 262-269.
- Sánchez Alvarado, A., Newmark, P. A., 1999. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5049-5054.
- Sandberg, M., Källström, M., Muhr, J., 2005. Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat. Neurosci.* 8, 995-1001.
- Santagata, S., Resh, C., Hejnowicz, A., Martindale, M. Q., Passamanek, Y. J., 2012. Development of the larval anterior neurogenic domains of *Terebratalia transversa* (Bracchiopoda) provides insights into the diversification of larval apical organs and the spiralian nervous system. *EvoDevo* 3:3.
- Sarkar, A., Hochedlinger, K., 2013. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* 12, 15-30.
- Sawa, H., 2010. Specification of neurons through asymmetric cell divisions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 44-49.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J., Technau, G. M., 1997. The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal half of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* 189, 186-204.
- Schmidt-Rhaesa, A., 2007. The evolution of organ systems. Oxford University Press, Oxford.
- Scimone, M. L., Kravarik, K. M., Lapan, S. W., Reddien, P. W., 2014a. Neoblast specialization in regeneration of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Stem Cell Reports* 3, 339-352.
- Scimone, M. L., Lapan, S. W., Reddien, P. W., 2014b. A *forkhead* transcription factor is wound-induced at the planarian midline and required for anterior pole regeneration. *PLoS Genet.* 10:e1003999.
- Scimone, M. L., Srivastava, M., Bell, G. W., Reddien, P. W., 2011. A regulatory program for excretory system regeneration in planarians. *Development* 138, 4387-4398.
- Seipp, S., Schmic, J., Will, B., Schetter, E., Plickert, G., Leitz, T., 2010. Neuronal cell death during metamorphosis of *Hydractina echinata* (Cnidaria, Hydrozoa). *Invert. Neurosci.* 10, 77-91.

- Shagin, D. A., Barsova, E. V., Bogdanova, E., Britanova, O. V., Gurskaya, N., Lukyanov, K. A., Matz, M. V., Punkova, N. I., Usman, N. Y., Kopantzev, E. P., Salo, E., Lukyanov, S. A., 2002. Identification and characterization of a new family of C-type lectin-like genes from planaria *Girardia tigrina*. *Glycobiology* 12, 463-472.
- Shaham, S., 2015. Glial development and function in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7:a020578.
- Shibata, N., Rouhana, L., Agata, K., 2010. Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Dev. Growth Differ.* 52, 27-41.
- Simionato, E., Kerner, P., Dray, N., Le Gouar, M., Ledent, V., Arendt, D., Vervoort, M., 2008. *atonal*- and *achaete-scute*-related genes in the annelid *Platynereis dumerilii*: insights into the evolution of neural basic-Helix-Loop-Helix genes. *BMC Evol. Biol.* 8:170.
- Singh, K., Singh, R. N., 1999. Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) during pupation. *J. Biosci.* 24, 345-360.
- Skaer, R. J., 1965. The origin and continuous replacement of epidermal cells in the planarian *Polycelis tenuis* (Ijima). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 13, 129-139.
- Sluys, R., 1989. Phylogenetic relationships of the triclads (Platyhelminthes, Seriata, Tricladida). *Contrib. Zool.* 59, 3-25.
- Solana, J., 2013. Closing the circle of germline and stem cells: the Primordial Stem Cell hypothesis. *EvoDevo* 4:2.
- Solana, J., Kao, D., Mihaylova, Y., Jaber-Hijazi, F., Malla, S., Wilson, R., Aboobaker, A. A., 2012. Defining the molecular profile of planarian pluripotent stem cells using a combinatorial RNAseq, RNA interference and irradiation approach. *Genome Biol.* 13:R19.
- Solana, J., Lasko, P., Romero, R., 2009. *Spoltud-1* is a chromatoid body component required for planarian long-term stem cell self-renewal. *Dev. Biol.* 328, 410-421.
- Solana, J., Romero, R., 2009. *Spol/vlgA* is a DDX3/PL10-related DEAD-box RNA helicase expressed in blastomeres and embryonic cells in planarian embryonic development. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 64-73.
- Southall, T. D., Brand, A. H., 2009. Neural stem cell transcriptional networks highlight genes essential for nervous system development. *EMBO J.* 28, 3799-3807.
- Sprecher, S. G., Desplan, C., 2009. *Animal Models in Eye Research*, capitol 4 Development of the *Drosophila melanogaster* Eye: from Precursor Specification to Terminal Differentiation 27-47. Elsevier Ltd., New York.
- Steinmetz, P. R., Kostyuchenko, R. P., Fischer, A., Arendt, D., 2011. The segmental pattern of *otx*, *gbx*, and *Hox* genes in the annelid *Platynereis dumerilii*. *Evol. Dev.* 13, 72-79.
- Steinmetz, P. R., Urbach, R., Posnien, N., Eriksson, J., Kostyuchenko R. P., Brena, C., Guy, K., Akam, M., Bucher, G., Arendt, D., 2010. *Six3* demarcates the anterior-most developing brain region in bilaterian animals. *EvoDevo* 1:14.
- Stemple, D. L., 2005. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development* 132, 2503-2512.
- Stern, C. D., 2006. Neural induction: 10 years on since the "default model". *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 692-697.
- Stergiopoulos, A., Elkouris, M., Politis, P. K., 2015. Prospero-related homeobox 1 (Prox1) at the crossroads of diverse pathways during adult neural fate specification. *Front. Cell. Neurosci.* 8:454.
- Stiles, J., Jernigan, T. L., 2010. The basics of brain development. *Neuropsychol. Rev.* 20, 327-348.
- Struck, T. H., Wey-Fabrizius, A. R., Golombek, A., Hering, L., Weigert, A., Bleidorn, C., Klebow, S., Iakovenko, N., Hausdorf, B., Petersen, M., Kück, P., Herlyn, H., Hankeln, T., 2014. Platyzoan paraphyly based on phylogenomic data supports a noncoelomate ancestry of spiralia. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1833-1849.

- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., Thomson, J. N., 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100, 64-119.
- Takeda, H., Nishimura, K., Agata, K., 2009. Planarians maintain a constant ratio of different cell types during changes in body size by using the stem cell system. *Zool. Sci.* 26, 805-813.
- Taverna, E., Götz, M., Huttner, W. B., 2014. The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 465-502.
- Tazaki, A., Kato, K., Orii, H., Agata, K., Watanabe, K., 2002. The body margin of the planarian *Dugesia japonica*: characterization by the expression of an intermediate filament gene. *Dev. Genes Evol.* 212, 365-373.
- Technau, U., Steele, R. E., 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. 138, 1447-1458.
- Tessmar-Raible, K., Arendt, D., 2003. Emerging systems: between vertebrates and arthropods, the Lophotrochozoa. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 331-340.
- Tomarev, S. I., Callaerts, P., Kos, L., Zinovieva, R., Halder, G., Gehring, W., Piatigorsky, J., 1997. Squid *Pax-6* and eye development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 2421-2426.
- 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 evolutionary conserved homeobox genes. *Dev. Genes Evol.* 209, 31-39.
- Van Wolfswinkel, J. C., Wagner, D. E., Reddien, P. W., 2014. Single-cell analysis reveals functionally distinct classes within the planarian stem cell compartment. *Cell Stem Cell* 15, 326-339.
- Vieira, C., Pombero, A., García-López, R., Gimeno, L., Echevarria, D., Martínez, S., 2010. Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 7-20.
- Vopalensky, P., Kozmik, Z., 2009. Eye evolution: common use and independent recruitment of genetic components. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2819-2832.
- Wadsworth, W. G., Hedgecock, E. M., 1992. Guidance of neuroblast migrations and axonal projections in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 36-41.
- Wagner, D. E., Ho, J. J., Reddien, P. W., 2012. Genetic regulators of a pluripotent adult stem cell system in planarians identified by RNAi and clonal analysis. *Cell Stem Cell* 10, 299-311.
- Wagner, D. E., Wang, I. E., Reddien, P. W., 2011. Clonogenic neoblasts are totipotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* 332, 811-816.
- Wenemoser, D., Lapan, S. W., Wilkinson, A. W., Bell, G. W., Reddien, P. W., 2012. A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes Dev.* 26, 988-1002.
- Wenemoser, D., Reddien, P. W., 2010. Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev. Biol.* 344, 979-991.
- Werbrock, A. H., Meiklejohn, D. A., Sainz, A., Iwasa, J. H., Savage, R. M., 2001. A polychaete *hunchback* ortholog. *Dev. Biol.* 235, 476-488.
- Westblad, E., 1948. Studien über skandinavische Turbellaria Acoela. *V. Ark. Zool.* 41A, 1-82.
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., Brenner, S., 1986. The structure of the nervous system *C. elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 314, 1-340.
- Witchley, J. N., Mayer, M., Wagner, D. E., Owen, J. H., Reddien, P. W., 2013. Muscle cells provide instructions for planarian regeneration. *Cell. Rep.* 4, 633-641.
- Yamaguchi, Y., Miura, M., 2015. Programmed cell death in neurodevelopment. *Dev. Cell* 32, 478-490.



- Yamaguchi, E., Seaver, E. C., 2013. The importance of larval eyes in the polychaete *Capitella teleta*: effects of larval eye deletion of formation of the adult eye. *Invertebr. Biol.* 132, 352-367.
- Yeo, W., Gautier, J., 2004. Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev. Biol.* 274, 233-244.
- Younossi-Hartenstein, A., Ehlers, U., Hartenstein, V., 2000. Embryonic development of the nervous system of the rhabdocoel flatworm *Mesostoma lingua* (Abildgaard, 1789). *J. Comp. Neurol.* 416, 461-474.
- Younossi-Hartenstein, A., Hartenstein, V., 2000. The embryonic development of the polyclad flatworm *Imogine mcgrathi*. *Dev. Genes Evol.* 210, 383-398.
- Younossi-Hartenstein, A., Jones, M., Hartenstein, V., 2001. Embryonic development of the nervous system of the temnocephalid flatworm *Craspedella pedum*. *J. Comp. Neurol.* 434, 56-68.
- Ypsilanti, A. R., Zagar, Y., Chedotal, A., 2010. Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* 137, 1939-1952.
- Zagozewski, J. L., Zhang, Q., Eisenstat, D. D., 2014. Genetic regulation of vertebrate eye development. *Clin. Genet.* 86, 453-460.
- Zander, M. A., Cancino, G. I., Gridley, T., Kaplan, D. R., Miller, F. D., 2014. The Snail transcription factor regulates the numbers of neural precursor cells and newborn neurons throughout mammalian life. *PLoS One* 9:e104767.
- Zayas, R. M., Cebrià, F., Guo, T., Feng, J., Newmark, P. A., 2010. The use of lectins as markers for differentiated secretory cells in planarians. *Dev. Dyn.* 239, 2888-2897.
- Zhang, D., Chan, J. D., Nogi, T., Marchant, J. S., 2011. Opposing roles of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in neuronal control of regenerative patterning. *J. Neurosci.* 31, 15983-15995.
- Zhang, S. O., Weisblat, D. A., 2005. Applications of mRNA injections for analyzing cell lineage and symmetric cell divisions during segmentation in the leech *Helobdella robusta*. *Development* 132, 2103-2113.
- Zhao, G., Skeath, J. B., 2002. The Sox-domain containing gene *Dichaete/fish-hook* acts in concert with *vnd* and *ind* to regulate cell fate in the *Drosophila melanogaster*. *Development* 129, 1165-1174.

# Annexes



## Annex 1. Miogènesi en embrions de *S. polychroa*

A continuació es proporciona una descripció detallada de la formació del sistema muscular definitiu i del procés de degeneració de la faringe embrionària i de formació de la faringe definitiva en embrions *in toto* amb els marcadors específics fal·loïdina-rodamina i anti-TMUS13. La fal·loïdina-rodamina és un marcador fluorescent comercial que reconeix l'actina filamentosa, una molècula molt abundant en las fibres musculars madures de planària (Cebrià i altres, 1997) i que en embrions primerencs de *S. polychroa* es detecta al plexe muscular de la faringe embrionària (Martín-Durán i altres, 2010). L'anticòs anti-TMUS13 reconeix un antigen de la proteïna codificada per un gen de la miosina de cadena pesada (=mhc) que en embrions tardans i en adults es localitza, com la fal·loïdina, a la musculatura corporal i que, a més, detecta miòcits en diferents estadis de diferenciació (Cebrià i altres, 1997; Cardona i altres, 2005a). Per a les immunohistoquímiques fluorescents *in toto* amb aquests dos marcadors es va seguir el protocol descrit per Monjo i Romero (2015) que utilitza el producte "Image-iT FX Signal Enhancer" (Invitrogen) per bloquejar llocs d'unió inespecífics i millorar la resolució i intensitat de la senya final.

### Diferenciació del sistema muscular

Fins a l'estadi 4, tant la fal·loïdina-rodamina com l'anticòs anti-TMUS13 es detectaven exclusivament a la faringe embrionària (Figura 1A). En aquest estadi l'anticòs també tenia els primers miòcits del sistema muscular definitiu en una regió propera a l'òrgan transitori; aquestes cèl·lules tenien una morfologia arrodonida o lleugerament elongada i encara no projectaven fibres (Figura 1A).

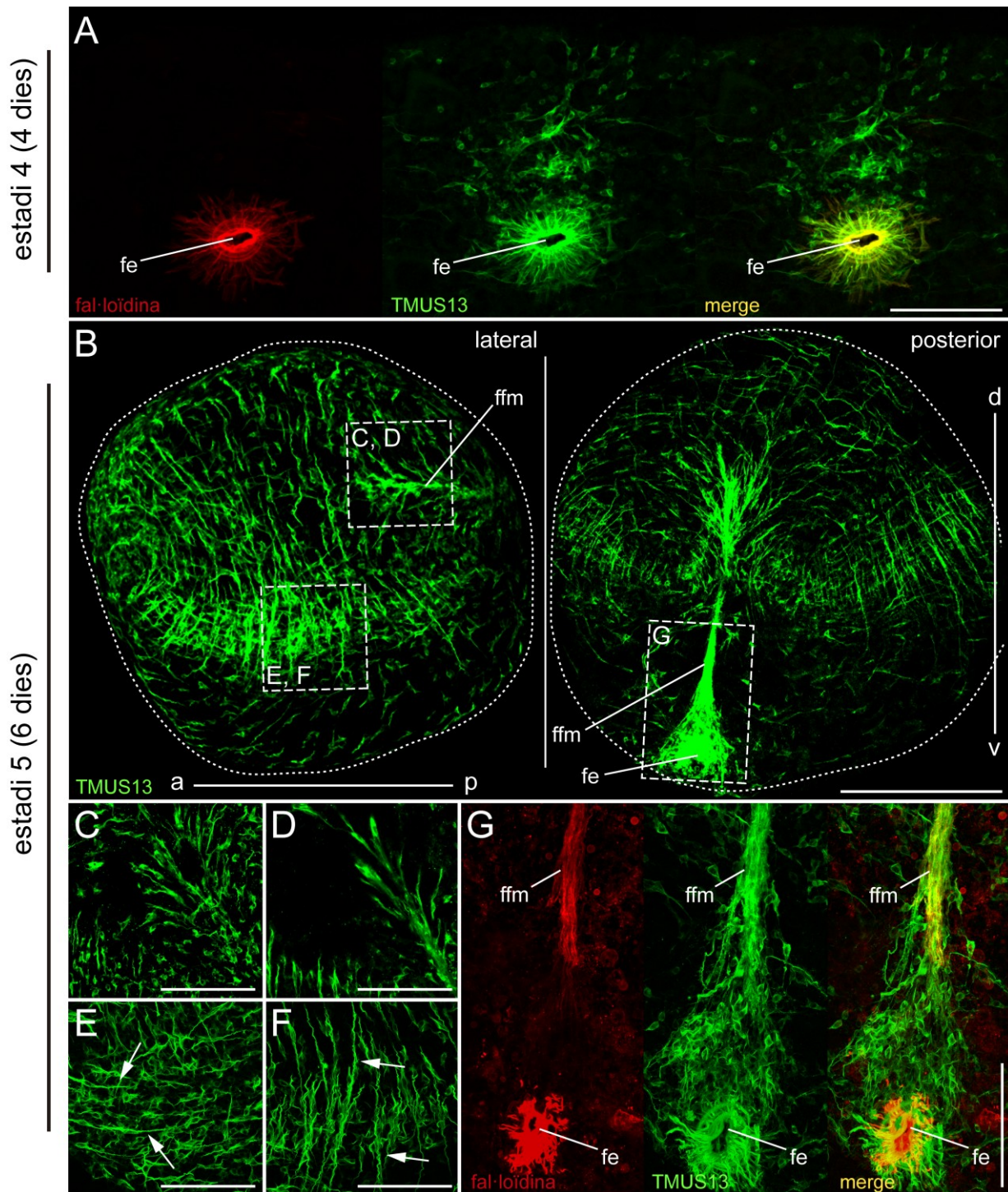
A l'estadi 5 s'observa per primer cop la formació de plexes de la paret muscular de l'embrió (Figura 1B). Aquests es concentraven en tres dominis: un domini dorsal format només per fibres longitudinals; un domini lateral que es composava d'una capa externa de fibres longitudinals (Figura 1E) i una de més interna amb fibres circulars (Figura 1F); i un domini ventral on s'hi començaven a diferenciar cèl·lules que adoptaven una orientació longitudinal. Les regions dorsal i lateral eren les que mostraven un desenvolupament més pronunciat de la musculatura (Figura 1B), i les fibres que s'acumulaven a la regió dorsal es trobaven sempre a un nivell més intern que les de la regió lateral (dades no mostrades). Per sota d'aquestes capes es distribuïen esparsament miòcits d'aspecte similar als detectats a l'estadi 4 (Figura 1B). Els dos marcadors utilitzats també permetien visualitzar la faringe embrionària i un feix de fibres que s'originava en un lloc proper a aquest òrgan i que s'estenia fins a la futura regió dorsal de l'embrió (Figures 1B i 1G). Aquest feix és característic dels estadis 5 i 5 tardà i demarca el pol posterior de l'embrió (Monjo i Romero, 2015). El seus extrems presentaven característiques anatòmiques diferents; així, mentre l'extrem dorsal finalitzava en una mena de "ventall" des d'on es desplegaven més fibres musculars (Figures 1C i 1D), l'extrem ventral s'interrompia de manera abrupta abans de contactar amb la faringe embrionària (Figura 1G). L'espai que separava la faringe i el feix de fibres es trobava farcit de miòcits positius per l'anticòs anti-TMUS13 (Figura 1G).

A l'estadi 5 tardà s'inicia l'adopció de la forma final i, per tant, es fa evident l'aplanament dorsoventral característic de l'animal adult (Monjo i Romero, 2015). Pel que fa a la musculatura es continua distingint la presència de plexes musculars subepidèrmics més desenvolupats a la regió lateral -o del marge dorsoventral- i dorsal que a la ventral (Figures 2A i 2B), el feix muscular a l'extrem posterior (Figures 2A-dorsal i 2A-medial), i la faringe embrionària en degeneració a la regió ventral-posterior (Figures 2A-ventral i 2B). En conjunt, però, el patró del sistema muscular es torna més complex i ara ja s'observen fibres circulars per tot arreu (Figures 2A i 2B), a més de fibres longitudinals a la regió dorsal i medial (Figures 2B i 2C), i comencen a aparèixer les primeres traces de la musculatura transversal parenquimàtica (Figures 2A-medial i 2D). Com als organismes adults (Orii i altres, 2002), aquests músculs tenen l'origen al marge dorsoventral i envolten les branques del sistema digestiu en formació (Figura 2A-medial).

Finalment, entre els estadis 6 i 7 s'estableix el patró definitiu (Figures 2E i 2F). Així doncs, la paret muscular estava formada per una capa de fibres circulars, seguida d'una de longitudinals, una de diagonals i, en darrer lloc, una altra capa de fibres longitudinals més gruixudes (Figura 2F). A més, es desenvolupaven nombroses commissures dorsoventrals que creuaven l'interior del parènquima (dades no mostrades), i augmentava l'extensió i el nombre dels músculs transversals (Figura 2G). També es dona l'obertura de la boca, que estava limitada per fibres circulars i radials (Figura 2H), i s'organitzaven les capes de músculs de la faringe definitiva (Figura 2I); aquestes dues estructures es desplacen a una localització més anterior respecte de l'estadi anterior (Figures 2A-ventral i 2E).

### **Degeneració de la faringe embrionària i formació de la faringe definitiva**

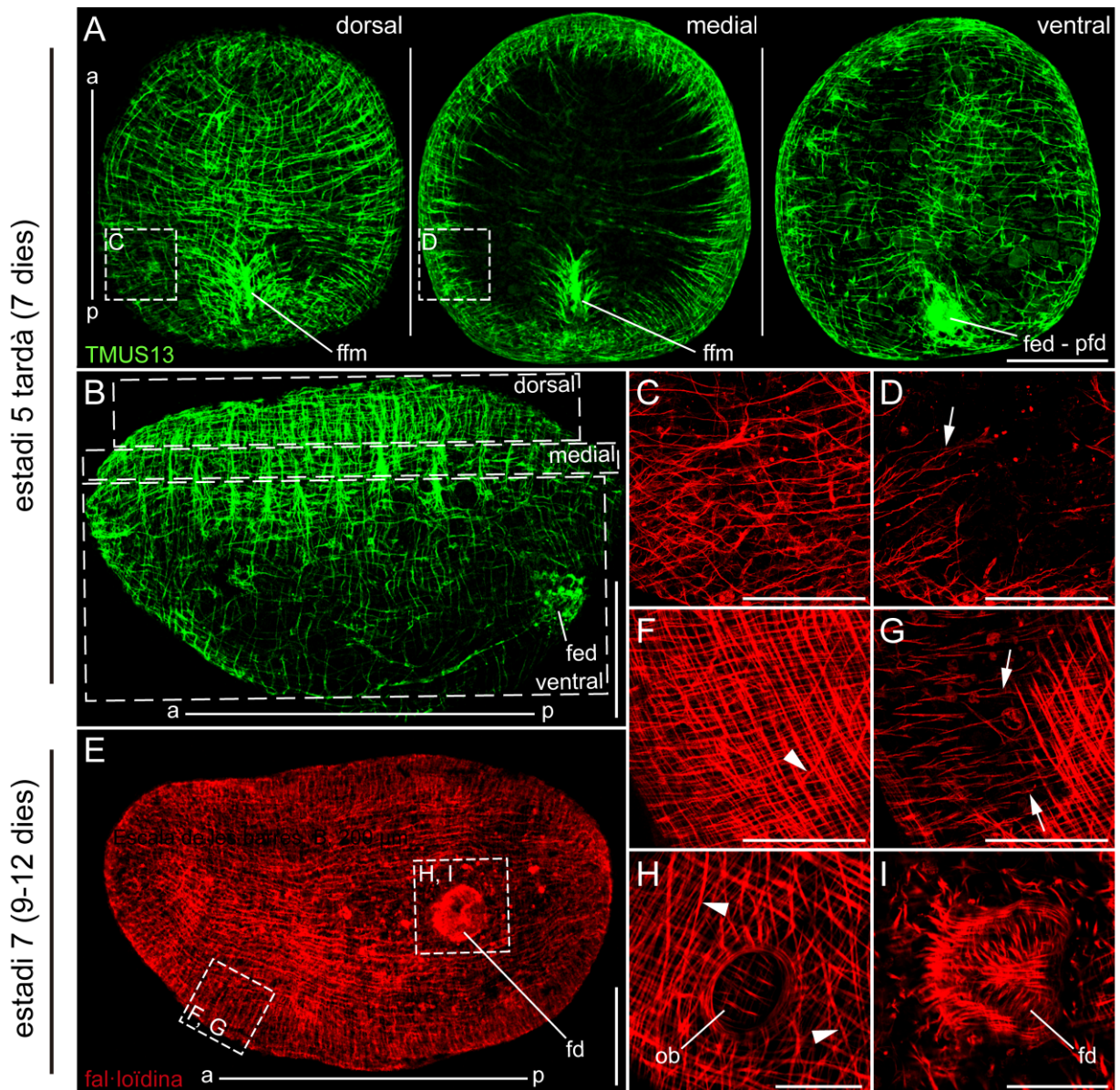
Els dos processos es produïen en un marge de temps breu, entre els 5 i 8 dies del desenvolupament (Figura 3). La tinció amb fal·loïdina-rodamina mostrava que als 5 dies l'òrgan transitori mantenia la integritat del plexe muscular format per fibres circulars arranjades en un patró concèntric al lumen i fibres radials que es projecten cap a l'epiteli de voltant (Figura 3A). A partir d'aquest moment es donaven tres esdeveniments principals: la degeneració de la faringe embrionària (Figures 3B, 3C i 3D), l'aparició del primordi de la faringe definitiva en una posició immediatament adjacent a l'òrgan transitori (Figures 3D i 3E), i la diferenciació de la faringe definitiva i l'obertura de la boca (Figures 3E i 3F). La degeneració de la faringe embrionària té lloc després de que l'embrió ingereixi les cèl·lules vitel·lines que l'envolten (Cardona i altres, 2005) i s'iniciava amb una desorganització general de totes les fibres musculars (Figura 3B), seguia amb la pèrdua del plexe circular (Figura 3C) i acabava amb la desaparició de les fibres radials (Figura 3D). Llavors s'acumulaven cèl·lules musculars de nova formació al primordi de la faringe definitiva (Figures 2A-ventral i 3D) i, un pel més tard, s'obria l'orifici de la boca (Figura 3E). Entre els dies 7 i 8 les cèl·lules musculars s'organitzaven en un plexe rudimentari (Figura 3E i 3F) que adquiria una major complexitat en els estadis posteriors (Figura 2I), i que mostrava l'estructura final en el moment de l'eclosió de l'animal (dades no mostrades).



**Figura 1. Diferenciació del sistema muscular en embrions d'estadi 4 i 5.** Projeccions en z de sèries d'imatges de confocal d'immunohistoquímiques fluorescentes amb fal·loidina (en color vermell) o amb l'anticòs anti-TMUS13 (en color verd) en embrions *in toto* d'estadi 4 i estadi 5. La correspondència dies/estadis segueix la proposada a Monjo i Romero (2015). **A** Els primers miòcits del sistema muscular definitiu es formen al voltant de la faringe embrionària en embrions d'estadi 4. **B** A l'estadi 5 les fibres musculars diferenciades són més abundants a la regió lateral-dorsal de l'embrió i s'organitzen en un patró de capes circulars i longitudinals; també es forma un feix de fibres que va des de la faringe embrionària fins a la regió dorsal i que demarca l'extrem posterior de l'embrió. Les imatges **C**, **D** mostren, respectivament, una visió externa i interna de l'extrem dorsal del feix de fibres musculars. De

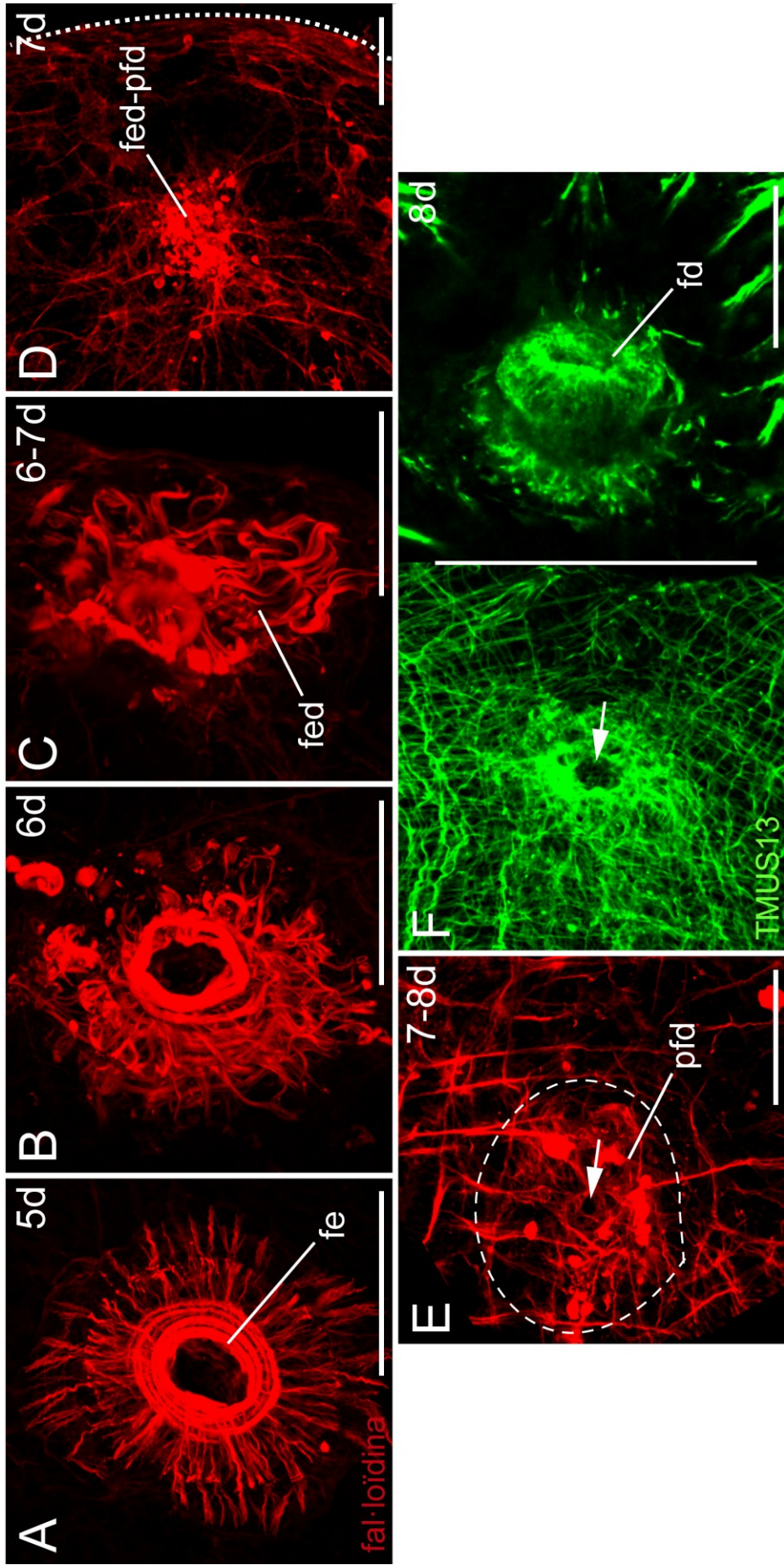
manera similar, les imatges **E**, **F** mostren, respectivament, una visió externa i interna de la musculatura del futur marge lateral de l'embrió; a (E) les fletxes blanques assenyalen fibres musculars longitudinals i a (F) fibres circulars. **G** S'hi pot veure la part del feix que és més propera a la faringe embrionària. La línia puntejada de color blanc indica els límits de l'embrió. Les imatges (C, D) mostren visions dorsals amb l'anterior a la part superior esquerra, (E, F) són visions laterals amb l'anterior a la part esquerra, i a (G) el pol dorsal es troba cap a la part superior de la imatge. a, anterior; d, dorsal; fe, faringe embrionària; ffm, feix de fibres musculars; p, posterior; v, ventral. Escala de les barres, B, 200 µm; A-G, 100 µm.





**Figura 2. Morfogènesi del sistema muscular definitiu.** Projeccions en z de sèries d'imatges de confocal d'immunohistoquímiques fluorescents amb fal·loïdina (en color vermell) o amb l'anticòs anti-TMUS13 (en color verd) en embrions *in toto* d'estadi 5 tardà i estadi 7. La correspondència dies/estadis segueix la proposada a Monjo i Romero (2015). **A, B** A l'estadi 5 tardà augmenta la complexitat i l'abundància de les cèl·lules musculars; encara apareix el feix de fibres posterior i s'inicia la diferenciació a la regió de la faringe embrionària en degeneració del plexe de l'òrgan definitiu. **E** El patró definitiu muscular s'estableix a l'estadi 7; deixa d'observar-se el feix posterior de fibres. Les imatges **C, D** mostren, respectivament, una visió de la paret muscular i de la musculatura parenquimàtica interna en desenvolupament d'un estadi 5 tardà; les imatges **F, G** corresponen a regions equivalents d'un embrió d'estadi 7 on s'hi pot distingir la consolidació dels plexes. Les fletxes blanques de (**D, G**) assenyalen fibres internes transversals, i els caps de fletxa blancs de (**F, G**) indiquen fibres diagonals que apareixen a partir de l'estadi 7. **H, I** ofereixen, respectivament, una visió superficial i interna de la regió de la boca i la faringe definitiva. La imatge (**E**) mostra una visió ventral d'un embrió d'estadi 7, (**C-D**) són visions dorsals i (**F-G**) ventrals on l'anterior es troba a la part superior esquerra, i (**H, I**) són visions ventral amb l'anterior cap a l'esquerra. a, anterior; fd, faringe definitiva; fed, faringe embrionària en degeneració; ffm, feix de fibres musculars; ob, obertura

de la boca; p, posterior; pfd, primordi de la faringe definitiva. Escala de les barres, A, B i E, 200  $\mu\text{m}$ ; C-G, 100  $\mu\text{m}$ ; H i I, 50.



**Figura 3. Visualització de la degeneració de la faringe embrionària i la formació de la faringe definitiva amb marcadors musculars.** (A–F) Projeccions en z de sèries d'imatges de confocal d'immunohistoquímiques fluorescents amb fal·loïdina (en color vermell) o amb l'anticòs anti-TMUS13 (en color verd) en embrions in toto. Al marge superior dret de cada imatge s'hi indica el temps de desenvolupament dels embrions; la correspondència entre aquesta datació i els diferents estadis embrionaris segueix la proposada a Monjo i Romero (2015). Les fletxes blanques assenyalen l'obertura de la boca de l'embrió definitiu. (E) La línia discontinua de color blanc encercla fibres musculars de la faringe definitiva en formació; aquestes es troben immerses al parènquima del voltant de l'obertura de la boca. (F) La imatge de l'esquerra mostra una visió superficial on es distingeix la boca i part de la paret muscular, i la de la dreta una de més interna on apareix la faringe definitiva. A (D), la línia puntejada de color blanc indica els límits de l'embrió. Les imatges (D-F) mostren visions ventrals amb l'anterior a l'esquerra. fe, faringe embrionària; fed, faringe embrionària en degeneració; fd, faringe definitiva; pfd, primordi de la faringe definitiva. Escala de les barres, 50 µm.

## **Annex 2, Article 3. Generació d'anticossos monoclonals per l'embrió de la planària *Schmidtea polychroa***

**Francisco Monjo**<sup>1</sup> i Rafael Romero<sup>1</sup>

Manuscrit en preparació

<sup>1</sup> Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya



## Resum

El desenvolupament i aplicació de marcadors moleculars específics s'ha demostrat com una estratègia clau per a l'anàlisi cel·lular de processos com l'embriogènesi o la regeneració. En particular, la tècnica de producció d'anticossos monoclonals (mAbs) ha permès al llarg dels anys d'expandir el nombre de marcadors d'aquell tipus en diversos models animals consolidats. En aquest treball mostrem la posada a punt d'un protocol d'immunització de ratolins de la soca Balb/C amb antígens provinents principalment d'embrions de la planària d'aigua dolça *Schmidtea polychroa*, un organisme model emergent pertanyent als Spiralia, amb el qual es va construir una llibreria d'hibridomes productors d'anticossos per a diferents teixits d'aquell organisme. Mostrem, a més, la caracterització espacial i temporal del patró de tinció de tres dels mAbs d'aquella llibreria, els anomenats Nuc i Blast, que detecten poblacions de cèl·lules embrionàries, i del mAb EpEmb que permet visualitzar exclusivament l'epidermis embrionària, un teixit transitori d'origen ectodèrmic present només durant l'etapa primerenca del desenvolupament. Amb l'anàlisi d'aquest marcador es demostra l'origen de l'epidermis embrionària en una població de putatius precursors presents a l'estadi 1 i 2 del desenvolupament, i la seva progressiva substitució per cèl·lules de l'epidermis adulta a partir de l'estadi 3-4. Aquests i d'altres marcadors que es puguin obtenir en el futur seran utilitzats en estudis sobre la morfogènesi de l'embrió per tal d'aprofundir en el coneixement de la biologia de les planàries.





## Introducció

Els trícclads, coneguts habitualment amb el nom de planàries, són considerats un model emergent en el camp de la Biologia del Desenvolupament per la capacitat que presenten de regenerar un individu complet a partir d'un fragment del seu cos i de créixer o decreixer en funció de l'aliment (Saló i col., 2009, Elliot i Sánchez Alvarado, 2013). Les espècies sexuades ofereixen, a més, la possibilitat d'estudiar el desenvolupament embrionari i comparar-lo amb el procés regeneratiu en una mateixa espècie (Martín-Durán i col., 2012b). Darrerament els investigadors han començat a identificar els mecanismes moleculars que regulen les cèl·lules mare somàtiques de l'adult -els neoblasts-, i com té lloc el remodelatge dels teixits, l'organogènesi i el restabliment del patró corporal després d'una amputació (Forsthoefel i Newmark, 2009, Reddien, 2011, Reddien, 2013, Rink, 2013, Roberts-Galbraith i Newmark, 2015), però pocs d'ells s'han encarregat de caracteritzar-ne l'embriogènesi. Els embrions de planària es troben envoltats d'una coberta que és opaca i impermeable, i per tant, són difícils d'accedir i manipular. Tampoc es poden mantenir en cultius "in vitro" ja que necessiten incorporar durant el desenvolupament el material nutricional de les cèl·lules vitel·lines que aporta la mare. Tot i aquests inconvenients, fa poc s'han dut a terme un seguit de treballs que en descriuen el procés a nivell morfològic i molecular a l'espècie *Schmidtea polychroa* (Schmidt, 1861; Cardona i col., 2005, 2006). Aquests estudis han demostrat que els seus embrions presenten una barreja de caràcters derivats -p. e. patró de segmentació dispersa del zigot (Martín-Durán i col., 2012b)- i conservats -p. e. desenvolupament del sistema digestiu i cèl·lules nervioses (Martín-Durán i Romero, 2011, Monjo i Romero, 2015)- amb els que són ancestrals al grup dels Spiralia, que és al qual pertanyen filogenèticament (Giribert i col., 2000, Struck i col., 2014), que fa que siguin idonis per adreçar qüestions sobre l'evolució del fílum.

El desenvolupament embrionari de *S. polychroa* ocorre en càpsules poliembriòniques i s'ha sistematitzat en 8 estadis (Cardona i col., 2005): aquest s'inicia després de que les càpsules són dipositades al medi, quan les cèl·lules vitel·lines més properes als zigots es fusionen formant un sincici vitel·lí on hi té lloc la segmentació, que, com s'ha dit, es dispersa i no segueix el patró espiral de quartets. Els blastòmers resultants, per tant, no mantenen contacte i es disseminen pel sincici (estadi 1), i, en un moment donat, un grup d'ells migren i s'agrupen formant un primordi a partir del qual es desenvoluparan dos estructures, la faringe i l'epidermis embrionàries (estadi 2), que són transitoris i s'encarreguen de limitar l'extensió de l'embrió i engolir el material nutricional extern (estadi 3). Com a conseqüència de la ingesta es forma una cavitat digestiva interna i el sincici es veu progressivament reduït a una banda germinal perifèrica on s'hi divideixen la resta de blastòmers indiferenciats (estadi 4), i, més tard, les cèl·lules embrionàries a partir de les quals s'originaran els primordis dels òrgans i el patró definitiu (estadi 5 i 6). Als darrers estadis es desenvolupen els òrgans i el juvenil adquireix la seva morfologia característica (estadi 7 i 8).

Hom pot caracteritzar els teixits de la planària amb tècniques clàssiques, com les tincions histològiques i la microscòpia òptica i electrònica (Baguña, 2012), o bé amb eines

moleculares més modernes, com les hibridacions “in situ” per gens concrets (Umesono i col. 1997), i les tincions amb anticossos i les lectines (Bueno i col., 1997, Robb i Sánchez Alvarado, 2002, Zayas i col., 2010, Chong i col., 2011). Els anticossos, tan monoclonals com policlonals, permeten nivells de detall i resolució que solen ser superiors a la resta de marcadors i, a més, són fàcils i ràpids d’usar. Els que s’han aplicat en l’estudi de l’embrió de *S. polychroa* estan dissenyats per reconèixer molècules conservades d’altres organismes i reaccionen de manera creuada amb diversos teixits (p. e., l’anti-tubulina acetilada o l’anti-tubulina tirosinada; Cardona i col., 2006), o bé detecten un número molt limitat de tipus cel·lulars, com ara els fotoreceptors de l’ull, subpoblacions de neurones del sistema nerviós, o la musculatura (Cardona, 2005, Martín-Durán i col., 2012a, Monjo i Romero, 2015). Es fa necessari, per tant, obtenir-ne de nous per continuar les investigacions en aquest animal.

La tècnica de la producció d’anticossos monoclonals (mAbs) ha permès expandir el nombre de marcadors cel·lulars i tissulars en altres models animals (Samoilovich i col., 2001, Drukker i col., 2007, Hofbauer i col., 2009, Hadwiger i col., 2010). Els mAbs són immunoglobulines que reconeixen un fragment d’un antigen que anomenem epítop que, en la majoria del casos, es de naturalesa proteica. En condicions “in vitro” són secretats al medi pels hibridomes, que són immortals i provenen de la fusió cel·lular d’un limfòcit B i una cèl·lula mielòmica de la mateixa soca. El procés d’obtenció dels mAbs és llarg i costós, i requereix de la hiperimmunització prèvia d’un animal -habitualment un ratolí de la soca Balb/C- amb l’antigen (o antígens) contra el qual es volen generar i la selecció de la línia d’hibridoma adient (Harlow i Lane, 1999). Les principals avantatges dels mAbs són la seva especificitat, la capacitat d’obtenir-ne un subministrament virtualment il·limitat i la possibilitat que ofereixen de detectar proteïnes desconegudes quan s’usen barreges heterogènies com a immunogen.

En el nostre estudi hem construït una llibreria d’hibridomes productors de mAbs específics per les cèl·lules vitel·lines maternes i la línia somàtica de l’embrió de *S. polychroa* mitjançant la hiperimmunització de ratolins Balb/C amb solucions de proteïnes d’individus adults i de diferents estadis embrionaris. Del total d’anticossos obtinguts se n’han aïllat tres en funció del teixit o tipus cel·lular que detecten i se’n descriu el seu patró de tinció. Aquests i d’altres mAbs es posaran a disposició de la comunitat científica a través del Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa).

## **Materials i Mètodes**

### **Manteniment dels animals i manipulació d’embrions**

Es varen recol·lectar planaries sexuades de l’espècie *S. polychroa* a les poblacions d’Algemesí (València, Espanya) i Sant Celoni (Barcelona, Espanya), i es varen mantenir en les mateixes condicions de laboratori que a Martín-Durán i col·laboradors (2008). Les càpsules embrionàries es van separar de les cubetes dels animals adults després de la seva deposició i es van mantenir a 20°C en plaques de Petri amb una solució d’aigua de Sant

Anton (aigua de l'aixeta:aigua destil·lada, 1:1 en volum). Posteriorment es van fixar amb paraformaldehid 4% (Sigma-Aldrich, P6148) dissolt en tampó fosfat salí (PBS) 1M durant 4 h a 4°C i van ser emmagatzemades a -20°C en etanol del 70% de puresa. Quan va ser necessari, es van dissecar sota la lupa amb l'ajut d'unes pinces fines de rellotger per tal d'alliberar-ne embrions en diferents estadis del desenvolupament.

## Preparació de l'antigen i immunització

S'empraren tres tipus d'immunògens diferents: (G1) solucions de sonicats d'animals adults i regenerants (fragments anteriors, posteriors i laterals, i troncs amb blastemes de regeneració); (G2) solucions de sonicats d'embrions d'estadis primerencs (estadis 1-4) o tardans (estadis 5-8); (G3) solucions de sonicats de cèl·lules vitel·lines i ciclofosfamida (CM), i posterior administració de solucions de sonicats d'embrions d'estadis primerencs (estadis 1-4); aquest tipus d'immunització es dugué a terme amb l'objectiu de reduir la producció d'anticossos contra antigens propis de les cèl·lules vitel·lines de *S. polychroa*.

Les solucions de proteïnes s'obtenien, en els dos primers casos, sonicant en fred amb un aparell Sonifier-B12 (Branson Sonic Power Company) 30-40 embrions o 15-20 fragments d'animals intactes i/o regenerants dissolts en aigua destil·lada, i, en acabat, es valorava la concentració total de proteïna amb la tècnica de Bradford (Harlow i Lane, 1999). S'administraven un cop per setmana durant 6 setmanes 80-100 µg d'aquestes emulsions dissoltes en 200 µl de PBS 1M a ratolins de la soca Balb/C (Charles River Laboratories) de 6-8 setmanes d'edat per via intraperitoneal. Abans de cada injecció s'extreia un petit volum de sang de la cua per tal de mesurar mitjançant la tècnica d'immunoassaig enzimàtic (ELISA; Miles i Hales, 1968) la quantitat d'anticossos presents al sèrum i determinar el grau d'immunització de l'animal. Les dues primeres injeccions sempre eren acompanyades d'adjuvant incomplet de Freund (Sigma-Aldrich, F5506; 1:1 en volum) per tal d'hiperestimular la resposta immunitària a l'animal (protocol esquematitzat a Fig. 1A, G1/G2).

En el cas d'animals tractats amb CM es va seguir una metodologia adaptada del protocol d'immunització subtractiva descrit per Matthew i Sandrock (1987): en primer lloc s'administrava als ratolins 80-100 µg de sonicats de cèl·lules vitel·lines dissoltes en PBS 1M juntament amb coadjuvant incomplet de Freund (1:1 en volum) i 100 µl de CM 1% (Fluka, 19875); l'endemà i el tercer dia s'administrava de nou 100 µl de CM 1% en PBS 1M. Això ens permetia matar selectivament aquells precursors de limfòcits B que estaven reaccionant positivament amb els epítops propis de les cèl·lules vitel·lines; una setmana més tard s'injectaven els sonicats d'embrions d'estadis inicials. Durant la tercera setmana es repetia de nou el procés i en acabat només es subministraven sonicats d'embrions (protocol esquematitzat a Fig. 1A, G3).

Tots aquests tractaments varen ser degudament revisats i aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la UB, i se'ls hi va atorgar el codi de procediment RRB-1.

## **Producció d'anticossos monoclonals**

Per a l'obtenció d'hibridomes productors d'anticossos es va seguir el protocol de fusió cel·lular descrit per Romero i col·laboradors (1991). Quatre dies després de l'última administració es va sacrificar un ratolí degudament immunitzat en una cambra de CO<sub>2</sub>, se li va extreure i dissociar la melsa, i es van barrejar en una suspensió cel·lular limfòcits B provinents d'aquest òrgan i cèl·lules mielòmiques P3/NS1/1-Ag4.1 (NS1; ECACC Cell Lines, 85011427) cultivades *in vitro* al laboratori en una relació de 1 a 3. Tot seguit, a una temperatura constant de 37°C i en agitació, es va anar afegint gota a gota 1ml d'una solució de polietilenglicol 1000 (PEG; Fluka, 81188) dissolt al 50% en medi DMEM (Life Technologies, 11965-092). La barreja de cèl·lules resultants es va cultivar en plaques de cultiu cel·lular de 96 pouets (Sterilin, 3596) amb medi DMEM complementat amb solució HAT (Life Technologies, 21060-017) durant 10-14 dies; el suplement HAT conté aminopterina i només permet el creixement d'aquelles cèl·lules que s'han fusionat correctament, és a dir, d'hibridomes (Harlow i Lane, 1999). A partir del dia 15 es va anar substituint progressivament aquesta solució per medi DMEM complementat amb hipoxantina (14 µg/ml), timidina (19 µg/ml) i glicina (1,12 µg/ml) per tal d'afavorir el creixement dels hibridomes supervivents, i es va monitoritzar la producció d'anticòs de cadascun dels pouets mitjançant la tècnica d'ELISA. Aquells pous que contenien una quantitat suficient d'anticòs eren seleccionats per analitzar-ne amb la tècnica d'immunolocalització el patró de tinció sobre seccions d'embrions, i, finalment, dels potencialment interessants se n'aïllava l'hibridoma productor per dilució límit (mínim 3 rondes successives de clonatge a 1 cèl·lula/pou), s'amplificava en una placa de Petri per a cultiu cel·lular per obtenir-ne l'anticòs monoclonal (mAb) i se'n congelaven al·lotes en nitrogen líquid.

## **Purificació i isotipatge del anticossos monoclonals**

Es va determinar l'isotip i la subclasse dels anticossos monoclonals amb el "IsoQuick kit for mouse monoclonal isotyping" (Sigma-Aldrich, ISOQ5-1KT). Quan va ser necessari, els sobrenedants es van concentrar amb columnes de tipus Amicon Ultra (Merck Millipore, UFC910008), i es va purificar els anticossos tipus IgG amb columnes de purificació amb proteïna A (Sigma-Aldrich, PURE1A-1KT).

## **Nomenclatura dels anticossos monoclonals**

Inicialment es van identificar els anticossos amb un codi de lletres i coordenades en funció del tipus de fusió i el pou del qual provenien; per exemple, AD1(1A1) seria un anticòs provinent de la primera fusió on s'usà com a immunogen una solució de sonicats de planàries adultes -AD1-, i que té el seu origen en un hibridoma localitzat al pou A1 de la primera placa. Més endavant, pels mAbs caracteritzats, s'usà una nomenclatura basada en les inicials del tipus de teixits o estructura cel·lular que detectaven.

## Immunohistoquímica

La tècnica d'immunohistoquímica (o immunolocalització) colorimètrica en seccions d'embrions i animals adults es va dur a terme tal com es descriu a Bueno i col·laboradors (1997), emprant diamminobenzidina tetrahydroclorit 0,3 mg/ml (DAB; Sigma-Aldrich, D5905) com a substrat; aquest producte, en precipitar, adquireix una tonalitat marró. En ocasions, per millorar la resolució de la tinció, es va afegir a la solució de detecció sulfat amònic de níquel 2 mg/ml que dota al precipitat d'una coloració blavosa. Per a les immunohistoquímiques fluorescents *in toto* i en seccions histològiques es va seguir el protocol descrit per Cardona (2005).

Els anticossos primaris es van aplicar a les següents concentracions: mAbs generats en aquest estudi, 1/2-1/50, en funció de la concentració i puresa de l'anticòs; anti-beta-catenina-2 (anti- $\beta$ cat2), un marcador específic de l'epiteli de la planària adulta (Chai i col., 2010), i anti-serotonina (anti-5HT; Sigma-Aldrich, S5545), 1/1000; anti-histona H3 fosforilada (anti-H3p; Upstate), 1/5000.

## Processament d'imatges

Les tincions colorimètriques i fluorescents de les seccions histològiques van ser observades amb un microscopi Zeiss Axiophot equipat amb una càmera fotogràfica digital Leica DFC300FX o amb un microscopi confocal Leica TCS-SP2. Les tincions fluorescents *in toto* van ser observades amb una lupa Leica model MZ16F equipada amb una càmera Jenoptik model ProgRes®C3. En cadascun d'aquests aparells es van obtenir imatges representatives de les mostres que varen ser analitzades i processades amb els programes informàtics Adobe Illustrator, Adobe Photoshop i Fiji (Schindelin i col. 2012).

## Resultats

### Producció d'anticossos monoclonals

Els estudis Romero i col·laboradors (1991), i Bueno i col·laboradors (1997) havien aplicat anys enrere la tècnica de fusió cel·lular per produir mAbs contra teixits de l'adult de la planària *Dugesia tigrina*. Tot i que el nostre objectiu era generar anticossos contra teixits de l'embrió, inicialment es va seguir l'estratègia d'aquells autors d'immunitzar els ratolins amb solucions de proteïnes d'adults i regenerants per posar a punt la metodologia a *S. polychroa* (Fig. 1A, grup G1). Un cop assolit l'objectiu, es va optimitzar el protocol per a solucions de proteïnes provinents d'embrions en desenvolupament (Fig. 1A, grup G2), però, després de les primeres fusions, vàrem observar que s'obtenien una gran quantitat d'anticossos que marcaven cèl·lules vitel·lines i pocs d'específics per tipus cel·lulars de l'embrió. Per tal de superar aquest problema vam adaptar el protocol d'immunització subtractiva (o immunosupressió) amb Ciclofosfamida (CM) descrit a Matthew i Sandrock (1987) per a antígens provinents de les cèl·lules vitel·lines i, posteriorment, vam hiperimmunitzar els

ratolins amb proteïnes provinents d'embrions primerencs (Fig. 1A, grup G3). En total es van dur a terme 15 fusions cel·lulars (Fig. 1B): en les del tipus G1 i G2 s'obtingué un alt nombre d'hibridomes, però amb el grup G3 mai es va superar el 10% de pous amb cèl·lules viables en les plaques de cultiu. L'anàlisi quantitatiu i qualitatiu dels pouets evidencià que en la majoria s'estava produint un alt nivell d'anticòs i que aquests reconeixien una barreja heterogènia de teixits i/o tipus cel·lulars en animals adults i en embrions (Fig. 1B). Se'n va seleccionar tres d'ells, aquells que l'especificitat del marcatge feia pensar que podien ser escaients per estudis descriptius, per tal de dur-ne l'hibridoma fins la monoclonalitat i aprofundir en la caracterització de l'anticòs que estava generant.

### **L'anticòs monoclonal Nuc**

L'hibridoma productor d'aquest anticòs es va detectar per primer cop en el pou CM2(4C5), pertanyent a una fusió del grup G3; aquest pou presentava només 3 clons, el que va facilitar-ne l'aïllament per dilució límit. L'anticòs monoclonal Nuc és una immunoglobulina IgM de cadena lleugera "kappa", i el seu nom definitiu prové de l'estructura cel·lular que estava reconeixent, ja que detectava un epítip d'un antigen que es trobava en nuclis de diversos tipus cel·lulars en embrions (Fig. 2) i animals adults (Fig. 3).

El mAb Nuc es detectava al llarg de tot el desenvolupament embrionari de la planària *S. polychroa*: després de les primeres divisions del zigot tenia els nuclis de la majoria de blastòmers (Fig. 2A, 2A'); més endavant, quan alguns dels blastòmers es comencen a dispersar dins del sincici format per la fusió de les cèl·lules vitel·lines (Cardona i col., 2005), marcava tant els que estaven isolats com els que quedaven agregats conformant el primordi de la faringe i l'epidermis embrionàries (Fig. 2B, 2B'). A l'estadi 2 també tenia cèl·lules dels teixits transitoris (Fig. 2C, 2C'). En els estadis següents, mentre l'embrió ingereix les cèl·lules vitel·lines que romanen al seu voltant (Cardona i col., 2005), el mAb detectava nuclis de cèl·lules embrionàries de la banda germinal, que cada cop eren més nombroses (Fig. 2D, 2F), i de cèl·lules de l'epidermis embrionària (Fig. 2G). Finalment, durant el desenvolupament tardà, el mAb Nuc es localitzava en les cèl·lules del parènquima (Fig. 2E), que són les que donaran lloc als òrgans de l'individu juvenil (Cardona i col., 2005).

En organismes adults sexuats, el mAb Nuc tenia el nucli d'un gran nombre de tipus cel·lulars diferents, tant somàtics com germinals: podíem localitzar-ne el marcatge en el sistema nerviós (Fig. 3B), digestiu (Fig. 3C) i reproductor (Fig. 3D), així com en cèl·lules de l'epidermis (Fig. 3E), la faringe (Fig. 3F), en espermatogònies i espermatozous (Fig. 3G), i en neoblasts (Fig. 3G). Tot i aquesta localització ubiqüa, l'antigen que reconeix el mAb no estava present en totes les cèl·lules de la planària (Fig. 3F').

### **L'anticòs monoclonal Blast**

Aquest anticòs monoclonal provenia d'un clon del pou EP1(2G5), és a dir, d'un hibridoma que es va sintetitzar en la primera fusió de la classe G2. Per aïllar-lo van caler 7 rondes de clonatge per dilució límit. L'isotipatge va determinar que es tractava, al igual que el



mAb Nuc, d'una immunoglobulina IgM de cadena lleugera "kappa", i el seu nom ve derivat del mot "blastòmer", ja que inicialment es va determinar que detectava aquest tipus cel·lular en seccions d'embrions; l'epítot que reconeix aquest mAb estava present al citoplasma (Fig. 4, Fig. 5).

El mAb Blast tenia blastòmers en embrions d'estadi 1 (Fig. 4A), i, més endavant, i de manera semblant al mAb Nuc, el primordi de la faringe i epidermis embrionàries i blastòmers isolats del sincici (Fig. 4B). A l'estadi 2 continuava detectant aquestes cèl·lules i també la faringe embrionària, que ja s'ha diferenciat completament (Fig. 4C), i un número creixent de cèl·lules de la banda germinal en embrions més tardans (Fig. 4E, 4F, 4H, 5A, 5B). La tinció a la faringe embrionària era transitòria i restringida als estadis en que tenia lloc la seva formació; a l'estadi 3 el mAb Blast ja no es detectava en aquest òrgan (Fig. 4E').

En els estadis primerencs els blastòmers eren arrodonits i aparentment molt vacuolitzats, i tenien una grandària considerable, semblant a la del zigot (Fig. 4D, 4D'). En comparació, les cèl·lules embrionàries eren més petites, ovoides i no vacuolitzades (Fig. 4F'), s'agrupaven en clústers i presentaven projeccions del citoplasma que contactaven amb les d'altres del voltant (Fig. 4F, 4F', 4G). A l'estadi 4, algunes d'aquestes cèl·lules es trobaven en proliferació (Fig. 4G). A mesura que l'embrió progressa, els clústers contenien més cèl·lules (Fig. 4H'), i s'observava la presència d'unes cèl·lules allargades semblants a cèl·lules musculars en formació (Fig. 4H''). En embrions d'estadi 5 tardà, la majoria de les cèl·lules de la banda germinal estaven interconnectades per projeccions citoplasmàtiques (Fig. 5B, 5B'), i l'antigen que reconeix el mAb Blast estava present tant en cèl·lules embrionàries en divisió (Fig. 5D), com en cèl·lules diferenciades de tipus neuronal (Fig. C) o putatives musculars (Fig. 5B'), i al primordi de la faringe definitiva (Fig. 5A'). Tot i així, en els últims estadis embrionaris el mAb Blast canviava radicalment la seva localització, i no es detectava al parènquima ni en cap òrgan intern (Fig. 5E), i només tenia l'epidermis definitiva que s'estava acabant de formar (Fig. 5F, 5F').

## **L'anticòs monoclonal EpEmb**

Per últim, l'anticòs monoclonal EpEmb prové d'un hibridoma obtingut en una fusió del grup G2, en concret del pou EP5(2E5). Aquest pou contenia 4 clons i van caler 8 rondes de clonatge per aïllar-lo. L'anticòs es va identificar en una immunohistoquímica colorimètrica sobre seccions d'embrions d'estadi 4 i 5, on tenia específicament l'epidermis embrionària (Fig. 6 i 7). En aquest cas, l'isotipatge va determinar que es tractava d'una immunoglobulina IgG<sub>1</sub> de cadena lleugera kappa.

El mAb EpEmb es detectava per primer cop en embrions d'estadi 1, al citoplasma d'una subpoblació dels blastòmers derivats del zigot (Fig. 6A, 6A'). Aquesta tinció es mantenia en alguns dels blastòmers dispersos pel sincici (Fig. 6C), i en cèl·lules de la regió del primordi de la faringe i epidermis embrionàries (Fig. 6B), que adoptaven una morfologia fusiforme (Fig. 6B'). En aquest estadi, l'anticòs també detectava les primeres cèl·lules de l'epidermis embrionària (Fig. 6D). Inicialment es trobaven distribuïdes a l'atzar per la superfície del sincici, però, a l'estadi 2 acabaven recobrint-lo completament amb una

monocapa (Fig. 6E). Les cèl·lules epitelials són poc nombroses i molt allargades (Fig. 6E') i el mAb EpEmb en detectava l'epítop d'un antígen present a la membrana cel·lular (Fig. 6D, 6E'). Aquest anticòs també tenia l'epiteli extern de la faringe embrionària que està compost per quatre cèl·lules que en delimiten la seva obertura (Fig. 7A, 7A').

A l'estadi 3, l'epidermis embrionària i de la faringe han desenvolupat cilis (Fig. 7A, 7A', 7B). En l'epidermis embrionària, els cilis adquirien la llargària i densitat màxima a l'estadi 4 (Fig. 7C); a partir d'aquest moment, però, el teixit ja no embolcallava totalment l'embrió (Fig. 7A). De tant en tant es troben petites zones circulars on no hi havia marcatge i al voltant de les quals la ciliació era més densa (Fig. 7A, 7B). Aquest patró es reproduïa en embrions d'estadis més tardans, on s'observava un nombre cada cop major d'aquestes regions sense tinció. Immunohistoquímiques fluorescents en seccions histològiques mostraren que, en ocasions, en aquests llocs s'hi localitzaven cèl·lules que estaven adherides a l'exterior de la banda germinal (Fig. 7D). A partir de l'estadi 5 es pot observar l'aparició de les primeres cèl·lules de l'epidermis definitiva, ja que són immunoreactives per a l'anticòs anti- $\beta$ -catenina-2 (Fig. 7E); aquestes es trobaven a la superfície de l'embrió (Fig. 7E) i substituïen d'una manera més o menys homogènia l'epidermis embrionària. Des de l'estadi 5 fins a l'estadi 7 el mAb EpEmb permetia visualitzar com retrocedia progressivament la cobertura del teixit transitori; a l'estadi 7 en detectava només un romanent a la regió dorsal-posterior (Fig. 7F, 7F'). En juvenils i regenerants el mAb no detectava cap tipus cel·lular, ni parenquimàtic ni epitelial.

## Discussió

### Anticossos monoclonals i desenvolupament embrionari

Els animals model emergents requereixen d'eines moleculars específiques, com per exemple els mAbs, per caracteritzar a fons la seva estructura cel·lular durant processos com el desenvolupament embrionari o la regeneració. Al llarg dels anys s'han generat col·leccions de mAbs per diferents estadis del cicle vital d'un gran nombre d'organismes (per exemple Samoilovich i col., 2001, Drukker i col., 2007, Hofbauer i col., 2009, Hadwiger i col., 2010). Pel que fa als trícclads, aquesta metodologia només s'havia aplicat a l'embrió d'una espècie de macrostòmida (Ladurner i col., 2005), i els individus adults i regenerants d'algunes planàries d'aigua dolça (Romero i col., 1991, Shirakawa i col., 1991, Shinozawa i col., 1995, Bueno i col., 1997, Moritz i col., 2012, Forsthoefel i col., 2014, Ross i col., 2015). En el nostre estudi hem desenvolupat per primer cop un protocol de producció d'hibridomes generadors d'anticossos pels embrions de *S. polychroa*; les diferents estratègies d'immunització dels ratolins han permès obtenir marcadors que reconeixen una gran varietat de teixits (Fig. 1), sobre tot en embrions (Figs. 2, 4-7), però també en individus adults (Fig. 3). Tot i que per qüestions de temps només hem dut a la monoclonalitat aquells que amb més immediatesa ens podien ajudar a respondre qüestions relacionades amb processos d'organogènesi en embrions, la resta de línies cel·lulars es troben emmagatzemades i poden servir com a punt d'inici per a generar més anticossos específics.

La tècnica d'immunosupressió amb CM indueix tolerància immunitària als ratolins contra antigens ubics i estimula l'obtenció d'anticossos contra antigens rars o poc immunogènics (Matthew i Sandrock, 1987). En el nostre cas ha permès produir anticossos altament específics per tipus cel·lulars somàtics de l'embrió de *S. polychroa*, com ara cèl·lules dels sistema nerviós i subpoblacions de cèl·lules embrionàries i neoblasts, i ha reduït dràsticament el de cèl·lules vitel·lines. Aquesta estratègia també ha provocat un efecte no tan desitjat de disminució del nombre total d'hibridomes per fusió: mentre que en els grups G1 i G2 s'observava al menys un 70% de pous amb cèl·lules en les plaques de cultiu, en el grup G3 aquest valor baixa fins al 10% (Fig. 1B). La CM és una droga que a una altra concentració té efectes tòxics en l'organisme (Carroll i col., 2008, Cole i col., 2014), i que en medicina clínica s'usa rutinàriament per a tractar càncers i malalties autoimmunes, entre d'altres (Brodsky, 2002, Sistigu i col., 2011, Bezu i col., 2015). Els ratolins a qui vam administrar la toxina no presentaven signes de deteriorament físic, tot i que no es pot descartar que tinguessin afectacions fisiològiques i/o orgàniques greus més enllà de les buscades. Un excés de CM podria ser, per tant, el motiu de que s'hagin obtingut poques cèl·lules viables en les fusions del grup G3. En el futur s'haurà de considerar aquesta circumstància si es vol augmentar el nombre d'hibridomes produïts amb aquest protocol.

### **Els anticossos Nuc i Blast detecten diferents subpoblacions de blastòmers i cèl·lules embrionàries**

Dos dels marcadors moleculars que hem generat, el mAb Nuc i Blast, detecten epítops d'antígens amb localitzacions subcel·lulars diferents però amb patrons globals similars - blastòmers, òrgans transitoris i parènquima embrionari- (Fig. 2, 4, 5). Els blastòmers de *S. polychroa* són arrodonits i de mida gran, i presenten vacuoles al citoplasma i cossos cromatòids al voltant del nucli (Cardona, 2005, Cardona i col., 2006); a mesura que es van dividint i comencen a diferenciar-se en els precursors dels teixits que compondran el juvenil es van fent més petits i la seva forma es va tornant irregular i lobulada (Cardona i col., 2006). El marcatge citoplasmàtic del mAb Blast permet visualitzar aquests canvis morfològics i els que es donen en una població de cèl·lules embrionàries quan adquireixen la identitat definitiva (Fig. 4, 5). El mAb Nuc reconeix la major part del parènquima embrionari quan hi té lloc la proliferació i diferenciació dels progenitors (Martín-Durán i col., 2012b), i probablement també tenyeix cèl·lules en diferenciació. En organismes adults el mAb Blast no s'hi detecta (no mostrat) i el mAb Nuc hi reconeix neoblasts i cèl·lules de diversos òrgans (Fig. 3). Així doncs, tot i que no sabem fins a quin punt colocalitzen, ambdós anticossos identifiquen línees cel·lulars somàtiques de l'embrió transitori i definitiu, i podrien servir per aclarir algunes particularitats de l'embriogènesi d'aquests animals. Per exemple, sabem que els nuclis de les cèl·lules vitel·lines que s'han fusionat per formar el sincici es mantenen actius i es divideixen de manera sincrònica fins a l'estadi 4; la seva ultraestructura apunta a una funció associada a la producció de determinants materns i morfògens durant aquests estadis (Cardona i col., 2006). Tot i que hi ha un cert consens sobre el destí d'aquests nuclis, que és acabar degenerant i ser reabsorbits (Koscielski, 1966, Cardona i col., 2006), alguns autors defensen

que en realitat són capaços de cel·lularitzar-se amb els romanents de la membrana del sincici i que podrien contribuir a la formació de l'embrió definitiu (le Moigne, 1963). Monitoritzar la línia somàtica amb els dos mAbs, i les cèl·lules vitel·lines amb els anticossos que n'hem generat ens permetria determinar si veritablement existeix una línia cel·lular materna a la banda germinal o al parènquima del juvenil. A més, els mAbs Nuc i Blast es podrien usar per marcar i aïllar amb la tècnica de FACS blastòmers i cèl·lules embrionàries de diferents estadis, i després establir-ne el seu perfil molecular mitjançant la seqüenciació del transcriptoma. Tradicionalment aquesta metodologia s'ha associat amb la utilització d'anticossos que reconeixen antigens de membrana, però darrerament s'ha vist que també és possible obtenir ARN d'alta qualitat combinant el FACS amb marcadors intracel·lulars i fixacions cel·lulars suaus (Hrvatín i col., 2014). La comparació entre les dades dels embrions i els perfils que s'han reportat pels neoblasts i els seus descendents (Wagner i col., 2012, van Wolfswinkel i col., 2014) permetria aprofundir en la qüestió de l'origen dels neoblasts i les relacions entre l'embriogènesi i la regeneració.

### **La formació i recanvi de l'epidermis embrionària en tríclads**

L'epidermis embrionària (o primària) és l'òrgan transitori de l'embrió primerenc dels tríclads que embolcalla el sincici vitel·lí i els blastòmers indiferenciats (Martín-Durán i col., 2012b). La seva formació s'ha descrit amb anterioritat a les espècies *Bdellocephala brunnea* (Sakurai i Ishii, 1995), *Polycelis tenuis* (Skaer, 1965), i *S. polychroa* (Cardona i col., 2005, 2006) amb l'ajuda d'eines de microscòpia òptica i electrònica, i alguns marcadors moleculars no específics. El procés s'inicia després de les primeres divisions del zigot, quan s'ha assolit un cert nombre de blastòmers, i uns pocs d'ells constitueixen el primordi a partir del que es desenvoluparan tant l'epidermis com la faringe embrionària. Tot seguit, a *B. brunnea* les primeres cèl·lules epidèrmiques emergeixen per l'obertura de la faringe embrionària, mentre que a *S. polychroa* s'obren camí a través de la membrana sincicial, permetent que es continuïn fusionant cèl·lules vitel·lines a les zones que no han estat recobertes. Aquelles cèl·lules es van estenent fins a l'extrem oposat del sincici en un moviment que es coneix com a epibòlia inversa, i, a l'estadi 2 cobreixen completament el rudiment de l'embrió. En aquets punt, a *S. polychroa* es considera que l'epidermis embrionària és un epiteli veritable perquè ja ha desenvolupat cilis i té una membrana basal; en altres tríclads aquestes estructures apareixen més tard (Skaer, 1965). El patró d'immunolocalització del mAb EpEmb confirma algunes d'aquestes troballes, com ara l'origen dels putatius precursors (una subpoblació de blastòmers; Fig. 6) i el recobriment total del sincici a l'estadi 2 (Fig. 6E). Tot i així, el fet de que en embrions d'estadi 4 la ciliació epitelial sigui més abundant i allargada que en els d'estadi 2-3 (Fig. 7B, 7C) suggereix que la seva maduració no és complerta fins aquell moment. La diferència més important, però, entre el model proposat i les nostres dades rau en la distribució dels progenitors i el lloc de formació de les cèl·lules epitelials: la tinció amb l'anticòs indica que la progènie de l'epidermis es localitza a la regió del primordi i en una subpoblació de cèl·lules migrants (Fig. 6A-D), i que aquests precursors van adquirint la morfologia definitiva després de migrar i inserir-se en diferents punts de la superfície del

sincici (Fig. 6B', 6D). Així, aquests resultats confirmen i complementen les observacions preliminars a *S. polychroa* de Cardona i col·laboradors (2006), i obren la porta a caracteritzar a nivell molecular el mateix procés en altres trícclads.

Pel que fa al recanvi epitelial, Tyler i Tyler (1997) suggereixen, basant-se en dades de *B. brunnea* (Sakurai i Ishii, 1995), *P. tenuis* (Skaer, 1965) i diverses espècies paràsites, un model en el que participen tres teixits diferents: l'epidermis primària, que, tal com acabem de comentar, té l'origen en una subpoblació de blastòmers, i l'epidermis secundària i la terciària, que són les úniques ciliades i es desenvolupen a partir de cèl·lules indiferenciades del parènquima embrionari; en aquest model l'epidermis terciària es correspon a la definitiva del juvenil. Estudis posteriors efectuats per Cardona i col·laboradors (2005) indiquen que a *S. polychroa* només existeixen dos tipus epitelials, el primari, que ja és ciliat, i el que Tyler i Tyler (1997) identifiquen com a terciari o definitiu, i assenyalen que les cèl·lules de l'epidermis secundària en realitat romanen al parènquima embrionari i són les precursoras dels protonefridis, els òrgans del sistema excretor. A l'estadi 4 s'inicia el recanvi per un mecanisme de migració i d'intercalació dels precursors entre les cèl·lules preexistents. Les nostres dades s'adiuen amb el que proposen Cardona i col·laboradors (2005), però apunten a que el procés ja comença en embrions d'estadi 3: en aquest estadi el marcatge epitelial del mAb EpEmb és discontinu (Fig. 7A, 7B), i en els punts on no hi ha epidermis embrionària s'observen cèl·lules amb una morfologia arrodonida (Fig. 7D). Més tard, a l'estadi 5, les cèl·lules que es troben a les regions sense marcatge adquireixen la identitat de cèl·lula epidèrmica definitiva, tal com il·lustra la tinció amb l'anticòs anti- $\beta$ -catenina-2 (Fig. 7E). Encara que no hem pogut identificar quin tipus de cèl·lules són les de l'estadi 3 la nostra hipòtesi és que es corresponen als primers progenitors del l'epidermis definitiva que ja haurien travessat la membrana de la banda germinal.

L'absència de marcatge del mAb EpEmb en regions cada cop més grans a partir de l'estadi 5 indica que el bescanvi entre el teixit embrionari i el definitiu es fa efectiu en el moment en que finalitza la ingesta de les cèl·lules vitel·lines. En un principi aquest recanvi es dona d'una manera més o menys homogènia per tota la superfície, però la presència de romanents d'epidermis embrionària a la regió dorsal-posterior en embrions d'estadi 7 (Fig. 7F, 7F') suggereix que durant el desenvolupament tardà segueix un patró definit d'anterior a posterior i de ventral a dorsal. Ara, quin podria ser el motiu que explicaria aquesta dinàmica? És obvi que, en tot moment, al medi poden haver-hi accidents que malmetin la coberta de la càpsula i forcin la sortida prematura dels embrions. En aquests casos, només aquells que han assolit l'estadi 5-6 són capaços de sobreviure perquè disposen de l'aliment necessari i tenen una mínima maduresa estructural (le Moigne, 1966, Cardona, 2005), però els caldrà temps per acabar de formar-se del tot -els sistema digestiu, el visual o el nerviós, entre d'altres, no assoleixen la morfologia definitiva fins a l'estadi 7 o més endavant (Martín-Durán i Romero, 2011, Martín-Durán i col., 2012a, Monjo i Romero, 2015). L'epidermis ventral és imprescindible per a la locomoció de les planàries (Rieger i col., 1991). Tenir un epiteli ventral ben desenvolupat a l'estadi 5-6 pot ser evolutivament favorable en cas de donar-se un accident com el que hem presentat perquè permetria a l'embrió immadur desplaçar-se a racons més protegits i completar allà la seva morfogènesi. Hipotetitzem que la pressió

selectiva que exerceix aquest factor ecològic pot haver dut a l'establiment del patró de recanvi de l'epidermis transitòria que s'observa en l'embrió tardà.

## Conclusions

En aquest treball hem demostrat que l'ús d'embrions de *S. polychroa* com a immunogen permet obtenir nous marcadors moleculars per a la seva línia somàtica i per a les cèl·lules vitel·lines maternes. Amb el mAb EpEmb, que és uns dels que s'ha dut a la monoclonalitat des de la llibreria d'hibridomes, hem determinat que la formació de l'epidermis primària té lloc entre l'estadi 1 i 2 mitjançant la migració i inserció a diversos punts de la superfícies del sincici d'un grup de blastòmers, i que el seu recanvi s'inicia a l'estadi 3 i segueix un patró antero-posterior i ventro-dorsal durant el desenvolupament tardà. Per a continuar avançant en el coneixement dels mecanismes moleculars que regulen aquest i d'altres processos caldrà identificar les proteïnes que reconeixen els mAbs amb tècniques proteòmiques com ara el crivellatge de llibreries d'expressió o la immunoprecipitació i la seqüenciació amb espectrometria de masses. El nostre estudi suposa un exemple esclaridor de com la generació d'eines immunològiques ajuda a comprendre millor el desenvolupament embrionari d'organismes model emergents i pot servir de guia per a temptatives semblants en altres espècies de platihelminth.

## Bibliografia

- Baguñà, J., 2012. The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 19-37.
- Bezu, L., Gomes-de-Silva, L. C., Dewitte, H., Breckpot, H., Fucikova, J., Spisek, R., Galluzzi, L., Klepp, O., Kroemer, G., 2015. Combinatorial strategies for the induction of immunogenic cell death. *Front. Immunol.* 6:187.
- Brodsky, R. A., 2002. High dose cyclophosphamide treatment for autoimmune disorders. *Scientific World Journal* 28, 1808-1815.
- Bueno, D., Baguñà, J., Romero, R., 1997. Cell-, tissue-, and position-specific monoclonal antibodies against the planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*. *Histochem. Cell Biol.* 107, 139-149.
- Cardona, A., 2005. The embryonic development of the planarian *Schmidtea polychroa* using molecular markers. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Cardona, A., Hartenstein, V., Romero, R., 2005. The embryonic development of the triclad *Schmidtea polychroa*. *Dev. Genes Evol.* 215, 109-131.
- Cardona, A., Hartenstein, V., Romero, R., 2006. Early embryogenesis of planaria: a cryptic larva feeding on maternal resources. *Dev. Genes Evol.* 216, 667-681.
- Carroll, N., Keshava, N., Cimino, M., Chu, M., Dearfield, K., Keshava, C., Kligerman, A., Owen, R., Protzel, A., Putzrath, R., Schoeny, R., 2008. An evaluation of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study: Cyclophosphamide. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 117-131.

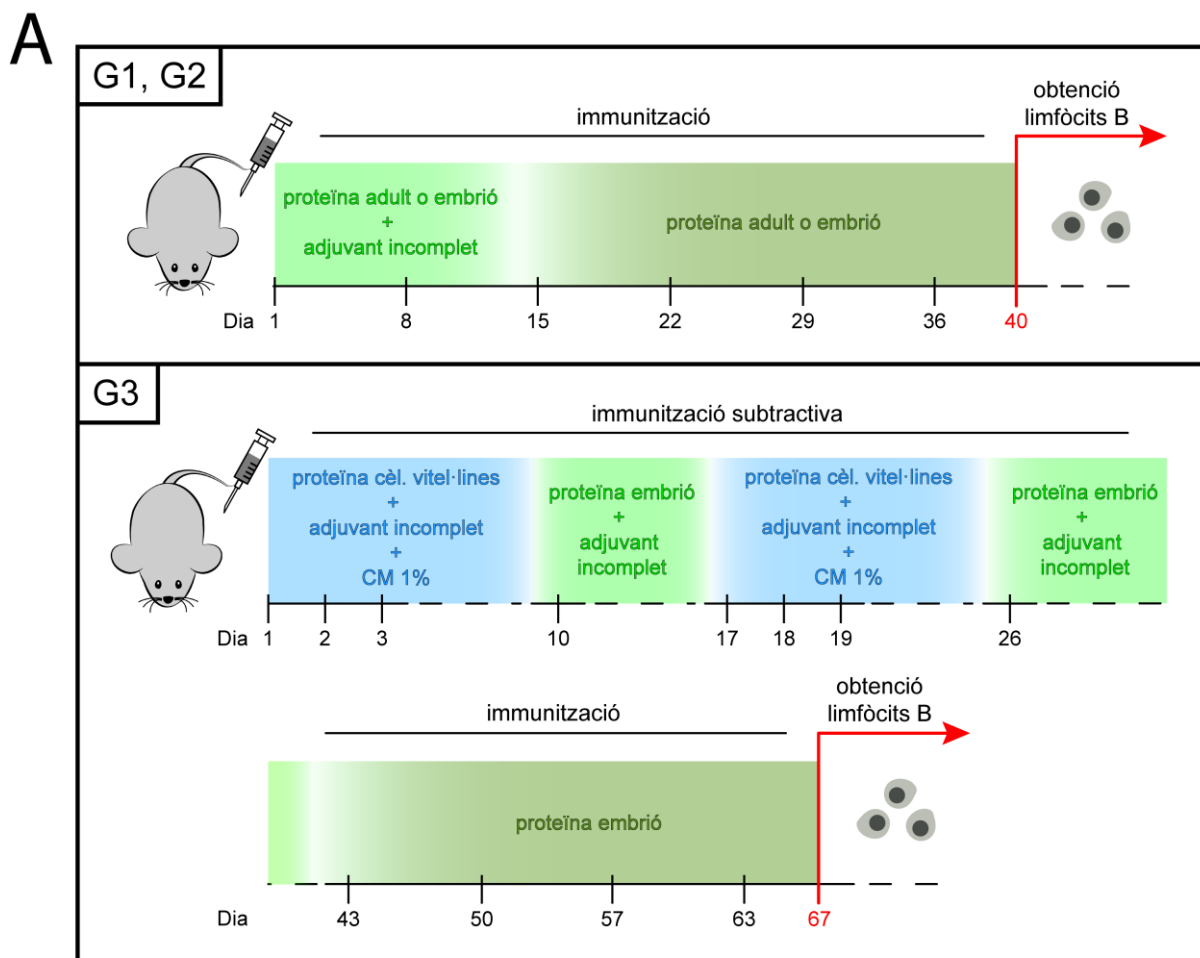
- Chai, G., Ma, C., Bao, K., Zheng, L., Wang, X., Sun, Z., Salò, E., Adell, T., Wu, W., 2010. Complete functional segregation of the planarian beta-catenin-1 and -2 in mediating Wnt signaling and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 285, 24120-24130.
- Chong, T., Stry, J. M., Wang, Y., Newmark, P. A., 2011. Molecular markers to characterize the hermaphroditic reproductive system of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *BMC Dev. Biol.* 11:69.
- Cole, S. D., Madren-Whalley, J. S., Li, A. P., Dorsey, R., Salem, H., 2014. High content analysis of an *in vitro* model for metabolic toxicity: results with the model toxicants 4-aminophenol and cyclophosphamide, *J. Biomol. Screen.* 19, 1402-1408.
- Drukker, M., Muscat, C., Weissman, I. L., 2007. Generation of monoclonal antibody library against human embryonic stem cells. *Methods Mol. Biol.* 407, 63-81.
- Elliot, S. A., Sánchez Alvarado, A., 2013. The history and enduring contribution of planarians to the study of animal regeneration. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2, 301-326.
- Forsthoefel, D. J., Waters, F. A., Newmark, P. A., 2014. Generation of cell type-specific monoclonal antibodies for the planarian and optimization of sample processing for immunolabeling. *BMC Dev. Biol.* 14:45.
- Forsthoefel, D. J., Newmark, F. A., 2009. Emerging patterns in planarian regeneration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 412-420.
- Giribert, G., Distel, D. L., Polz, M., Sterrer, W., Wheeler, W. C., 2000. Triploblastic relationships with emphasis on the acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cycliophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: a combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* 49, 539-562.
- Hadwiger, G., Dour, S., Arur, S., Fox, P., Nonet, M. L., 2010. A monoclonal antibody toolkit for *C. elegans*. *PLoS One* 5:e10161.
- Harlow, E., Lane, D., 1999. *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor.
- Hofbauer, A., Ebel, T., Walternspiel, B., Oswald, P., Chen, Y. C., Halder, P., Biskup, S., Lewandrowski, U., Winkler, C., Sickmann, A., Buchner, S., Buchner, E., 2009. The Wuerzburg hybridoma library against *Drosophila* brain. *J. Neurogenet.* 23, 78-91.
- Hrvatin, S., Deng, F., O'Donnell, C. W., Gifford, D. K., Melton, D. A., 2014. MARIS: method for analyzing RNA following intracellular sorting. *PLoS One* 9:e89459.
- Koscielski, B., 1966. Cytological and cytochemical investigations on the embryonic development of *Dendrocoelum lacteum* O. F. Müller. *Zool. Pol.* 16, 83-102.
- Ladurner, P., Pfister, D., Seifarth, C., Schärer, L., Mahlkecht, M., Salvenmoser, W., Gerth, R., Marx, F., Rieger, R., 2005. Production and characterization of cell- and tissue-specific monoclonal antibodies for the flatworm *Macrostomum* sp. *Histochem. Cell. Biol.* 123, 89-104.
- Le Moigne, A., 1963. Etude du développement embryonnaire de *Polycelis nigra* (Turbellarié, Triclade). *Bull. Soc. Zool. Fr.* 88, 403-422.
- Le Moigne, A., 1966. Etude du développement embryonnaire et recherches sur les cellules de régénération chez l'embryon de la Planaire *Polycelis nigra* (Turbellarié, Triclade). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 15, 39-60.
- Martín-Durán, J. M., Duocastella, M., Serra, P., Romero, R., 2008. New method to deliver exogenous material into developing planarian embryos. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 310, 668-681.
- Martín-Durán, J. M., 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., Romero, R., 2012a. Morphological and molecular development of the eyes during embryogenesis of the freshwater planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev. Genes Evol.* 222, 45-54.
- Martín-Durán, J.M., Monjo, F., Romero, R., 2012b. Planarian embryology in the era of comparative developmental biology. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 39-48.
- Matthew, W. D., Sandrock, A. W. Jr., 1987. Cyclophosphamide treatment used to manipulate the immune response for the production of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 100, 73-82.
- Miles, L. E. M., Hales, C. N., 1968. Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature*, 219, 186-189.
- Monjo, F., Romero, R., 2015. Embryonic development of the nervous system in the planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev. Biol.* 397, 305-319.
- Moritz, S., Stöckle, F., Ortmeier, C., Schmitz, H., Rodríguez-Esteban, G., Key, G., Gentile, L., 2012. Heterogeneity of planarian stem cells in the S/G2/M phase. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 117-125.
- Reddien, P. W., 2011. Constitutive gene expression and the specification of tissue identity in adult planarian biology. *Trends Genet.* 27, 277-285.
- Reddien, P. W., 2013. Specialized progenitors and regeneration. *Development* 140, 951-957.
- Rieger, R. M., Tyler, S., Smith III, J. P. S., Rieger, G. E., 1991. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. volum 3: *Platyhelminthes and Nemertinea*, capítulo Platyhelminthes: Turbellaria, 7-140. Wiley-Liss, Inc., Nova York.
- Rink, J. C., 2013. Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev. Genes Evol.* 223, 67-84.
- Robb, S. M., Sánchez Alvarado, A., 2002. Identification of immunological reagents for use in the study of freshwater planarians by means of whole-mount immunofluorescence and confocal microscopy. *Genesis* 32, 293-298.
- Roberts-Galbraith R. H., Newmark, P. A., 2015. On the organ trail: insights into organ regeneration in the planarian. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 37-46.
- Romero, R., Fibla, J., Bueno, D., Sumoy, L., Soriano, M., Baguñà, J., 1991. Monoclonal antibodies as markers of specific cell types and regional antigens in the freshwater planarian *Dugesia (Girardia) tigrina*. *Hydrobiologia* 227, 73-79.
- Ross, K. G., Omuro, K. C., Taylor, M. R., Munday, R. K., Hubert, A., King, R. S., Zayas, R. M., 2015. Novel monoclonal antibodies to study tissue regeneration in planarians. *BMC Dev. Biol.* 15:2.
- Sakurai, T., Ishii, S., 1995. An ultrastructural study of primary epidermis formation in *Bdellocephala brunnea* (Turbellaria, Tricladida). *Invert. Reprod. Dev.* 28, 77-85.
- Saló, E., Abril, J. F., Adell, T., Cebrià, F., Eckelt, K., Fernández-Taboada, E., Handberg-Thorsager, M., Iglesias, M., Molina, M. D., Rodríguez-Esteban, G., 2009. Planarian regeneration: achievements and future directions after 20 years of research. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 1317-1327.
- Samoilovich, M. P., Kuznetsov, S. G., Pavlova, M. S., Klimovich, V. B., 2001. Monoclonal antibodies to *Hydra vulgaris* and *Hydra oligactis* antigens. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 37, 262-269.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676-682.
- Shinozawa, T., Kawarada, H., Takezaki, K., Tanaka, H., Inoue, K., 1995. Preparation of monoclonal-antibodies against planarian organs and the effect of fixatives. *Hydrobiologia* 305, 266-257.



- Shirakawa, T., Sakurai, A., Inoue, T., Sasaki, K., Nishimura, Y., Ishida, S., Teshirogi, W., 1991. Production of cell-specific and tissue-specific monoclonal antibodies in the freshwater planarian *Phagocata vivida*. *Hydrobiologia* 227, 81-91.
- Sistigu, A., Viaud, S., Chaput, N., Bracci, L., Proietti, E., Zitvogel, L., 2011. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin Immunopathol.* 33, 369-383.
- Skaer, R., 1965. The origin and continuous replacement of epidermal cells in the planarian *Polycelis tenuis* (Ijima). *J. Embryol. Exp. Morph.* 13, 129-139.
- Struck, T. H., Wey-Fabrizius, A. R., Golombek, A., Hering, L., Weigert, A., Bleidorn, C., Klebow, S., Iakovenko, N., Hausdorf, B., Petersen, M., Kück, P., Herlyn, H., Hankeln, T., 2014. Platyzoan paraphyly based on phylogenomic data supports a noncoelomate ancestry of spiralia. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1833-1849.
- Tyler, S., Tyler, M., 1997. Origin of the epidermis in parasitic platyhelminths. *Int. J. Parasitol.* 27, 715-738.
- 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.
- Van Wolfswinkel, J. C., Wagner, D. E., Reddien, P. W., 2014. Single-cell analysis reveals functionally distinct classes within the planarian stem cell compartment. *Cell Stem Cell*, 15, 329-339.
- Wagner, D. E., Ho, J. J., Reddien, P. W., 2012. Genetic regulators of a pluripotent adult stem cell system in planarians identified by RNAi and clonal analysis. *Cell Stem Cell*. 10, 299-311.
- Zayas, R. M., Cebrià, F., Guo, T., Feng, J., Newmark, P. A., 2010. The use of lectins as markers for differentiated secretory cells in planarians. *Dev. Dyn.* 239, 2888-2897.

## Figures

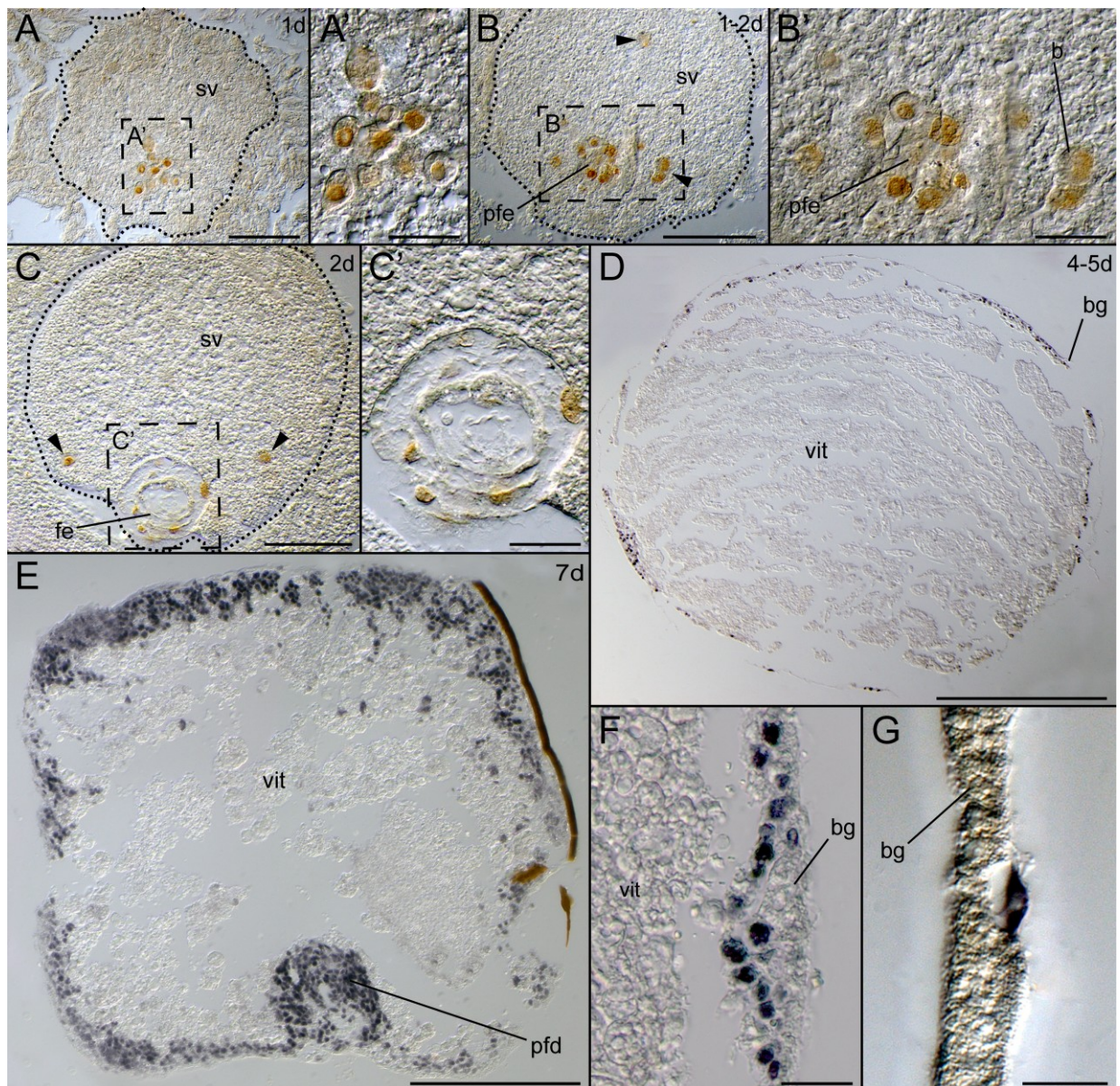


## B

	G1	G2	G3
Fusions realitzades	3	9	3
% pous positius	80 (±13)%	74 (±12)%	10 (±3.5)%
Teixits reconeguts	epidermis definitiva; cèl·lules nodradores, gastrodèrmiques, musculars i secretores	epidermis embrionària; subpoblació de blastòmers; cèl·lules nodradores i secretores	cèl·lules secretores; sistema nerviós i neoblasts

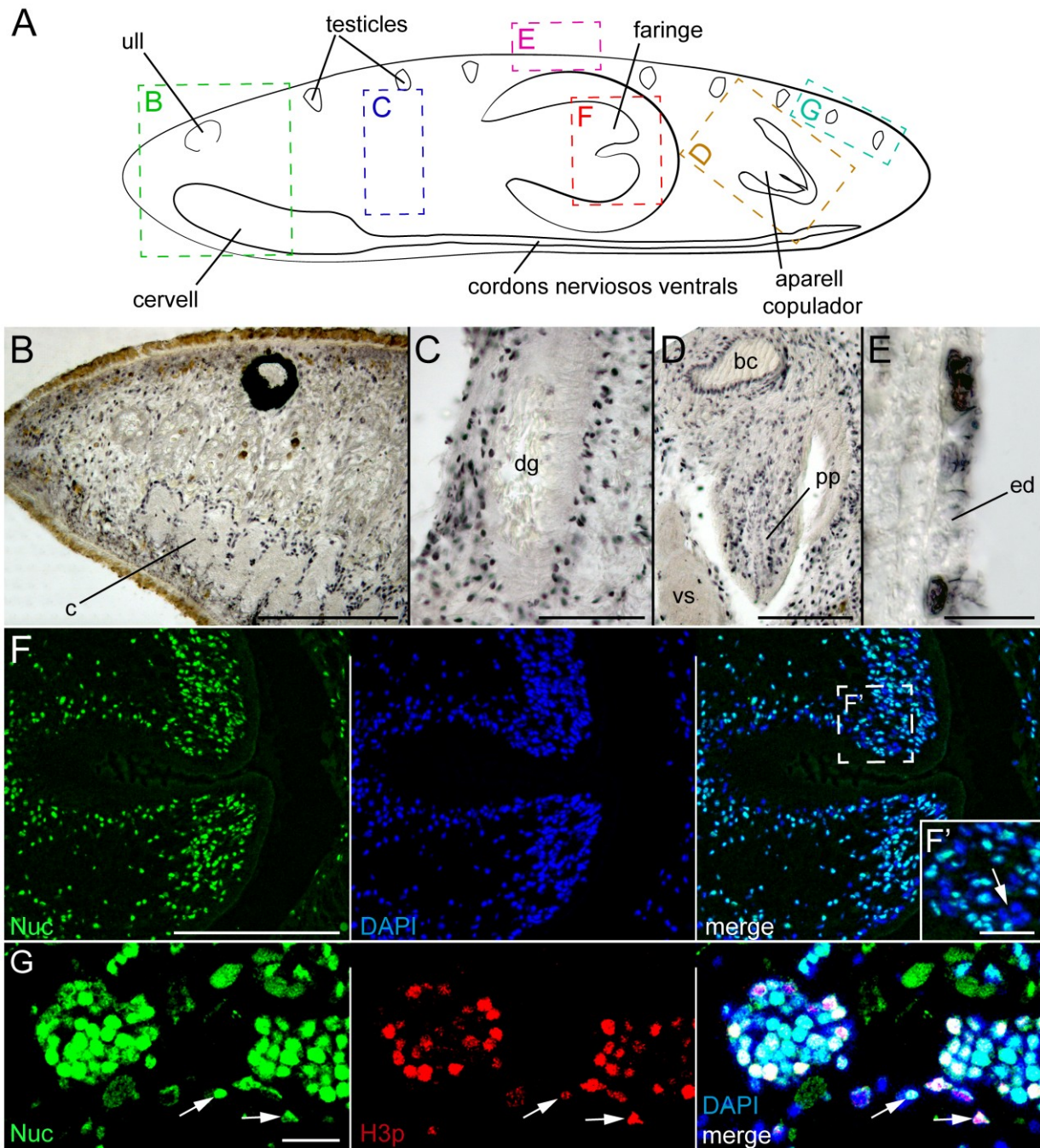
**Figura 1. Estratègies d'immunització i obtenció d'anticossos.** (A) Esquematzació dels protocols d'immunització practicats en aquest estudi. Pels grups G1 i G2 la proteïna que s'administrava era, respectivament, una barreja de sonicats d'adults i regenerants de *S. polychroa*, o bé sonicats d'embrions d'estadis 1 a 4 -estadis primerencs- o d'estadis 5 a 8 -estadis tardans ("proteïna adult o embrió + adjuvant incomplet", en verd clar, i "proteïna adult

o embrió”, en verd fosc). En el grup G3 es va seguir un protocol d’immunització subtractiva amb Ciclofosfamida (CM) contra antígens propis de cèl·lules vitel·lines: als dies 1 i 17 s’administrava, junt amb la CM 1%, una barreja de sonicats de cèl·lules vitel·lines i Adjuvant Incomplet; als dies 2, 3, 18 i 19 s’administrava només CM 1%; i als dies 10 i 26 s’administrava una solució de sonicats d’embrions d’estadis primerencs i Adjuvant Incomplet. D’aquesta manera s’aconseguia que els ratolins adquirissin tolerància immunitària contra les proteïnes de les cèl·lules vitel·lines (“proteïna cèl. vitel·lines”, en blau) i comencessin a produir anticossos contra les dels embrions primerencs (“proteïna embrió + adjuvant incomplet”, en verd clar, i “proteïna embrió”, en verd fosc). Les dates d’administració s’indiquen amb color negre. **(B)** Resum de les fusions realitzades. Es mostra per cada grup d’immunització el nombre de fusions, el percentatge de pous amb hibridomes i els teixits reconeguts pels anticossos que s’hi produïren.

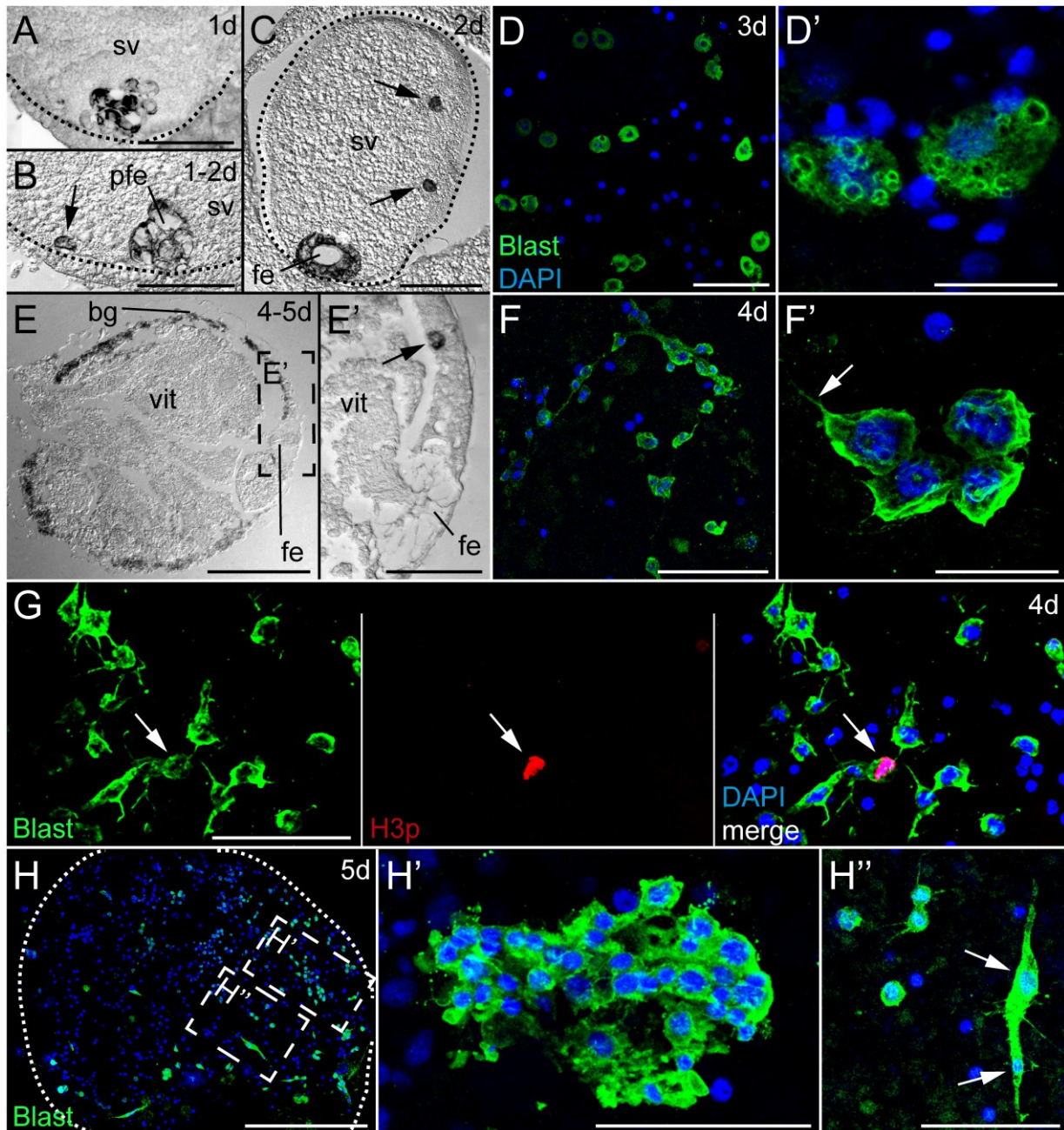


**Figura 2. Immunolocalització del mAb Nuc durant el desenvolupament embrionari de *S. polychroa*.** Totes les imatges mostren immunohistoquímiques colorimètriques del mAb Nuc en seccions d'embrions. Al marge superior dret s'hi indica el temps de desenvolupament de cada estadi; la correspondència entre aquesta datació i els diferents estadis embrionaris segueix la proposada a Monjo i Romero (2015). Els caps de fletxa negres de (B, C) indiquen marcatge en blastòmers isolats del sincici. Les imatges (F, G) mostren, respectivament, una ampliació de la banda germinal o el marcatge al nucli d'una cèl·lula de l'epidermis embrionària d'un embrió a 5-6 dies de desenvolupament (estadi 5). La línia puntejada de color negre indica els límits de l'embrió. b, blastòmers; bg, banda germinal; fe, faringe embrionària; pfd, primordi de la faringe definitiva; pfe, primordi de la faringe embrionària; sv, sincici de cèl·lules vitel·lines; vit, cèl·lules vitel·lines ingerides. Escala de les barres, D i E, 200 μm; A, B i C, 50 μm; A', B', C', F i G, 15 μm.





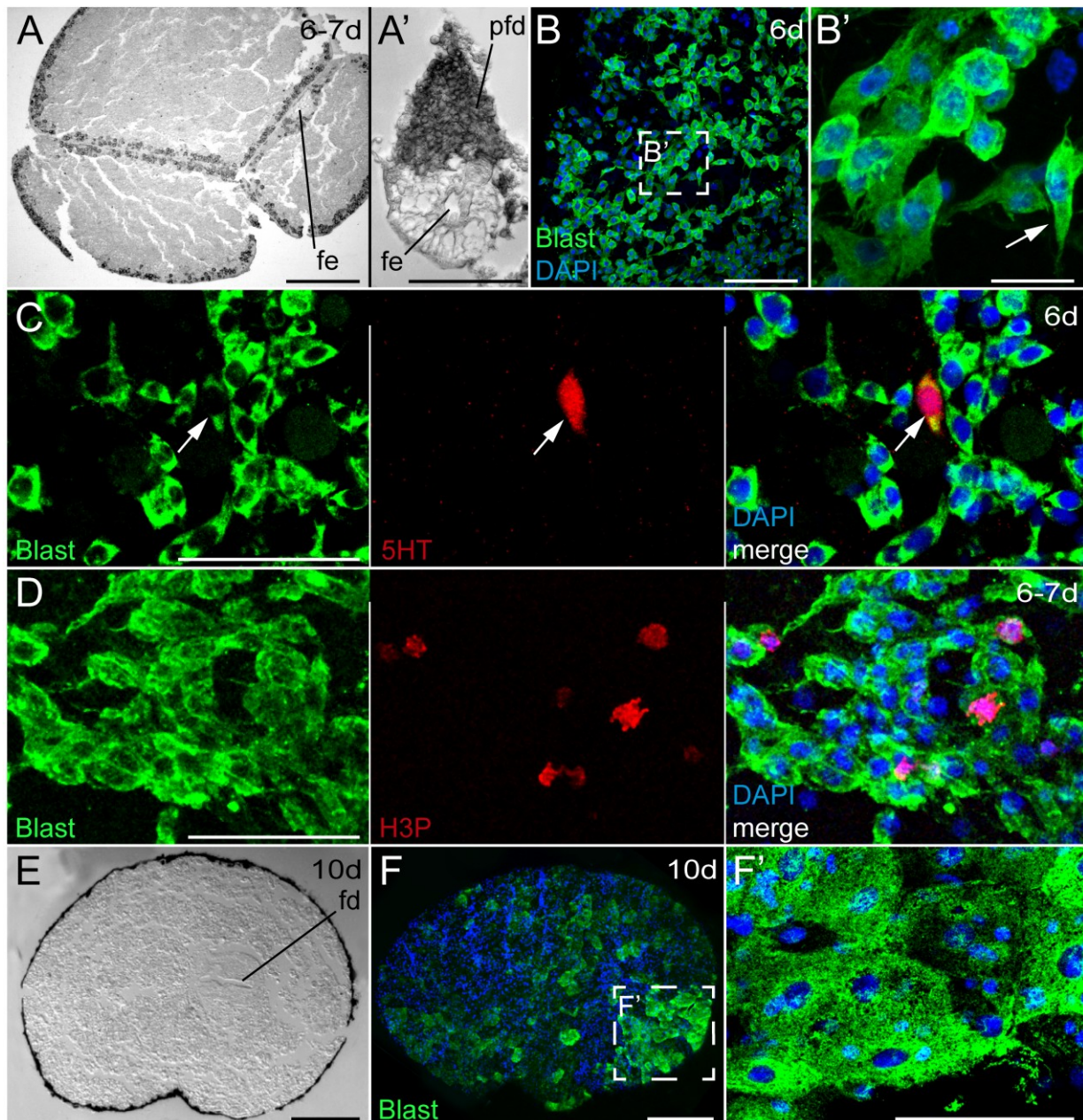
**Figura 3. Immunolocalització del mAb Nuc en teixits d'individus adults sexuals.** (A) Idealització de l'estructura interna d'un individu adult sexual de *S. polychroa* on s'hi indiquen els principals òrgans i la posició relativa de las regions analitzades a les imatges (B–G); l'anterior es troba a l'esquerra i la regió ventral a la part de sota del dibuix. (B–E) són imatges d'immunohistoquímiques colorimètriques del mAb Nuc en seccions de diferents regions d'un individu adult. (F, G) són imatges d'immunohistoquímiques fluorescents amb el mAb Nuc (en verd), combinat amb l'anticòs anti-H3p (en vermell) o bé amb el marcador nuclear DAPI (en blau) en seccions de la faringe (F, F') o dels testicles (G). Les fletxes blanques indiquen, respectivament, cèl·lules de la regió de la faringe sense marcatge d'aquest mAb (F'), o neoblasts del parènquima (G). bc, bossa copuladora; c, cervell; dg, diverticle gàstric; ed, epidermis definitiva; pp, papil·la peniana; vs, vesícula seminal. Escala de les barres, B, D i F, 250 µm; C, 75 µm; F', 30 µm; E i G, 15 µm.



**Figura 4. Immunolocalització del mAb Blast durant els primers estadis de desenvolupament.** (A-C, E, E') són imatges d'immunohistoquímiques colorimètriques del mAb Blast en seccions d'embrions en desenvolupament. (D, D', F, F', G-H'') són imatges d'immunohistoquímiques fluorescents amb el mAb Blast (en verd), combinat amb l'anticòs anti-H3p (en vermell) o bé amb el marcador nuclear DAPI (en blau) en embrions *in toto*. Al marge superior dret de cada imatge s'hi indica el temps de desenvolupament dels estadis; la correspondència entre aquesta datació i els diferents estadis embrionaris segueix la proposada a Monjo i Romero (2015). Les fletxes negres indiquen blastòmers (B, C) i cèl·lules embrionàries (E') positius pel mAb. Les fletxes blanques assenyalen projeccions del citoplasma de les cèl·lules embrionàries (F'), cèl·lules embrionàries en divisió (G), o bé cèl·lules allargades d'una morfologia semblant a la de cèl·lules musculars (H''); aquestes projeccions s'observen per primer cop en embrions de 4 dies de desenvolupament (estadi 4), i semblen enllaçar amb les d'altres cèl·lules embrionàries, mentre que les cèl·lules de (H'') es detecten per primer cop en embrions de 5 dies de desenvolupament (estadi 5). La línia



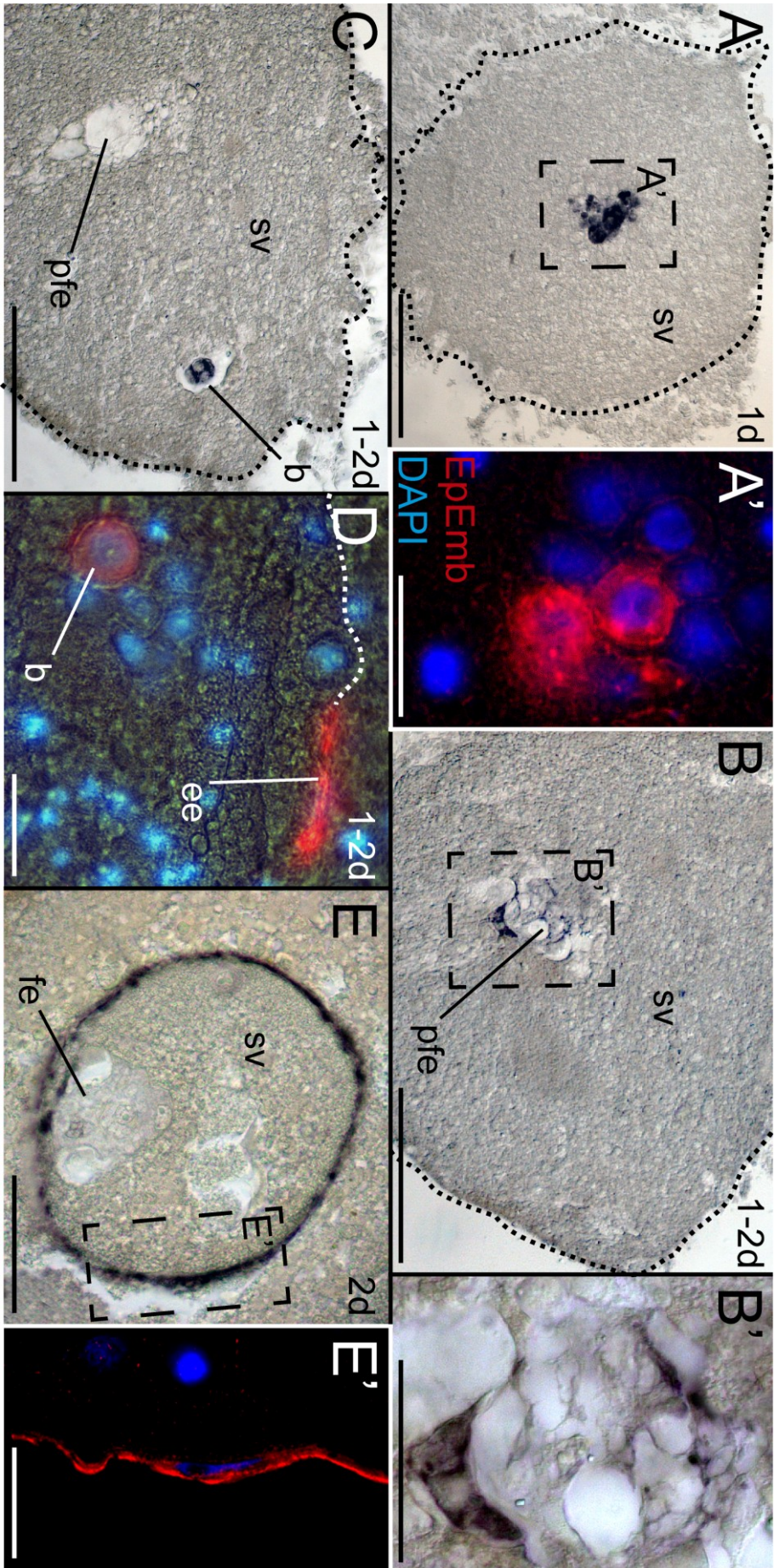
puntejada de color blanc i negre indica els límits de l'embrió. bg, banda germinal; fe, faringe embrionària; pfe, primordi de la faringe embrionària; sv, sincici de cèl·lules vitel·lines; vit, cèl·lules vitel·lines ingerides. Escala de les barres, E i H, 200 µm; A-D, E', F, G, H' i H'', 25 µm; D' i F', 10 µm.



**Figura 5. Immunolocalització del mAb Blast durant els estadis tardans del desenvolupament.** (A, A', E) són imatges d'immunohistoquímiques colorimètriques del mAb Blast en seccions d'embrions en els últims estadis del desenvolupament. (B, B', C, D, F, F') són imatges d'immunohistoquímiques fluorescentes amb el mAb Blast (en verd), combinat amb l'anticòs anti-H3p o anti-5HT (en vermell), o bé amb el marcador nuclear DAPI (en blau) en embrions *in toto*. Al marge superior dret de cada imatge s'hi indica el temps de desenvolupament dels embrions; la correspondència entre aquesta datació i els diferents estadis embrionaris segueix la proposada a Monjo i Romero (2015). Les fletxes blanques assenyalen cèl·lules d'una morfologia similar a les musculars (B'), o bé neurones serotoninèrgiques que també són positives pel mAb Blast (C). Fins als 6-7 dies de desenvolupament (estadi 5 tardà) l'anticòs tenyeix cèl·lules de la banda germinal i del parènquima, però en els últims estadis només reconeix l'epidermis definitiva; (F') mostra un detall d'un grup de cèl·lules de l'epidermis definitiva. Les imatges (E, F) mostren visions ventrals, amb l'anterior a l'esquerra, d'un embrió a 10 dies del desenvolupament (estadi 7). fd,

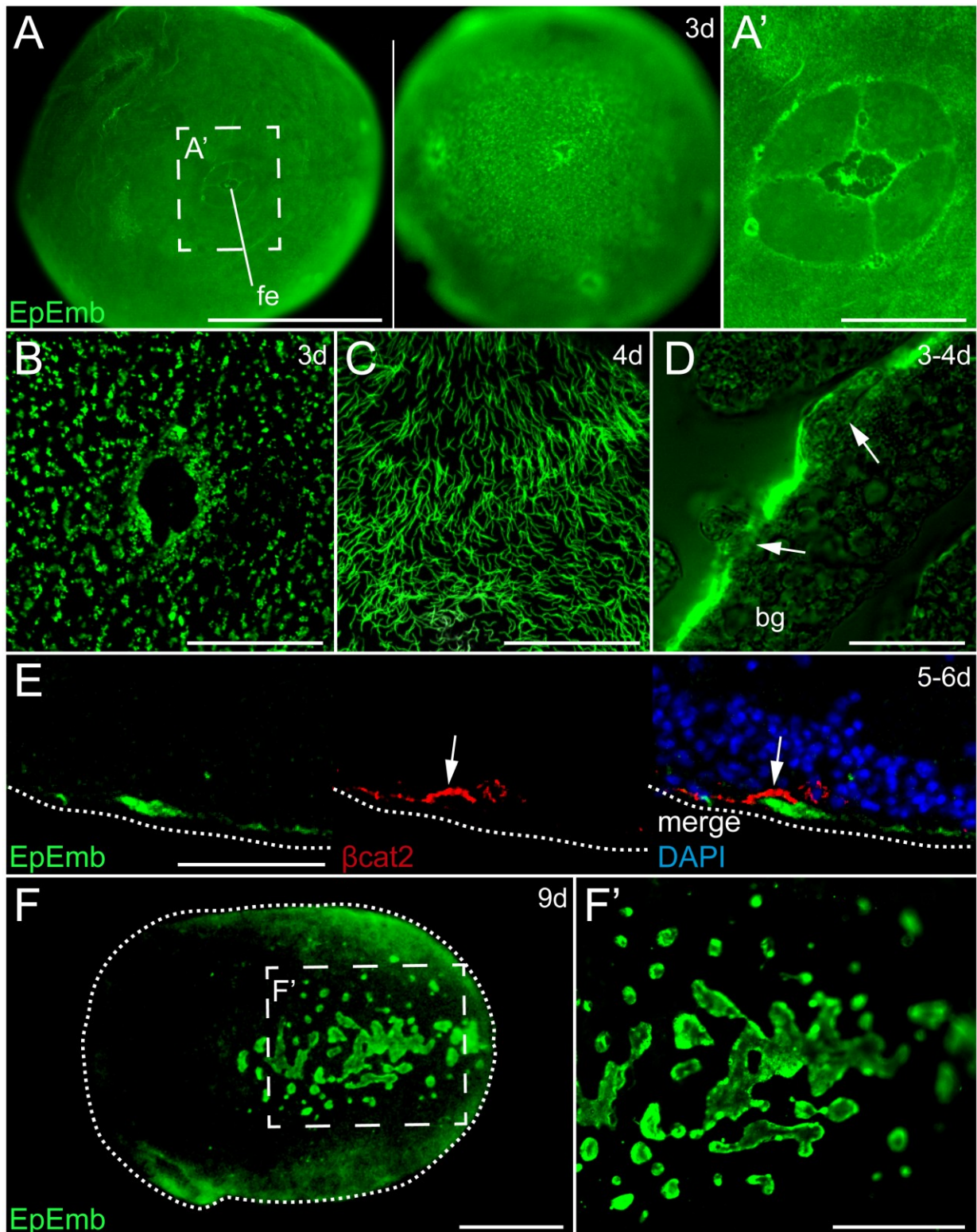


faringe definitiva; fe, faringe embrionària; pfd, primordi de la faringe definitiva. Escala de les barres, A, E i F, 200  $\mu\text{m}$ ; A' i B, 50  $\mu\text{m}$ ; C, D i F', 25  $\mu\text{m}$ ; B', 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6. Formació de l'epidermis embrionària i immunolocalització del mAb EpEmb.** (A, B-C, E) són imatges d'immunohistoquímiques colorimètriques del mAb EpEmb en seccions d'embrions en els primers estadis de desenvolupament. (A', D, E) són imatges d'immunohistoquímiques fluorescents amb el mAb EpEmb (en vermell) combinat amb el marcador nuclear DAPI (en blau) en seccions d'embrions. Al marge superior dret de cada imatge s'hi indica el temps de desenvolupament dels estadis; la correspondència entre aquesta datació i els diferents estadis embrionaris segueix la proposada a Monjo i Romero (2015). Les seccions de (B, C) pertanyen al mateix embrió; hom pot observar com aquest anticòs detecta cèl·lules a la regió del primordi de la faringe embrionària i d'altres de disperses pèl sincici, tot i que es troben en plans diferents. La línia puntejada de color blanc i negre indica els límits de l'embrió. b, blastòmer; ee, epidermis embrionària; fe, faringe embrionària; pfe, primordi de la faringe embrionària; sv, sincici de cèl·lules vitel·lines. Escala de les barres, A, B, C i E, 50 µm; A', B', D i E', 15 µm.





**Figura 7. Maduració i recanvi de l'epidermis embrionària visualitzat amb el mAb EpEmb.** Totes les imatges mostren immunohistoquímiques fluorescents amb el mAb EpEmb (en verd), combinat amb l'anticòs anti- $\beta$ cat2 (en vermell), o bé amb el marcador nuclear DAPI (en blau) en embrions *in toto*, excepte (D) que mostra una secció d'un embrió a 3-4 dies de desenvolupament. Al marge superior dret de cada imatge s'hi indica el temps de desenvolupament dels estadis; la correspondència entre aquesta datació i els diferents estadis embrionaris segueix la proposada a Monjo i Romero (2015). La imatge (A) mostra el

mateix embrió des de dos punts de vista diferents: amb la faringe embrionària cap amunt (imatge de l'esquerra) i cap avall (imatge de la dreta). (B, C) mostren un detall de la ciliació de l'epidermis embrionària a 3 (estadi 3) i 4 dies (estadi 4) del desenvolupament. Les fletxes blanques assenyalen dues cèl·lules adherides a l'exterior de la banda germinal que interrompen la continuïtat de l'epidermis embrionària (D), o bé una cèl·lula de l'epidermis definitiva que reacciona amb l'anticòs anti- $\beta$ cat2 (E); en aquesta imatge, l'anticòs anti- $\beta$ cat2 també tenyeix una cèl·lula de la banda germinal. Les imatges (F, F') mostren visions ventrals, amb l'anterior a l'esquerra, d'un embrió a 9 dies del desenvolupament (estadi 6-7). La línia puntejada de color blanc indica els límits de l'embrió. bg, banda germinal; fe, faringe embrionària. Escala de les barres, A i F, 200  $\mu$ m; F', 100  $\mu$ m; A', B, C i E, 25  $\mu$ m; D, 10  $\mu$ m.



## **Annex 3, Article 4. Planarian embriology in the era of comparative developmental biology**

José María Martín-Durán<sup>1,2</sup>, **Francisco Monjo**<sup>1</sup> i Rafael Romero<sup>1</sup>

International Journal of Developmental Biology, 56:39-48;

Índex d'impacte (2014): 1,903

<sup>1</sup> Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya

<sup>2</sup> actualment al Sars International Centre for Marine Molecular Biology, Bergen, Noruega





## Resum

En la última dècada el camp de la biologia evolutiva del desenvolupament (*evo-devo*) s'ha consolidat com una de les principals disciplines experimentals per determinar les relacions evolutives del regne animal. Alhora, les planàries han esdevingut un model útil i important per adreçar preguntes bàsiques sobre la base cel·lular i molecular de la regeneració, la reparació tissular i les cèl·lules mare en organismes adults. Tanmateix, s'ha dedicat poca atenció a l'estudi de la seva embriogènesi, i això que aquest procés ofereix una oportunitat única per entendre com els mecanismes moleculars del desenvolupament son redistribuïts durant la regeneració de l'adult o les pèrdues independents de la segmentació espiral que s'han donat en diferents llinatges de lofotrocozoous. En aquest treball oferim una revisió històrica dels treballs més rellevants sobre els embrions de planària. Això ens ha permès identificar les preguntes que han intrigat els investigadors d'aquest camp, la majoria de les quals encara no tenen resposta. Per últim, presentem un model entenedor de la seva embriogènesi que permet formular hipòtesis que han d'ajudar a tancar la bretxa entre aquest mode divergent de desenvolupament i el patró ancestral canònic de segmentació espiral i la regeneració de l'organisme adult.



# Planarian embryology in the era of comparative developmental biology

JOSÉ M. MARTÍN-DURÁN, FRANCISCO MONJO and RAFAEL ROMERO\*

*Universitat de Barcelona, Departament de Genètica, Barcelona, Spain*

**ABSTRACT** During the last decade, the field of evolutionary developmental biology (*evo-devo*) has emerged as a major research discipline in modern biology and an essential approach to understanding evolutionary relationships in the animal kingdom. At the same time, planarians have become a useful and important model with which to address basic questions regarding the molecular and cellular basis of regeneration, tissue repair and stem cells in adult organisms. Nevertheless, little attention has been paid to their embryonic development, even though this provides a unique opportunity for studying how molecular developmental mechanisms are redeployed during adult regeneration or the independent losses of spiral cleavage that took place in different lophotrochozoan lineages. In this paper, we review the most relevant works on planarian embryos from a historical point of view. In doing so, we highlight the questions that have recurrently intrigued researchers, most of which remain unanswered. Finally, we present a comprehensive scenario for planarian embryogenesis in an attempt to provide a testable hypothesis that will help to bridge the gap between this divergent mode of development, the ancestral canonical spiral cleavage, and adult planarian regeneration.

**KEY WORDS:** *planarian, embryogenesis, regeneration, evo-devo, gastrulation*

## Introduction

The rise of modern molecular evolutionary developmental biology highlighted the conservation of processes and developmental genes among classic model organisms. In the light of new molecular phylogenies, many animals that had long been neglected emerged as key taxa in the study of metazoan ontogeny and phylogeny. Within this scenario, it is striking that little interest has been shown in the embryonic development of Platyhelminthes, especially given that they exhibit various morphological traits (blind gut, simple centralized nervous system, simple eye, etc.) that make them interesting in the context of understanding animal evolution. Triclads, commonly referred to as planarians, have been the most well studied group of flatworms, particularly because of their amazing adult regenerative capabilities.

Planarians are free-living organisms that are found in marine, freshwater and land habitats. They are bilateral worms, with an anteroposteriorly elongated and dorsoventrally flattened body, which can range from a few millimeters to several centimeters long. The model species *Schmidtea polychroa* (Fig. 1A) is a typical and abundant inhabitant of rivers and lakes in Europe, is about a centimeter long, with dark brown coloration, and exhibits sexual reproduction. Its gross anatomy consists of a head with a pair of

eyes and sensory organs (auricles) in the anterior part of the body, a pharynx in the central region, and a posterior copulatory apparatus.

In general, sexually reproducing planarians are hermaphroditic. The reproductive system comprises a male and a female gonad (testis and ovaries, respectively), and the copulatory apparatus. All these components, including germ cells, develop from neoblasts (adult somatic stem cells located in the parenchyma (Shibata *et al.*, 2010)) through epigenesis. The most remarkable feature of this organ system is that the female gonad is heterocellular, which means that female gametes and yolk nutrients are produced in different organs, namely ovaries and yolk glands. Thus, these two elements are segregated into two different cell types (i.e. oocytes and yolk cells). Eggs with this type of organization are called ectolecithic eggs. After mating, several fertilized oocytes and multiple yolk cells are gathered into the atrium of the copulatory apparatus and protected by a dark hard eggshell. This egg capsule is then laid and attached to the ground via a stalk (Fig. 1B).

As Platyhelminthes, planarians belong to the super-phylum Spiralia (*sensu* Giribet *et al.*, 2000), which includes all organisms in which quartet-spiral cleavage is the ancestral mode of development (Fig. 1C). Platyhelminthes were historically divided into two major groups, according to the organization of the egg: Archoophora, a paraphyletic group comprised of the most basal

\*Address correspondence to: Rafael Romero. Universitat de Barcelona, Departament de Genètica, Avda. Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain.  
Tel: +34-934-035301. Fax: +34-934-034420. e-mail: rromero@ub.edu

groups, with endolecithal zygotes exhibiting the ancestral quartet-spiral cleavage; and Neophora, a monophyletic clade comprised of all groups of flatworms with ectolecithal eggs and heterocellular female gonads (Fig. 1D) (Westblad, 1948). Planarians therefore belong to the latter. The presence of yolk outside the zygote, and therefore the embryo, constrains development. Different strategies have evolved to ensure that the nutrients eventually end up within the developing embryo in neophoran Platyhelminthes, and the strategy exhibited by planarians is among the most impressive.

### The study of planarian embryogenesis

The gap in the knowledge and understanding of the embryonic development of Platyhelminthes compared to what is known about their taxonomy, morphology and regenerative capability is remarkable. The reasons for this are directly linked to the biology and life cycle of these organisms: fertilization is strictly internal in most of the species; the embryos are usually protected by hard and dark eggshells that obstruct the *in vivo* visualization of development; and last but not least, ectolecithal eggs strictly require yolk cells for their development, hindering their manipulation (Galleni and Gremigni, 1982). Nevertheless, in contrast to the situation for other minor groups of flatworms, there has been a more or less continuous stream of studies dealing with planarian embryonic development since the end of the 19th century.

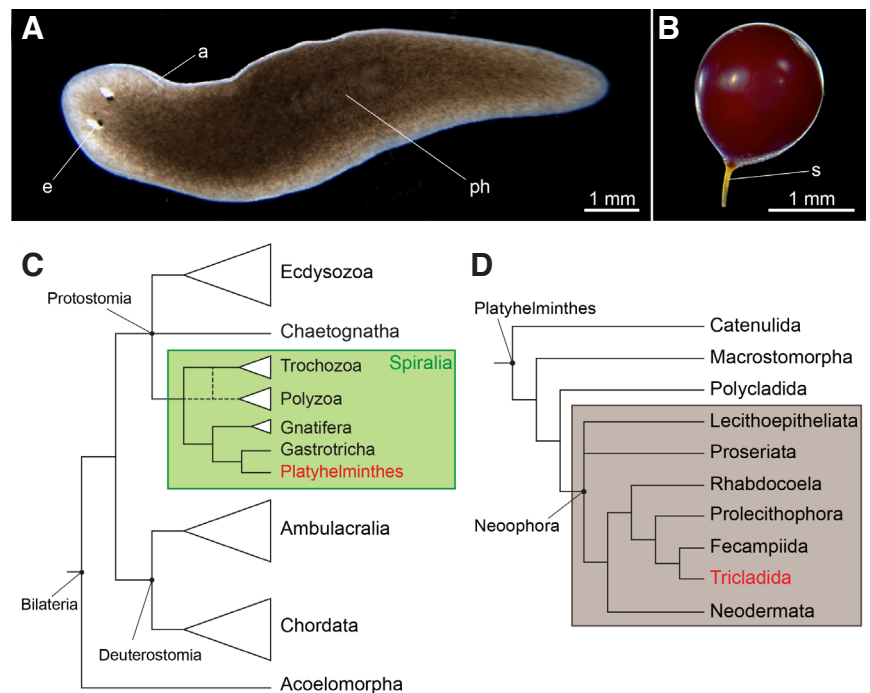
#### First studies: the foundations

The earliest reports on planarian embryogenesis date back to the mid 19th century (Kölliker 1846, Knappert 1865, 1866). Despite using simple techniques, they described some of the basic traits of planarian embryonic development. However, many of their descriptions are not that accurate, and in general, the following authors are considered to be the pioneers of planarian embryology: the Russian Elias Metschnikoff (1883), the Japanese Isao Iijima (1884) and the French Paul Hallez (1887). Using the freshwater planarians *Schmidtea polychroa* and *Dendrocoelum lacteum* as model systems, they gave a comprehensive and realistic description of the embryogenesis of planarians.

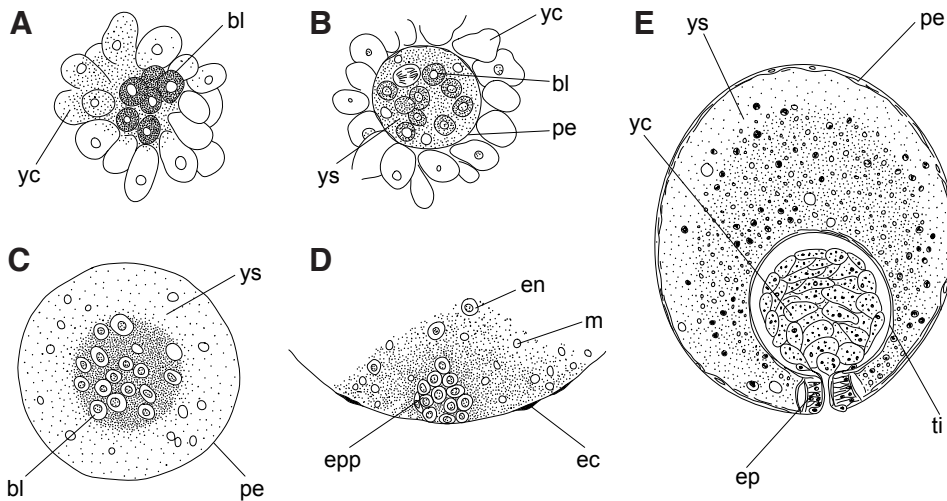
Their observations were particularly thorough in early stages of development. Both species lay egg capsules with several zygotes, which are surrounded by a large number of yolk cells arranged in a radial pattern. Soon after cleavage begins, those yolk cells in direct contact with each zygote fuse and form a syncytium, in which blastomeres will continue dividing (Fig. 2A). During this phase, blastomeres lose contact and disperse within the yolk-derived syncytium due to the pressure created by more fusing yolk cells (Fig. 2B–C). Cleavage is complete and more or less equal. According to Hallez (1887) the canonical quartet-spiral pattern is apparent up to the 8-cell stage. However, this observation has not been confirmed (Mattiesen 1904). Blastomeres move around the yolk syncytium until a certain number of blastomeres is reached. At this point, they adopt a distribution that leads

to the establishment of the three main germ layers. Some of the blastomeres migrate to the outer limit of the yolk-derived syncytium, and form a thin ciliated primary epidermis that corresponds to the ectoderm (Metschnikoff 1883, Hallez 1887). At the same time, other blastomeres group together in the center of the syncytium, then move to the periphery, and make contact with the embryonic epidermis (Fig. 2D). They develop into a transient embryonic pharynx (Iijima, 1884; Hallez, 1887), which at its inner end is in contact with a group of four thin cells that enclose a primary cavity, the transient embryonic intestine. These cells, together with the embryonic pharynx, constitute the endomesoderm of the embryo. The rest of the blastomeres remain in the yolk-derived syncytium. According to Metschnikoff (1883) and Iijima (1884) these cells are the mesoderm, whereas Hallez (1887) refers to them as migrating cells, and not mesoderm, since all definitive organs develop from them. The primary epidermis, embryonic pharynx and migrating cells comprise the basic elements of the transient yolk-feeding embryo (Fig. 2E).

The embryonic pharynx is required to swallow the maternally supplied yolk cells. As a consequence, the transient intestine is filled with nutrients, the embryo swells up, and the original yolk-derived syncytium with the remaining blastomeres is reduced to a thin peripheral layer. After eating, the embryonic pharynx closes and degenerates, and the definitive organs arise from the migrating cells (Metschnikoff, 1883; Iijima, 1884; Hallez, 1887). This late phase of development is not as well described and there are some controversies between authors. For instance, while Metschnikoff (1883) states that the definitive gut arises from some ingested yolk



**Fig. 1. General morphology and phylogenetic position of planarians.** (A,B) External appearance of a sexually mature adult of the freshwater species *Schmidtea polychroa*, and an embryonic capsule of the same species, respectively. (C) Phylogenetic position of the phylum Platyhelminthes within bilaterian animals, based on Hejnol et al., 2009 and Hejnol 2010. (D) Phylogenetic position of the order Tricladida within Platyhelminthes, based on Littlewood 2008. a auricle, e eye, ph pharynx, s stalk.



**Fig. 2. Early development of planarians. (A–D)** Cleavage, formation of the yolk-derived syncytium and early differentiation of the transitory organs of the yolk-feeding embryo (based on Iijima 1884). **(E)** Basic organization of the yolk-feeding embryo at the beginning of the ingestion of the maternally-supplied yolk cells (based on Metschnikoff 1883). Drawings are not to scale. *bl*, blastomeres; *ec*, ectoderm; *ep*, embryonic pharynx; *epp*, embryonic pharynx primordium; *en*, endoderm; *m*, mesoderm; *pe*, primary epidermis; *ti*, temporary intestine; *yc*, yolk cells; *ys*, yolk-derived syncytium.

cells, Hallez (1887) argues that it is also formed by migrating cells.

These early descriptions represent the basis for every subsequent study regarding planarian embryogenesis. Despite the fact that these authors dealt with a divergent mode of development, they tried to find a comparative framework in which their observations made sense, thereby giving the name of ectoderm, mesoderm and endoderm to structures that are relatively unlike the typical germ layers.

### First half of the 20th century

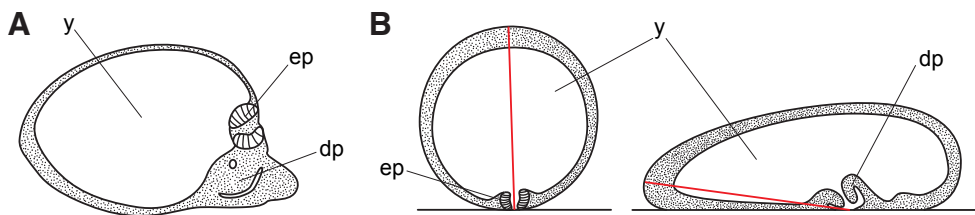
The first work published on planarian embryos in the new century was conducted by American researchers (Bardeen 1902, Curtis 1902, 1905, Stevens 1904). Using two American freshwater species, *Girardia tigrina* and *Cura foremanii*, these studies present general descriptions of their embryonic development (Stevens 1904), but also focus on particular questions regarding planarian embryogenesis, such as the origin of the definitive cell types (Bardeen 1902) and the relationship between the embryonic and the adult pharynx (Curtis 1902, 1905). Furthermore, the work by

Bardeen (1902) was the first attempt to manipulate planarian embryos in order to experimentally compare the regenerative capacity of the embryo and adult.

The data presented by these authors did not considerably change the classic model for the development of planarians. However, their interpretation of the early stages (i.e. cleavage and formation of the yolk-feeding embryo) varied to a great extent. Unlike previous reports, these authors argued that there is not true segregation of the germ layers, since the definitive organs have their origin in the migrating embryonic cells, which are in fact the only true germ layer (Stevens 1904). Therefore, planarians do not exhibit real gastrulation. This idea was accepted in the majority of subsequent studies on planarian embryos, although it should be considered one of the most important open questions regarding this divergent mode of development (discussed below).

Back in Europe, Mattiesen (1904) presented a detailed description of the embryonic development of *Planaria torva* and reexamined previous observations of *D. lacteum* and *S. polychroa*. His work raised questions regarding embryonic polarity and how the transient embryonic pharynx is related to the definitive pharynx. The author concluded that the embryonic pharynx develops on the ventral side of the embryo and that after yolk ingestion the definitive pharynx develops at the site of the embryonic pharynx (Fig. 3A). However, his contemporaneous American colleagues assumed a dorsal position for the embryonic pharynx, the definitive pharynx being formed on the ventral side of the embryo before the complete disappearance of the embryonic pharynx (Fig. 3B) (Curtis 1902, Bardeen 1902, Stevens 1904). This controversy caused intense debate (Curtis 1905), and despite the fact that subsequent authors have tended to adopt Mattiesen's interpretation, the issue remains unresolved.

Fulinski (1914, 1916) described the formation of an embryonic blastema in which the primordia of the definitive organs originate after the ingestion of the yolk. This blastema is formed through proliferation of the migrating cells, which mostly accumulate on the ventral side of the embryo. The primary embryonic blastema subdivides into three regions: an anterior primordium that gives rise to the cephalic region and the central nervous system; a central primordium associated with the degenerating embryonic pharynx and in which the definitive pharynx and the digestive system will form; and a posterior primordium in which posterior structures, muscles, glands, and eventually the reproductive system, will differentiate (Fig. 4). Several years later, Fulinski put forward the possibility that the embryonic pharynx of planarians is homologous to the blastopore



**Fig. 3. Alternative hypothesis about the relationship between the embryonic pharynx, the definitive pharynx and the axial identities of the embryo. (A)** The embryonic pharynx occupies a dorso-posterior position when the definitive organs start to be formed (modified from Curtis 1902). The definitive pharynx forms ventrally and both structures coexist for a while. **(B)** The embryonic pharynx develops in the ventro-posterior region of the embryo, and after yolk ingestion is superseded in the same location by the definitive pharynx (drawings based on Hallez 1887). According to this latter hypothesis, the radial symmetry of the primary embryo is, at the same time, the future anteroposterior and dorsoventral axes (red line in **B**). *dp* definitive pharynx, *ep* embryonic pharynx, *y* yolk.



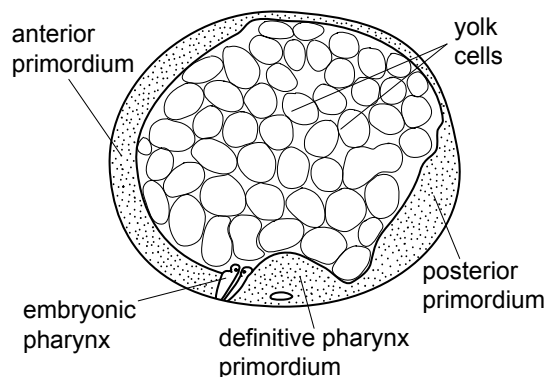
of other Platyhelminthes (Fulinski 1938).

Acconci (1919) also studied the fertilization, cleavage and early stages of development in *D. lacteum* and *S. polychroa*. Carlé (1935) described for the first time the embryonic development of two land planarians, *Geoplana notocelis* and *Rhynchodemus terrestris*, demonstrating that it was similar to that already reported for freshwater species.

### Second half of the 20th century: systematization

The early studies by Seilern-Aspang (1956, 1957) characterized the embryonic development of the marine species *Procerodes lobata*, confirming that all lineages of planarians show similar embryonic traits. In a subsequent report (Seilern-Aspang 1958) the author addressed in great detail the embryogenesis of planarians, and in particular the mechanisms that operate during the formation of the yolk-derived syncytium, cleavage and the organization of the transient yolk-feeding embryo. Based on fine observations of early embryos, the author proposed that the zygote delivers chemotactic substances to attract surrounding yolk cells and stimulate their fusion into a syncytium before cleavage starts. This idea had also been put forward by Acconci (1919), and in 1991 it was again suggested by Sakurai, based on observations of the ultrastructure of the zygote and the yolk cells during these initial stages.

Up to the mid 1950s, the term used to describe the cleavage and formation of the yolk-feeding embryo had been the German phrase *Blastomeren Anarchie*. However, Seilern-Aspang (1958) attempted to give a mechanistic interpretation of the blastomere movements within the yolk-derived syncytium. He subdivided blastomeres into three different groups: positive, negative and neutral. According to his hypothesis, negative blastomeres are repelled towards the periphery of the yolk-derived syncytium, forming the embryonic epidermis. Meanwhile, positive and neutral blastomeres remain in a central position. Afterwards, positive blastomeres move to the extreme of the syncytium and differentiate into the embryonic pharynx, while neutral blastomeres keep on wandering around, becoming the so-called migratory cells. In this way, the primary yolk-derived syncytium is transformed into a radial embryo, with an axis running through the embryonic pharynx that will be the



**Fig. 4. Formation of the definitive organs from an embryonic blastema.**

According to Fulinski (1916), definitive organs form from three major blastemas: an anterior primordium, in which the nervous system develops; a central primordium, close to the embryonic pharynx and that gives rise to the definitive pharynx; and a posterior primordium, which forms all the caudal structures. Muscle cells and the parenchyma develop from isolated cells of the three blastemas.

future dorsoventral axis of the definitive embryo. This model was the starting point for future studies, in particular those by Koscielski (1964, 1966, 1967).

At the same time, Skaer (1965) dealt with the formation of the definitive epidermis, demonstrating that its origin lies in undifferentiated cells of the embryonic parenchyma that migrate, intercalate into the degenerating embryonic epidermis, and differentiate into adult epidermal cells. This process takes place at two different time points: just after the ingestion of the maternally supplied yolk cells, and simultaneously to the differentiation of the other definitive cell types.

However, the most significant studies were conducted by Albert Le Moigne (1963, 1966, 1969) using the freshwater species *Polycelis nigra* and *Polycelis tenuis*. In these, the author addressed the study of planarian embryogenesis using techniques never used before, in particular the transmission electron microscope, which offered new levels of resolution and information. Based on his observations, Le Moigne (1963) systematized planarian embryonic development, subdividing it into seven major stages (Fig. 5). Furthermore, he made relevant contributions to understanding the relationship between embryogenesis and adult regeneration, and the embryonic origin of neoblasts.

Briefly, the stages proposed by Le Moigne (1963, 1966) are:

- Stage 1: formation of the yolk-derived syncytium and disperse cleavage. In his opinion, there is no homology between the typical germ layers of other metazoans and the segregation of blastomeres in planarians.

- Stage 2: appearance of the transient organs (primary epidermis, embryonic pharynx and transitory intestine).

- Stage 3: ingestion of the maternally supplied yolk cells. The yolk-derived syncytium becomes restricted to the periphery of the embryo, forming the so-called germ band. The undifferentiated embryonic cells in this thin layer of syncytium start dividing.

- Stage 4: a transitory pharynx, probably unique to *P. nigra* and *P. tenuis*, is formed at the site occupied by the embryonic pharynx. The definitive cell types (neoblasts, muscle cells, digestive and secretory cells, flame cells, etc.) start to differentiate from the proliferating embryonic cells of the germ band.

- Stage 5: the two cerebral ganglions are formed in the anterior-ventral part of the embryo. The definitive pharynx differentiates just above the transitory pharynx, and the posterior digestive branches are discernible.

- Stage 6: the pair of ventral nerve cords start to differentiate in an anteroposterior direction and the eyes become visible.

- Stage 7: maturation of the definitive organs prior to hatching.

This scenario proposed by Le Moigne is currently valid, and can be considered as the first modern description of the divergent development of planarians.

In subsequent years, studies focused on particular aspects of development, such as oogenesis, fertilization and the formation of the eggshell (reviewed in Benazzi and Gremigni 1982). Finally, Ishii and Sakurai (1988), Sakurai and Ishii (1995) and Sakurai (1991) dealt with the formation and replacement of the primary epidermis and the yolk-derived syncytium. These authors suggested that the embryonic epidermis forms by fusion of a group of blastomeres on one side of the syncytium, at the point at which the embryonic pharynx will be formed. This organ was thought to be homologous to the blastopore of other animals, and the expansion of the primary epidermis from this point to wrap the whole



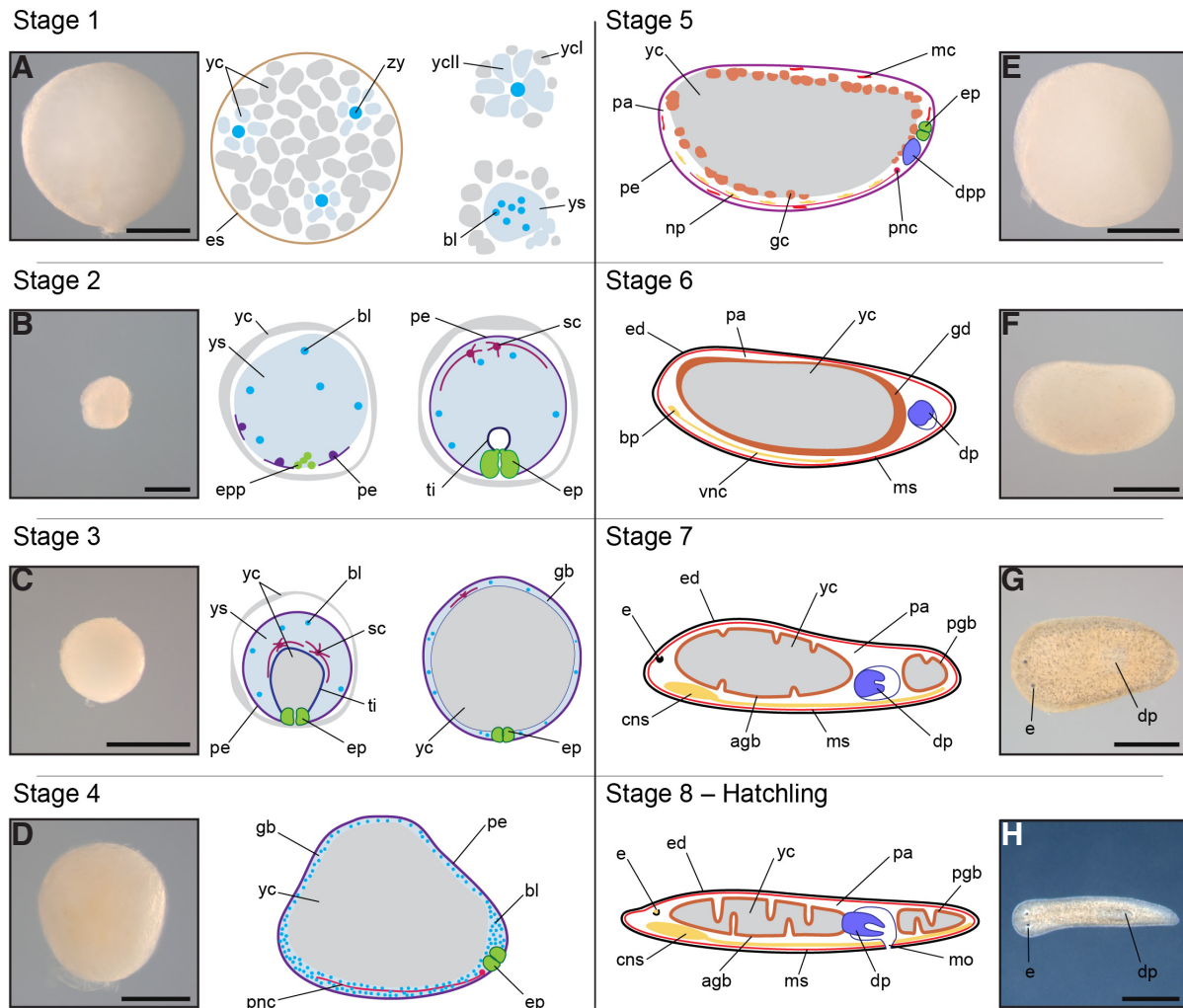
syncytium to be homologous to gastrulation, through a process known as *inverse epiboly*.

### The study of planarian embryology in the 21st century

As the study of planarian regeneration experienced renewed interest with the establishment of modern molecular techniques (i.e. *in situ* hybridization, fluorescent immunohistochemistry, gene knockdown by RNA interference, BrdU labeling of proliferative cells, etc.), which opened up a wide range of new possibilities in the study of this striking phenomenon, the need to apply these new molecular methods to the study of planarian embryonic development, in order

to bridge the gap between embryonic and post-embryonic phases of the planarian life cycle, became evident.

The work conducted by Cardona *et al.*, (2005a,b, 2006) meant the entry of planarian embryology into the modern era of molecular developmental biology. By a combination of immunohistochemistry and observations under the optical and electron microscope, their studies offer a detailed description of the embryonic development of the planarian species *Schmidtea polychroa*, in particular of the early stages of development (Cardona *et al.*, 2006) and the formation of the definitive organs (Cardona *et al.*, 2005a). In this re-evaluation of planarian development, Le Moigne's original stag-



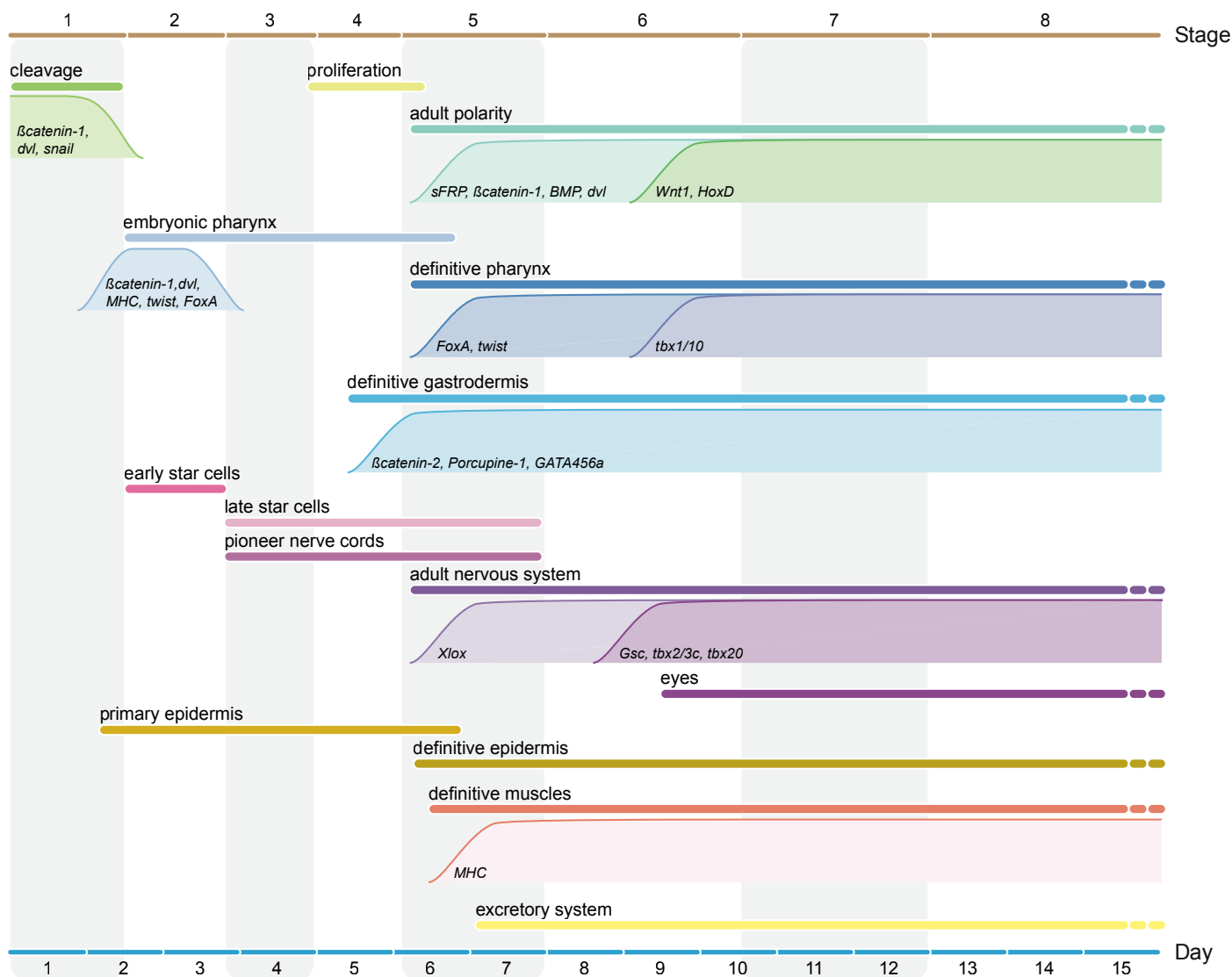
**Fig. 5. General overview of planarian embryogenesis. (A–H)** Dissected embryos at stage 1, stage 2, stage 3, stage 4, stage 5, stage 6, stage 7 and hatching, respectively. **(A)** Mass of yolk cells, inside which yolk-derived syncytium formation and cleavage take place. **(B)** Early yolk-feeding embryo, with its characteristic transient structures (i.e. primary epidermis, embryonic pharynx, transient intestine and star cells). **(C)** Due to the ingestion of yolk cells, the embryo grows in size and the initial yolk-derived syncytium becomes restricted to the periphery of the embryo, forming the so called germ band. **(D)** Blastomeres in the germ band start proliferating, and the pioneer nerve cords become visible. **(E)** Specification of definitive axial identities and differentiation of the adult cell types starts at stage 5, at the same time as the formation of the definitive pharynx primordium. **(F,G)**, during stages 6 and 7, the definitive organs arise and develop to acquire the morphology observed in stage 8 embryos and hatchlings **(H)**. Drawings are not to scale. The main illustrated morphological and histological events are based on Le Moigne 1963, Cardona *et al.*, 2005a, Cardona *et al.*, 2006, Martín-Durán *et al.*, 2010 and Martín-Durán and Romero 2011. agb anterior gut branch, bl blastomere, bp brain primordium, CNS central nervous system, dp definitive pharynx, dpp definitive pharynx primordium, e eye, ed epidermis, ep embryonic pharynx, epp embryonic pharynx primordium, es eggshell, gb germ band, gc gastrodermal cell, mc muscle cell, mo mouth, ms muscle, np neural precursor, pa parenchyma, pe primary epidermis, pgb posterior gut branch, pnc pioneer nerve cord, sc star cells, ti temporary intestine, vnc ventral nerve cord, yc yolk cells, ycl type I yolk cells, yclII type II yolk cells, ys yolk syncytium, zy zygote. In (F–H) anterior is to the left. Scale bars: (A, C–G) 500  $\mu$ m; (B) 250  $\mu$ m; (H) 1 mm.

ing criteria (Le Moigne 1963) were adapted to the staging system proposed by Hartenstein and Ehlers (2000), which had been successfully applied to the embryonic development of other groups of Platyhelminthes, and thus planarian embryogenesis was divided into eight stages (Fig. 6).

Most of the observations made by Cardona *et al.*, (2005a, 2006) confirmed previous reports on the embryonic development of *Schmidtea polychroa* and other triclads. However, the use of specific molecular markers (i.e. antibodies against specific neural populations or muscle cells, such as serotonin, FMRF-amide or myosin heavy chain) allowed them to thoroughly follow the appearance of specific cell types and tissues. In this respect, the description of the formation of the nervous system was a significant contribution. As early as in stage 2 embryos, a pair of large multipolar cells, known as star cells, appear at the interface between the embryonic epidermis and the syncytial yolk layer (Cardona *et al.*, 2005a). As the embryo ingests the yolk, these cells internalize and associate with the growing transitory intestine. Based mainly

on their morphology and immunoreactivity with acetylated-tubulin, tyrosinated-tubulin and serotonin, these cells were interpreted as being the primary nervous system, possibly involved in the control of the movements of the embryo required for the ingestion of the maternally supplied yolk cells.

Like other transitory structures in these early stages of development, these star cells disappear with the formation of the definitive organs. The formation of a definitive nervous system seems to be associated with the appearance of a pair of nerve fibers that run from the degenerating embryonic pharynx towards the opposite pole of the embryo. Known as pioneer nerve cords, they occupy the future ventral side of the embryo on top of which the definitive nervous system will be built during stages 6 and 7. Unlike the situation described by Le Moigne (1963), the central nervous system develops more or less simultaneously along the anteroposterior axis, through differentiation of regularly spaced concentrations of immunoreactive FMRF-amide neural cells (Cardona *et al.*, 2005a). By stage 7, the anteriormost clusters of cells form the small neuropil



**Fig. 6. Overview of planarian embryonic development.** Summary of major developmental events (colored bars) and associated gene expression (colored curves) with respect to stages and days of embryogenesis after egg capsule deposition (at 20°C). The chart is based on Cardona *et al.*, 2005a, 2006; Martín-Durán *et al.*, 2010 and Martín-Durán and Romero 2011.

that gives rise to the definitive bilobed brain.

In addition to morphological and molecular descriptions, the work conducted by Cardona *et al.*, (2005a, 2006) resulted in one of the most striking interpretations of planarian embryogenesis. The development of transient structures (embryonic pharynx, primary epidermis, star cells) was viewed as being part of a cryptic larva (without a free-living phase) required to ingest the yolk material supplied by the mother within the embryonic capsule. The authors suggested that this period of development may have evolved as a consequence of selective pressure to ingest a limited shared amount of embryonic nutrients, ultimately required to accomplish successful development. Whatever their evolutionary origin, the idea of planarians as indirect developers was firmly argued for Cardona *et al.*, (2006), thus supporting alternative, usually neglected, views (Fulinski 1916, Seilern-Aspang 1958, Koscielski 1967).

### **Gene expression patterns and a comparative approach to studying planarian embryogenesis**

With the optimization of *in situ* hybridization protocols to visualize the expression of particular genes either in whole-mount embryos or in paraffin sections (Cardona *et al.*, 2005b, Martín-Durán *et al.*, 2010), certain developmental questions that have always attracted attention could be considered from a comparative and evolutionary point of view. The recognition of ancient similarity in patterning mechanisms among distantly related organisms allows the direct comparison of developmental processes, providing new data for understanding metazoan ontogeny and phylogeny.

The work by Solana *et al.*, (2009) and Solana and Romero (2009) dealt with the relationship between blastomeres and neoblasts and the origin of the latter during the embryogenesis of *S. polychroa*. The expression of conserved stem cell markers such as *vasa-like gene A (vlgA)* and *tudor-1 (tud-1)*, demonstrated that those blastomeres that do not contribute to the formation of any transient structure in the yolk-feeding embryo remain in an undifferentiated state during yolk ingestion (stages 2–4). As development proceeds and the embryo acquires its definitive morphology, the expression of these genes progressively changes to that observed in juveniles and adults, suggesting that it is during these stages that neoblasts are specified, as proposed by Le Moigne (1966).

In a recent paper (Martín-Durán *et al.*, 2010), a comparative analysis of conserved genes involved in the establishment of the metazoan body plan was used to address how axial identities and different cell fates are specified during planarian embryogenesis. The expression of core components of the canonical Wnt pathway (*βcatenin-1*, *Wnt1*, *sFRP*, *dishevelled*) and BMP pathway (*bmp*), known to control the anteroposterior and dorsoventral patterning in adult planarians (Cebrià *et al.*, 2010), shows that the asymmetric expression of some of these genes along the bilateral axes of the organism appears from stage 5 onwards, as the embryo acquires its worm-like shape, the transient yolk-feeding organs are reabsorbed, and the definitive structures are formed (Fig. 6). During early stages, these genes are either not expressed (e.g. *bmp*) or show no clear asymmetric expression in the embryo, with the exception of *βcatenin-1*, which becomes restricted to the embryonic pharynx after cleavage. These data led the authors to suggest that the definitive polarity is established late in development, at stage 5, while early stages either feature different mechanisms of axial identity or, more likely, lack true axiality and thus the radiality of the yolk-feeding embryo. In this respect and despite the divergence of

the initial developmental stages, conserved mechanisms of tissue segregation and specification can still be discerned. Genes such as *twist* and *foxA* conserve their expression associated with the formation of the muscle and foregut, respectively (Martín-Durán *et al.*, 2010).

A similar comparative approach was used to study the embryonic development of the digestive system (Martín-Durán and Romero 2011). Despite the evolutionary significance of the features exhibited by this organ in planarians and other flatworms (i.e. single gut opening and, therefore, blind gastrodermis), until that point it had been one of the least studied due to difficulties in specifically staining and visualizing gastrodermal cells in planarian embryos. A combination of histological studies and gene expression analysis demonstrated that gastrodermal cells are specified during stage 4–5, in a more or less diffuse pattern, eventually giving rise to a thin endodermal epithelium that surrounds the ingested yolk. After hatching, the gastrodermal cells ingest the nutrients, acquiring a mature morphology during this process. The process of embryonic patterning in the digestive system was studied by means of conserved endodermal and anteroposterior gut markers (*foxA*, *GATA456*, *gooseoid*, *paraHox* genes and *T-box* genes) (Fig. 6). Based on their expression patterns, the authors concluded that the blind gut of planarians lacks discernible anteroposterior regionalization in the foregut, midgut and hindgut, but conserves the conserved molecular boundary between the pharynx and gastrodermis displayed by *foxA* and *GATA456* genes in some spiralian.

### **Towards a deeper understanding of planarian embryology**

The systematic analysis of expression patterns of master developmental control genes has consolidated many of the classic concepts about planarian embryogenesis that were based on morphological studies (Solana *et al.*, 2009, Solana and Romero 2009, Martín-Durán *et al.*, 2010, Martín-Durán and Romero 2011). The involvement of most of these genes in conserved metazoan developmental events leads to fundamental questions being considered from a completely new point of view. When and how is axial polarity defined during the divergent development of planarians? Does real gastrulation that defines the major tissue fates take place? How is the transient organization related to the definitive body plan? In the following, we address these primary questions and develop a comprehensive scenario for planarian embryogenesis in an attempt to unify concepts and link this peculiar mode of development with the better known ancestral spiralian cleavage and adult planarian regeneration.

#### **Establishment of axial identities**

The work by Martín-Durán *et al.*, (2010) demonstrated that the asymmetric expression of genes controlling the axial identities along the bilateral axes occurs at stage 5, when the specification of most of the definitive cell types and organs begins (Le Moigne 1963, Cardona *et al.*, 2005a, Martín-Durán and Romero 2011). This observation prompts one to question how the transient yolk-feeding embryo is organized and whether the definitive axiality is already defined in this early phase, although using mechanisms other than those observed in hatchlings and adults. In our opinion, two features of planarian embryogenesis must be taken into consideration: the distinctive disperse cleavage, which distinguishes

planarians from all other canonical spiralian developers, and the presence of a transient independent embryonic organization (i.e. the yolk-feeding embryo).

Spiralian development relies heavily on maternal determinants and cell–cell interactions to specify the different cell lineages and axial organizers during cleavage (Nielsen 2010). In some taxa (some annelids and molluscs, sipunculids), the axial organizer (the D quadrant and its descendants) is already defined as early as in the four-cell embryo. This is accomplished by the transmission of maternal determinants present in the zygote to one of the four cells through asymmetric cell divisions and/or the formation of a polar lobe (van Dam *et al.*, 1982). These embryos are commonly called unequal-cleaving spiralian. However, many of the spiralian lineages are equal-cleaving, and therefore, early cleavage does not lead to specification of the D quadrant. In these embryos, it is the process of cell–cell communication that sets up the embryonic organizer at the 16–32 cell stage, during which one of the vegetal blastomeres contacts the animal micromeres and becomes specified as the D quadrant (van den Biggelaar and Guerrier, 1979). In both cases, the molecules involved remain elusive. Regardless of the type of cleavage, the descendants of the D quadrant will occupy a dorso-posterior position in the embryo, and will guide the cell lineages of the A, B and C quadrants to form the left, ventro-anterior and right regions of the embryo, respectively (Freeman and Lundelius 1992). Are these events conserved in the disperse equal-cleavage observed in planarians?

Despite the fact that some studies have shown a primary polarity in the oocyte (Stevens 1904, Benazzi 1950, Anderson and Johann 1958), the best sign of maternal determinants is the presence of high levels of transcripts for genes like *βcatenin-1* in freshly laid egg capsules (Martín-Durán *et al.*, 2010). Although probable, their localization in the zygote needs to be proven. On the other hand, the existence of stereotypic cell–cell interactions between certain blastomeres is much more unlikely. The disperse cleavage exhibited by planarian embryos seems to imply weak and intermittent interactions between cells, which probably vary from one embryo to another. In canonical spiralian embryos the absence of inductive signals between cells (or the removal of the polar lobe in unequal-cleaving spiralian) leads to the formation of a radialized embryo with an oral–aboral axis, which lacks the axial organizer, but gastrulates normally and thus forms the ectoderm, endoderm and a stomodeum (Wilson 1904, Martindale *et al.*, 1985). In these embryos, an unusual number of blastomeres remain undifferentiated, due to the absence of an organizer. This situation shows a strikingly resemblance to that in early planarian embryos.

All these data suggest that alternative mechanisms that establish the bilateral axes during early cleavage in planarian embryos are not strictly necessary. Instead, it is tempting to propose that the deviations in the canonical spiral cleavage found in this lineage are responsible by themselves for organizing the radial yolk-feeding embryo. The asymmetric inheritance of certain maternal determinants would be sufficient to trigger the specification of the early lineages found in the transient embryo (i.e. epidermal cells, muscle and endothelial cells of the embryonic pharynx, etc.), whereas the absence of an axial organizer would lead to the formation of the observed radial organization and keep most of the blastomeres undifferentiated and wandering around the yolk-derived syncytium. In this scenario, the ingestion of the maternally supplied yolk cells would activate the mechanisms of axial patterning, transforming

the primary radial stage into a bilateral embryo.

### **Segregation of the germ layers**

Whether or not true gastrulation occurs has been one of the fundamental questions in planarian embryology. Since the work of Stevens (1904), authors have tended to accept the absence of real gastrulation movements during early development. However, has this key embryonic event been lost in the lineage leading to planarians? What do we understand by “gastrulation”?

According to Gilbert (1985), gastrulation is the developmental event in which cell movements lead to the formation of a multilayered embryo with its basic body plan. This process is, therefore, tightly linked to the specification of the endoderm and the development of the gut cavity (Technau and Scholz 2003). Although the cell movements responsible for the appearance of this internal germ layer are highly diverse across metazoans, establishment of the gastrulation site and the endodermal cell fate seems to be fairly conserved, the canonical Wnt pathway being a master regulator of these processes (Martindale and Hejnal 2009). In addition to the endoderm, an additional germ layer, the mesoderm, is specified during early development in bilaterians, although not necessarily during gastrulation (Technau and Scholz 2003). In our opinion, the question regarding the occurrence of true gastrulation in planarian embryogenesis should focus on whether the events that characterize every known gastrulation (i.e. cell migration, formation of a multilayered embryo and establishment of the basic body plan) are present in planarians, and not on if it is possible to recognize a stereotypic gastrula stage.

In this respect, cell motility is by itself one of the most obvious features of early planarian development. Disperse cleavage is characterized by the detachment of the blastomeres, which no longer form a compact morula, but instead move and diffuse across the yolk-derived syncytium. Despite the anarchic situation that might be apparent at first sight, defined groups of blastomeres are set up after reaching a certain number of cells: those that form the primary epidermis, the primordium of the embryonic pharynx, and the blastomeres that remain undifferentiated in the yolk syncytium. The appearance of these three major groups is related both to a change in the position of cells in the syncytium and also to the activation of a specific molecular profile: the expression of *βcatenin-1* is restricted to those cells forming the embryonic pharynx, in which mechanisms of mesoderm differentiation (expression of *twist* and *myosin heavy chain*) and endoderm/gut specification (expression of *foxA*) are present (Martín-Durán *et al.*, 2010). At the same time, those blastomeres that do not contribute to the formation of any transient structure keep expressing stem cell markers, such as *vasa* and *tudor* (Solana *et al.*, 2009, Solana and Romero 2009).

The formation of the embryonic pharynx also implies the development of a primary cavity (transitory intestine) inside the yolk-derived syncytium (Metschnikoff 1883, Iijima 1884, Hallez 1887, Martín-Durán *et al.*, 2010). This small cavity will gather the ingested yolk cells and is, in fact, the future gut cavity of the definitive embryo and adult (Martín-Durán and Romero 2011). It is thus not strange that early embryologists named this transient intestine the archenteron (Hallez 1887). Finally, disperse cleavage and the segregation of different groups of blastomeres are directly related to the establishment of the primary embryonic organization, or the yolk-feeding embryo, which as mentioned above represents the “scaffold” on which the definitive embryo will develop after yolk



ingestion.

Taking into account all these arguments, we believe that early stages of planarian development (stages 1 and 2) meet the minimum requisites for considering them as a true divergent mode of gastrulation (Martín-Durán *et al.*, 2010). Nevertheless, the idiosyncrasy of planarian embryos makes their gastrulation, a mandatory step in metazoan development, diverge from the idealized view that many of us have based on the study of the most common animal models.

### Organogenesis

Historically, the study of planarian embryogenesis has focused on early stages, since they are the most striking. Although Bardeen (1902) began to address the formation of the definitive cell types during late development, it was not until Le Moigne (1963, 1966) and more recently Cardona *et al.*, (2005a,b) and Martín-Durán and Romero (2011) that a more accurate picture of the appearance of the final organs was achieved. As these studies demonstrate, the development of organs like the digestive system, the musculature, the epidermis and the nervous system takes place diffusely throughout the germ band, rather than in three discrete ventral blastemas as proposed by Fulinski (1916). Despite the fact that the first traces of cell differentiation are observed in stage 5 embryos, the expression of genes involved in the specification of these cell types can already be detected during stage 3–4 (Cardona *et al.*, 2005b, Martín-Durán *et al.*, 2010, Martín-Durán and Romero 2011). This observation together with the fact that the definitive axial identities seem to be specified during these same stages reinforces the notion of this phase of development as a sort of metamorphosis, during which a large part of the primary embryonic architecture is remodeled or replaced by the definitive body plan.

### Embryonic development and regeneration

The study of the embryonic development of planarians is of great importance to better understand the cellular and molecular mechanisms involved in adult planarian regeneration. The first comparison between these two processes was made by Hallez (1887), working with *D. lacteum*. Based on his observations, he concluded that both events were roughly similar, especially at the organismic level. Later studies demonstrated the presence of similar stages in the formation of organs like the definitive pharynx or the eyes (Le Moigne 1969, Cardona 2005a, Martín-Durán and Romero 2011, Martín-Durán *et al.*, 2012). However, adult planarian regeneration is not merely a recapitulation of embryonic development and several differences should be noted. First, comparisons between the two events should be limited to stages 4–5 onwards of embryonic development, since this is the time when equivalent organs and structures are formed. Taking this into account, clear similarities, both at the cellular and the molecular level, between the embryonic development of the definitive organs and their adult regeneration can be traced. Likewise, the mechanisms controlling the establishment of the definitive body plan and polarity in embryos and regenerants seem to be similar. Second, the starting point for each of these two processes is completely different. While the whole definitive embryo forms from a diffuse set of undifferentiated cells located in the germ band, the regeneration of a structure must involve the identification of the missing body part, which then has to be integrated into a preexisting body pattern. In this way, regeneration has to be much more regulative than embryogenesis in planarians. Therefore, not only does planarian regeneration

rely on the presence of pluripotent stem cells (neoblasts) or the maintenance of patterning mechanisms in the adult, but also on mechanisms required to evaluate what has to be regenerated, which are apparently absent during normal embryogenesis.

### Conclusions and future directions

The article has reviewed the most relevant work dealing with planarian embryogenesis. When considered from a historical point of view, it is evident that several questions have recurrently intrigued researchers working with planarian embryos. How did disperse cleavage evolve and how is it controlled? Is it homologous to true gastrulation? And therefore, is there true segregation of germ layers? How and when are the bilateral axes established in embryonic development? How are embryogenesis and regeneration connected in planarians? How do the definitive organs develop? Adopting a comparative approach, using both the gene expression patterns of evolutionarily conserved developmental genes and morphology, has revealed similarities between adult planarian regeneration and late stages of development, as well as between the ancestral quartet-spiral cleavage and the divergent early stages of embryogenesis. Nevertheless, efforts should be made to develop functional methodologies in order to validate many of the hypotheses raised and to increase our knowledge of this interesting divergent mode of development to the level of other emerging embryonic systems and adult planarian regeneration.

### Acknowledgements

We thank M. Vila-Farré and members of the laboratories of F. Cebrià and E. Saló for support and valuable comments on this manuscript. JMM-D was an FPU fellow from the MICINN (Ministerio de Ciencia e Innovación), Spain. FM was an APIF fellow from the University of Barcelona, Spain. This work was supported by MEC BFU-2007-63209, Spain, to RR.

### References

- ACCONCI C (1919). Osservazioni sullo sviluppo delle planarie d'acqua dolce. *Boll Ist Zool R Univ Palermo* 1:49-76.
- ANDERSON JM, JOHANN JC (1958). Some aspects of reproductive biology in the freshwater triclad turbellarian, *Cura foremanii*. *Biol Bull* 115:375-482.
- BARDEEN CR (1902). Embryonic and regenerative development in planarians. *Biol Bull* 3:262-288.
- BENAZZI M (1950). Ginogenesi in tricladi di acqua dolce. *Chromosoma* 3:474-482
- BENAZZI M, GREMIGNI V (1982). Developmental biology of Triclad turbellarians. In *Developmental biology of freshwater invertebrates* (Ed. F. W. Harrison and R. R. Cowden). Alan R. Liss, New York, pp. 151-211.
- CARDONAA, HARTENSTEIN V, ROMERO R (2005a). The embryonic development of the triclad *Schmidtea polychroa*. *Dev Genes Evol* 215:109-131.
- CARDONA A, FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ J, SOLANA J, ROMERO R (2005b). An *in situ* hybridization protocol for planarian embryos: monitoring myosin heavy chain gene expression. *Dev Genes Evol* 215:482-488.
- CARDONA A, HARTENSTEIN V, ROMERO R (2006). Early embryogenesis of planaria: a cryptic larva feeding on maternal resources. *Dev Genes Evol* 216:667-681.
- CARLÉ R (1935). Beiträge zur embryologie der landplanarien. I. Frühentwicklung, bau und junction des embryonalpharynx. *Zoomorphology* 29:527-558.
- CEBRIÀ F, ADELLT T, SALÓ E (2010). Regenerative medicine: lessons from planarians. In *Stem cell, regenerative medicine and cancer* (Ed. S. R. Singh). Nova Science Publishers, Hauppauge, pp. 29-68.
- CURTIS WC (1902). The life story, the normal fission and the reproductive organs of *Planaria maculata*. *Proc Boston Soc Nat Hist* 30:515-559.
- CURTIS WC (1905). The location of the permanent pharynx in the planarian embryo.

- Zool Anz 29:169-175.
- FREEMAN G, LUNDELIUS JW (1992). Evolutionary implications of the mode of D quadrant specification in coelomates with spiral cleavage. *J evol Biol* 5:205-247.
- FULINSKI B (1914). Die entwklungsgichte von *Dendrocoelum lacteum* Oerst I Teil: Die erste entwklungsphase vom ei bis zur embryonalpharynx bildung. *Bull Acad Sci Cracovie, Cl des Sci Math Nat, Ser B* 8/9:147-190.
- FULINSKI B (1916). Die keimblätterbildung bei *Dendrocoelum lacteum* Oerst. *Zool Anz* 47:380-400.
- FULINSKI B (1938). Zurembryonalpharynxfrage der Tricladiden. *Zool Polon* 2:185-207.
- GALLENI L, GREMIGNI V (1982). Fertilization, development and parental care in Turbellaria. In *Reproductive biology of invertebrates* (Eds. K.G. Adiyodi and R.G. Adiyodi). Vol. 4. J. Wiley, Chichester, pp. 63-89.
- GILBERT SF (1985). *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- GIRIBET G, DISTEL DL, POLZ M, STERRER W, WHEELER WC (2000). Triploblastic relationships with emphasis on the acelomates and the position of Gnathostomulida, Cyclophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: a combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Syst Biol* 49:539-562.
- HARTENSTEIN V, EHLERS U (2000). The embryonic development of the rhabdocoel flatworm *Mesostoma lingua* (Abildgaard, 1789). *Dev Genes Evol* 210:399-415.
- HALLEZ P (1887). Embryogénie des Dendrocoeles d'eau douce. *Mem Soc Sci Lille* 16:1-107.
- HEJNOL A (2010). A twist in time— The evolution of spiral cleavage in the light of animal phylogeny. *Integr Comp Biol* 50:695-706.
- HEJNOL A, OBST M, STAMATAKIS A, OTT M, ROUSE GW, EDGEcombe GD, MARTINEZ P, BAGUÑÀ J, BAILLY X, JONDELIUS U, WIENS M, MÜLLER WEG, SEEVEREC, WHEELER WC, MARTINDALE MQ, GIRIBET G, DUNN CW (2009). Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc Biol Sci B* 276:4261-4270.
- IJIMA I (1884). Untersuchungen über den Bau un die Entwklungsgichte der Süßwasser-Drendocoelen (Tricladen). *Z wiss Zool* 40:359-464.
- ISHII S, SAKURAI T (1988). Scanning and transmission electron microscopic observations on epidermal development in the embryo of the freshwater triclad, *Bdellocephala brunnea*. *Fortschr Zool* 36:291-295.
- KNAPPERT B (1865). Bijdragen tot de ontwikkelingsgeschiedenis der zoetwaterplanarien. *Natuurk Verh uitg d h Prov Utrechtsch Genootschap v Kunsten en Wetens*.
- KNAPPERT B (1866). Embryogénie des planariés d'eau douce. *Arch neerl d sci ex et nat (Haarlem)* 1:271-272.
- KÖLLIKER A (1846). Ueber die contractilen Zellen der Planarienembryonen. *Arch Naturgesch* 12:291-295.
- KOSCIELSKI B (1964). Polyembryony in *Dendrocoelum lacteum* O. F. Müller. *J Embryol exp Morph* 12:633-636.
- KOSCIELSKI B (1966). Cytological and cytochemical investigations on the embryonic development of *Dendrocoelum lacteum* O. F. Müller. *Zool Pol* 16:83-102.
- KOSCIELSKI B (1967). Experimental studies on embryonic development of *Dendrocoelum lacteum* O. F. Müller. *Experientia* 23:212-214.
- LE MOIGNE A (1963). Etude du développement embryonnaire de *Polycelis nigra* (Turbellarié, Triclade). *Bull Soc Zool Fr* 88:403-422.
- LE MOIGNE A (1966). Etude du développement embryonnaire et recherches sur les cellules de régénération chez l'embryon de la Planaire *Polycelis nigra* (Turbellarié, Triclade). *J Embryol exp Morph* 15:39-60.
- LE MOIGNE A (1969). Etude du développement et de la régénération embryonnaires de *Polycelis nigra* (Ehr.) et *Polycelis tenuis* (Iijima), Turbellariés Triclades. *Ann Embryol* 2:51-69.
- LITTLEWOOD DTJ (2008). Platyhelminth systematics and the emergence of new characters. *Parasite* 15:333-341.
- MARTÍN-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.
- 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.
- MARTÍN-DURÁN JM, MONJO F, ROMERO R (2012). Morphological and molecular development of the eyes during embryogenesis of the freshwater planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev Genes Evol* 222:45-54.
- MARTINDALE MQ, DOE CQ, MORRILL JB (1985). The role of animal-vegetal interaction with respect to the determination of dorsoventral polarity in the equal-cleaving spiralian, *Lymnaea palustris*. *Wilhelm Roux Arch Dev Biol* 194:281-295.
- MARTINDALE MQ, HEJNOL A (2009). A developmental perspective: changes in the position of the blastopore during bilaterian evolution. *Dev Cell* 17:162-174.
- MATTIESEN E (1904). Ein beitrag zur embryologie der Süßwasserdendrocoelen. *Z wiss Zool* 77:274-361.
- METSCHNIKOFF E (1883). Die embryologie von *Planaria polychroa*. *Z wiss Zool* 38:331-354.
- NIELSEN C (2010). Some aspects of spiralian development. *Acta Zoologica* 91:20-28.
- SAKURAI T (1991). An electron-microscopic study of syncytium formation during early embryonic development of the freshwater planarian *Bdellocephala brunnea*. *Hydrobiologia* 227:113-118.
- SAKURAI T, ISHII S (1995). An ultrastructural study of primary epidermis formation in *Bdellocephala brunnea* (Turbellaria; Tricladida). *Invertebr Reprod Dev* 28:77-85.
- SEILERN-ASPANG F (1956). Frühentwicklung einer mariner triclade (*Procerodes lobata* O. Schmidt). *Wilhelm Roux' Arch* 148:589-595.
- SEILERN-ASPANG F (1957). Polyembryonie als abnorme entwicklung bei *Procerodes lobata* O. Schmidt (Turbellaria). *Zool Anz* 159:187-193.
- SEILERN-ASPANG F (1958). Entwicklungsge schichtliche studien an paludicolen tricladen. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* 150:425-480.
- SHIBATA N, ROUHANA L, AGATA K (2010). Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Dev Growth Differ* 52:27-41.
- SOLANA J, LASKO P, ROMERO R (2009). *Spoltud-1* is a chromatid body component required for planarian long-term stem cell self-renewal. *Dev Biol* 328:410-421.
- SOLANA J, ROMERO R (2009). *Spolvlg-A* is a DDX3/PL10-related DEAD-box RNA helicase expressed in blastomeres and embryonic cells in planarian embryonic development. *Int J Biol Sci* 5:64-73.
- STEVENS NM (1904). On the germ cells and the embryology of *Planaria simplicissima*. *Proc Acad Nat Sci Philadelphia* 56:208-220.
- TECHNAU U, SCHOLZ CB (2003). Origin and evolution of endoderm and mesoderm. *Int J Dev Biol* 47:531-539.
- VAN DAM WI, DOHMEN MR, VERDONK NH (1982). Localization of morphogenetic determinants in a special cytoplasm present in the polar lobe of *Bithynia tentaculata*. *Wilhelm Roux Arch Dev Biol* 191:371-377.
- VAN DEN BIGGELAAR JAM, GUERRIER P (1979). Dorsoventral polarity and mesentoblast determination as concomitant results of cellular interactions in the mollusk *Patella vulgata*. *Dev Biol* 68:462-471.
- WESTBLAD E (1948). Studien über skandinavische Turbellaria Acoela. V. *Ark Zool* 41A:1-82.
- WILSON EB (1904). Experimental studies on germinal localization. I. The germ regions in the egg of *Dentalium*. *J Exp Zool* 1:1-72.

**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 Cebriá, 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

**Characterization of novel genes expressed specifically in the sexual organs of the planarian *Dugesia ryukyuensis***

Sumitaka Hase, Emiko Kashiwagi, Kazuya Kobayashi, Motonori Hoshi and Midori Matsumoto

*Int. J. Dev. Biol.* (2007) 51: 345-349

**Planarian pharynx regeneration revealed by the expression of myosin heavy chain-A**

Tomoko Sakai, Kentaro Kato, Kenji Watanabe and Hidefumi Orii

*Int. J. Dev. Biol.* (2002) 46: 329-332

**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

**5 yr ISI Impact Factor (2010) = 2.961**

