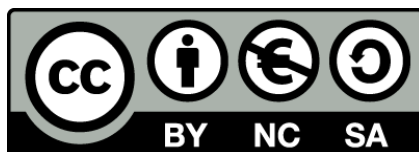




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Rol de la mitocòndria en el control de la homeòstasi cel·lular en planàries

Maria Rosselló Xamena



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

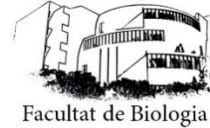
This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

Rol de la mitocòndria en el control de la homeòstasi cel·lular en planàries





UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Tesi Doctoral
Universitat de Barcelona

Rol de la mitocòndria en el control de la homeòstasi cel·lular en planàries

Memòria presentada per
Maria Rosselló Xamena

Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona, Programa de
Genètica

Tesi doctoral realitzada al Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística
sota la direcció de la Doctora Teresa Adell

Directora i tutora,
Teresa Adell Creixell

Autora,
Maria Rosselló Xamena

Barcelona, setembre 2021

Lluitar constant i vèncer

Miquel Costa i Llobera

Dedicada a la Ninanaina

Explicació de la portada

Tot i que pugui semblar que un procés biològic és un fet aïllat sempre es el resultat de la integració de molts elements. Quan observem la mitocondria no s'entén com un sol orgànu aïllat sinó que és el resultat de la unió coordinada de molts processos que permeten els canvis en l'individu.

“A la natura res existeix per si sol”
Rachel Carsón

Disseny de la portada: Paula Lavergne
Impressió: Roy Creatius

Agraïments

Una tesi és un procés llarg i compartit. Durant aquests gairebé quatre anys que he estat fent aquest treball m'he creuat amb moltes persones que m'han influenciat tant personalment com científicament i que sense elles aquesta tesi no seria avui aquí.

Vull començar agraint a la meva directora i tutora de tesi la Teresa Adell. Gràcies per la confiança i el suport, per ser-hi en els moments difícils i per haver-me guiat a convertir-me en la científica que soc avui. Durant aquests anys m'has donat l'oportunitat no només d'investigar sinó també de formar-me com científica i, un mica, com a divulgadora. Gràcies per encoratjar-me a provar coses noves, a embarcar-me en projectes nous i a donar-me suport i noves oportunitats. He descobert que el món de la ciència no és fàcil però que si es té un bon equip al costat tot és més senzill. També vull agrair a l'Emili Saló per haver-me donat l'oportunitat d'entrar al grup i acceptar totes les meves propostes. També vull tenir unes paraules pel Pep Abril. Tot el projecte del Nanopore no hagués estat possible sense el teu optimisme; m'has ensenyat que ni un *primer* defectuós ni una pandèmia poden impedir que seguim endavant. Gràcies per ser el meu Mestre Jedi (o hauria de dir millor Lord Sith) i atreure'm al Dark Side de la bioinformàtica.

Aquests quatre anys no haguessin estat possibles sense el suport incondicional del meu pare científic, el Francesc Mestres. M'has animat sempre i encoratjat a seguir sempre amb frases de Indiana Jones o Star Trek. T'has convertit amb el Maestro i sempre formaré part d'aquesta petita família.

Però com he dit al laboratori no he estat mai sola. He après una mica de tota la gent que ha passat per allí i m'emporto molts bons records dels moments de feina i d'esbarjo. Gràcies a la Nídia, el Miquel, el José, l'Eudald, la Susana, l'Aina i el Carlos per ser els meus mentors dins el lab durant aquests anys. També als que han vingut després, el Dani i el Pablo, per compartir bons moments al lab. Com oblidar-me de l'ànima de la festa i la millor companya de viatges, la Sheila, i la persona més dolça que he conegut mai, la Coral. Gràcies Sheila i Coral per aguantar-me els dies eternals al lab i per haver-vos convertit en persones tan importants en la meua vida. També mencionar al laboratori de les mosques pels bons moments. Els dinars amb el Josè, la Paula, el Carlos, la Palmira, la Mar... són com un oasi enmig del desert.

Fora del laboratori també he tingut molta gent que m'ha donat suport, o aguantat, durant aquesta tesi. Gràcies a la família del quart: Robert, Núria P, Gerard, Nuria N, Álvaro, Àlex, Marc, Irene, Paula i Sergi per estar sempre disposats a escolar-me. Amb vosaltres he descobert que no estic sola i que sempre tinc algú amb qui parlar, gràcies de tot cor. També vull agrair a les noies del Penya: Alba, Cintia, Marta, Eli i Julia que, tot i estar repartides pel món heu estat sempre a prop meu. Per seguir repartint agraïments també vull que arribin a Mallorca a na Marga, na Cata, les dues Cris, na Mc, na Joana Rosa, na Maria i na Marta que sempre s'han mantingut al meu costat.

La portada d'aquesta tesi ha estat possible gràcies a na Paula. Ha escoltat totes les meves idees i ha acabat plasmant-les amb un disseny perfecte. Gràcies per la portada i per la teva amistat. Espero que puguem compartir molts més projectes juntes.

Qui m'ha donat suport des del principi ha estat la meva família. Tant amb els que avui ho puc celebrar com amb els que ja no hi són. Sempre m'han encoratjat a continuar i a no rendir-me. Gràcies mama i papa per estar al meu costat. Si he arribat fins aquí ha estat pel vostre suport incondicional. Sé que moltes vagades no enteneu res de la conversació però gràcies per passar hores escoltant explicacions eternes de perquè no sortien els experiments. També vull agrair al meu germà Miquel. Me costa posar en paraules el que ha suposat el teu recolzament en aquesta camí. Has estat la veu que necessitava sentir en els mals moments, els teus consells m'han fet arribar fins aquí. No dubtis ni per un segon que aquesta tesi és aquí gràcies a tu.

Vull acabar amb la persona que sempre s'ha mantingut al meu costat. L'Oriol. El teu suport i comprensió m'han fet continuar. Gràcies per ser el millor company de vida que hagi pogut triar. Qui més es passaria caps de setmana sencers al laboratori només per fer-me companyia? Podria escriure una tesi més només de lo agraïda que estic però tot es podria resumir en un t'estimo.

Sinopsi

El manteniment de l'homeòstasi en organismes adults és cabdal per la continuïtat dels individus; desregulacions d'aquest equilibri porten a l'aparició de malalties. La planària és un model d'estudi en regeneració i remodelació tissular capaç de canviar la mida del seu cos i recuperar les estructures perdudes. Per tal de poder mantenir aquesta plasticitat les planàries han de tenir una regulació estreta de tots els seus processos cel·lulars. En aquest treball s'estudia el paper de dues vies de senyalització que s'han demostrat imprescindibles per al manteniment de l'homeòstasi: la via Hippo i FoxO. La desregulació de la via Hippo ha demostrat que té efectes severos en altres organismes com, per exemple, l'aparició de processos tumorals. En planàries hem pogut demostrar que la desregulació d'aquesta via provoca efectes a la mitocòndria que podrien desencadenar en la pèrdua de l'equilibri homeostàtic. També s'ha observat que la cinasa principal de la via, Hpo, està regulada pel factor de transcripció FoxO. En aquest treball es descriu que la pèrdua de FoxO en planàries també provoca deficiències en el manteniment de les estructures de la planària relacionats amb la inhibició de l'apoptosi i la desregulació de l'eliminació d'espècies reactives del oxigen. Per tal de poder entendre millor la xarxa gènica que regula el manteniment de l'homeòstasi en planàries s'ha posat a punt un nou mecanisme de seqüenciació basat en la tecnologia de Oxford Nanopore Technologies. Aquesta estratègia ha permès obtenir informació sobre nous gens implicats en el manteniment de l'homeòstasi en planàries.

Abstract

Homeostasis is key to maintain healthy individuals; deregulation of this balance could lead to illness. Planarians are an animal model in the study of regeneration and tissue renewal able to change their body size and regenerate any missing tissue. To do so planarians must maintain a tight regulation of their cellular processes. In this study we focus in two important signaling pathways to maintain homeostasis: FoxO and Hippo. Deregulation of Hippo have been demonstrated to have severe effects. In many organisms the Hippo pathway have been associated with the initiation of the tumoral process. In this work we demonstrate that, in planarians, downregulation of the pathway has an effect in mitochondria who could be responsible of the loss of homeostasis. We also observed that the main kinase of the Hippo pathway is regulated by the transcription factor FoxO. In this study we described the loss of FoxO in planarians leads to deficiencies in the maintenance of important planarian structures. This phenotype is related to apoptosis inhibition and the cellular capacity of detoxifying reactive oxygen species. To further understand the genetic background regulating homeostasis in planarian we set up a new sequencing technique. This technique based in the Oxford Nanopore Technology were able to obtain useful data to undercover key genes implicated in the preservation of the homeostasis.

Contingut

INTRODUCCIÓ **1**

| | |
|---|-----------|
| 1. La planària com a organisme model per a l'estudi de la regeneració i l'homeòstasi | 1 |
| 1.1. Schmidtea mediterranea | 1 |
| 1.2. Estructures i òrgans de la planària | 3 |
| 1.3. Les cèl·lules mare de la planària: els neoblasts | 5 |
| 1.4. Plasticitat tissular | 7 |
| 1.5. Metabolisme | 10 |
| 2. La mitocòndria com a orgànu reguador de la cèl·lula | 11 |
| 2.1. Estructura i dinàmica mitocondrial | 11 |
| 2.2. Reguació de la homeòstasi cel·lular a través de l'estructura de la mitocòndria | 14 |
| 3. La via Hippo com a integradora de senyals | 19 |
| 3.1. Elements principals de la via | 19 |
| 3.2. Integració de senyals | 22 |
| 3.3. La via Hippo en planàries | 22 |
| 4. foxo com a gen clau en la reguació de la homeòstasi cel·lular | 25 |
| 4.1. Reguació de foxo | 25 |
| 4.2. Control de la mort cel·lular | 27 |
| 4.3. Longevitat | 28 |
| 5. Les tècniques d'alt rendiment com a eina d'estudi genòmic | 30 |
| 5.1. La seqüenciació massiva | 30 |
| 5.2. Marc actual de la genòmica en planàries | 31 |

OBJECTIUS **34**

RESULTATS **35**

| | |
|--|-----------|
| 1. Implicació de les mitocòndries en el funcionament de la via Hippo en planàries | 35 |
|--|-----------|

| | | |
|----------------------------|---|------------|
| 1.1. | Anàlisi transcripcionals de les dianes de la via Hippo | 35 |
| 1.2. | Estudi funcional de gens diana de la via Hippo | 38 |
| 1.3. | Estructura de les mitocondries després de la inhibició de <i>hpo</i> | 41 |
| 1.4. | Capacitat bioenergètica mitocondrial després de la inhibició de <i>hpo</i> | 45 |
| 2. | Caracterització de <i>foxo</i> i la seva implicació en la homeòstasi cel·lular en planàries | 47 |
| 2.1. | Anàlisi funcional de <i>foxo</i> | 47 |
| 2.2. | Estudi de la proliferació i la mort cel·lular després de la inhibició de <i>foxo</i> | 49 |
| 2.3. | Observació de l'epidermis en animals <i>foxo</i> RNAi | 52 |
| 2.4. | Canvis en els nivells de ROS relacionats amb la funció de <i>foxo</i> | 54 |
| 2.5. | Regulació de <i>hpo</i> a través de <i>foxo</i> | 56 |
| 3. | Establiment de la seqüenciació utilitzant ONT per a l'estudi dels estats nutricionals en planàries | 58 |
| 3.1. | Anàlisi del rendiment del mètode de seqüenciació | 58 |
| 3.2. | Assemblatge <i>de novo</i> del transcriptoma | 60 |
| 3.3. | Anotació dels <i>contigs</i> | 64 |
| 3.4. | Anàlisi d'expressió diferencial | 65 |
| DISCUSSIÓ | | 75 |
| 1. | Gens diana de la via Hippo | 75 |
| 2. | El paper de les mitocondries en la via Hippo | 78 |
| 3. | Limitacions tècniques de l'estudi de les mitocondries en planàries | 81 |
| 4. | Estudi de la funció de <i>foxo</i> en planàries | 83 |
| 5. | Relació entre <i>foxo</i> i la via Hippo | 86 |
| 6. | Senescència en planàries regulada per FoxO | 88 |
| 7. | Avaluació de l'obtenció de dades de transcriptòmica utilitzant ONT | 90 |
| 8. | Adaptació de les planàries a diferents condicions fisiològiques | 93 |
| CONCLUSIONS | | 97 |
| MATERIALS I MÈTODES | | 99 |
| BIBLIOGRAFIA | | 108 |
| ÍNDIX DE FIGURES | | 133 |
| ABREVIATURES | | 135 |

APÈNDIXS **I**

| | | |
|----|--|-----|
| 1. | Gens desregulats després de la inhibició de la via Hippo | II |
| 2. | Anàlisi d'ontologies gèniques del gens diana de la via Hippo | IV |
| 3. | Reconstrucció de les imatges de SBFSEM | V |
| 4. | Gens amb motius d'unió a FoxO | VII |
| 5. | Gens diferencialment expressats | IX |
| 6. | Anàlisi d'ontologies gèniques del DGE obtingut per ONT | XII |
| 7. | Intersecció de gens entre les diferents condicions experimentals | XV |

ARTICLES **XIX**

Introducció

1. La planària com a organisme model per a l'estudi de la regeneració i l'homeòstasi

El nom planària s'utilitza comunament per a referir-se a cucs plans del gènere triclàdide. Pertanyen al regne animal, concretament al filum Plathelminth, sent en un dels animals bilaterals més senzills, ja que no compten amb cavitat corporal ni òrgans circulatoris o respiratoris especialitzats. Les planàries es poden trobar a diferents parts del món i poden ser d'aigua dolça, salada o terrestres. Algunes espècies també són paràsits.

Els primers estudis que es van fer sobre les planàries va ser a finals del segle XIX per Thomas Hunt Morgan i Harriet Randolph (Randolph, 1897; Morgan, 1898) tot i que les seves capacitats regeneratives ja havien estat documentades al 1847 per John Graham Dalyell. Dalyell va escriure en el seu treball: "Allò que és una ferida mortal per a la majoria de la creació, en elles [les planàries] serveix per a despertar el principi actiu d'un poder reproductiu inesgotable" (Dalyell, 1814). En aquest llibre, l'autor també va descriure per primer cop la capacitat de les planàries de canviar la seva mida depenent de la disponibilitat de nutrients. Aquesta plasticitat va ser estudiada en detall gairebé un segle més tard (Abeloos, 1929; Reynoldson, 1966) demostrant que la plasticitat de les planàries va més enllà de la regeneració.

La fascinació d'aquests primers investigadors al segle XIX ha perdurat fins a l'actualitat. Així les planàries són un model d'estudi àmpliament utilitzat en l'estudi de la regeneració i de les cèl·lules mare en organismes adults.

1.1. *Schmidtea mediterranea*

Les planàries de la espècie *Schmidtea mediterranea* són cucs plans de vida lliure que habiten en aigua dolça. Aquesta espècie es troba fàcilment en rius i estanys de l'Oest de la Mediterrània. Taxonòmicament parant formen part del filum Plathelminth; classe Turbellaria; ordre Seriata; subordre Tricladida; família Dugesidae; gènere *Schmidtea* (Baguña i Riutort, 2004). Els organismes d'aquesta espècie poden ser sexuals o asexuals. Els individus sexuals són hermafrodites i es poden reproduir per fertilització creuada tot i que també ho poden fer per fissió (Hyman, 1951). La reproducció per fissió és el mètode de

reproducció utilitzat per la soca asexual que és divideix fissionant la cua per allargament.

L'espècie de planària més utilitzada actualment en investigació, i utilitzada en aquest treball, és la soca asexual de *S. mediterranea*, ja que té una taxa de regeneració molt ràpida i pot regenerar totes les parts del cos. Aquesta espècie va ser introduïda com a animal model al voltant del 1970 pel Dr. Jaume Baguña (Universitat de Barcelona) que recol·lectava les planàries en un estany artificial a Montjuïc, Barcelona. Anys més tard, es va establir una línia clonal d'aquesta variant asexual, fàcil de mantenir en condicions de laboratori i que permet obtenir resultats reproduïbles.

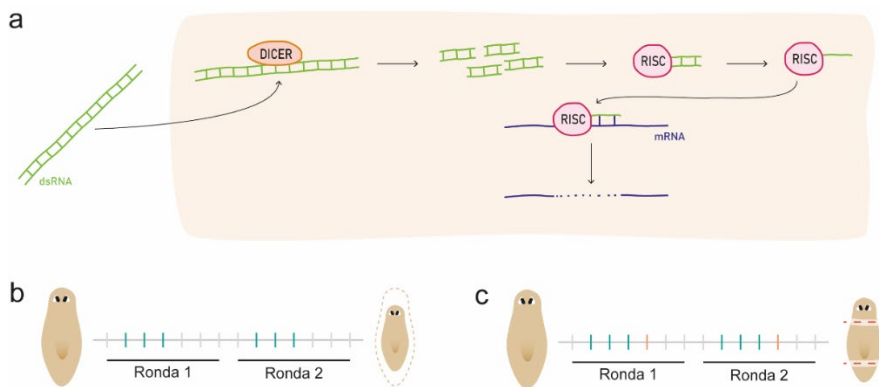


Figura 1. Funcionament de la inhibició de gens diana per RNAi.

a) Mecanisme de inhibició gènica per RNAi. La proteïna DICER és capaç de reconèixer qualsevol dsRNA i fragmentar-lo. Els fragments de dsRNA són després reconeguts pel complex RISC que els acabarà hibridant amb el mRNA de la cèl·lula. Un cop es produeix aquesta unió, RISC activa el seu centre catalític i degrada el de mRNA endogen tot inhibint-lo.

b) Esquema temporal de la inhibició per RNAi en animals intactes desdijunats. Cada ronda consta de 7 dies d'experimentació. En blau s'indiquen els dies d'injecció.

c) Esquema temporal de la inhibició per RNAi en animals regenerants. Cada ronda consta de 7 dies d'experimentació. En blau s'indiquen els dies d'injecció, en vermell els dies d'amputació.

Per tal de poder entendre els mecanismes que donen la plasticitat a les planàries, els animals són manipulats genèticament utilitzant tècniques d'RNA d'interferència (RNAi) (Alvarado i Newmark, 1999). Aquesta aproximació es basa en la utilització del sistema propi de l'organisme per a la silenciament gènica a través del complex Dicer-RISC (Kurreck, 2009). Aquestes proteïnes s'encarreguen d'interactuar amb el RNA de doble cadena (dsRNA) i silenciar el gen complementari a la seqüència identificada (Figura 1a). Gràcies a aquest sistema podem introduir RNA de doble cadena del gen d'interès per a poder inhibir-lo. A les planàries, la interferència es realitza en rondes, que corresponen a setmanes. Així, s'injecta el dsRNA a la zona post faríngia de la

planària durant tres dies consecutius, després s'espera a la setmana següent per iniciar una nova ronda. El nombre de rondes necessari depèn de la penetrància i expressivitat observada a l'inhibir el gen en concret. Després de cada una d'aquestes rondes es pot procedir o no a l'amputació de l'animal depenent de si es volen veure els afectes en regeneració o en animals intactes, usualment en decreixement ja que no solen menjar durant la duració de l'experiment (Figura 1b-c). Fins ara, altres tècniques de manipulació gènica, com la transgènesi, no s'han pogut aplicar satisfactòriament en planàries. A més dels assajos funcionals per a la inhibició de gens, hi ha altres tècniques moleculars que s'han establert en planàries per tal d'estudiar els mecanismes moleculars de la plasticitat cel·lular, com són la possibilitat de marcar diferents proteïnes per immunohistoquímica (Forsthoefel *et al.*, 2018) o bé de marcar RNA per hibridacions *in situ* (Pearson *et al.*, 2009; Currie *et al.*, 2016). També es poden estudiar altres mecanismes moleculars com la mort cel·lular, a través de la detecció de l'activitat de la Caspasa 3 (González-Estévez *et al.*, 2007) i TUNEL (Pellettieri *et al.*, 2010). Cal destacar també que les diferents tècniques de microscòpia també han permès entendre millor el funcionament i les estructures de la planària.

1.2. Estructures i òrgans de la planària

Les planàries són animals bilaterals amb un eix dorsoventral i anteroposterior ben diferenciat. A diferència de la majoria d'animals bilaterals les planàries són organismes acelomats, és a dir, entre la paret del cos i l'intestí existeix una massa de cèl·lules anomenada mesènquima a més de les fibres musculars.

El cos de la planària està recobert per una capa de moc. Aquest moc és sintetitzat a les cèl·lules del mesènquima, emmagatzemat en estructures vesiculars anomenades rabdites i és finalment secretat per les cèl·lules epidèrmiques (Lentz, 1967). La principal funció d'aquest moc és la protecció de l'animal enfront a la dessecació i a certs depredadors. Les cèl·lules epidèrmiques de les planàries són una monocapa de cèl·lules post-mitòtiques i diferenciades que poden presentar o no cilis (Figura 2a). Els cilis, entre altres funcions, permeten la locomoció de les planàries i per aquest motiu hi ha una major quantitat de cèl·lules ciliades a la part ventral de la planària. Tot això converteix l'epidermis de la planària en una estructura complexa tot i només comptar d'una sola capa de cèl·lules (Tyler, 1984). El color marró que es pot observar a les planàries no prové de les cèl·lules epidèrmiques sinó de cèl·lules pigmentàries. Aquestes cèl·lules, especialitzades en la producció de grànuls pigmentaris, es troben en el mesènquima, però comptem amb amplies ramificacions que arriben fins a la zona subepidèrmica (Palladini *et al.*, 1979). Els grànuls pigmentaris estan compostats per ommocroms i porfirines que atorguen el color marró característic de la planària (Stubenhaus *et al.*, 2016).

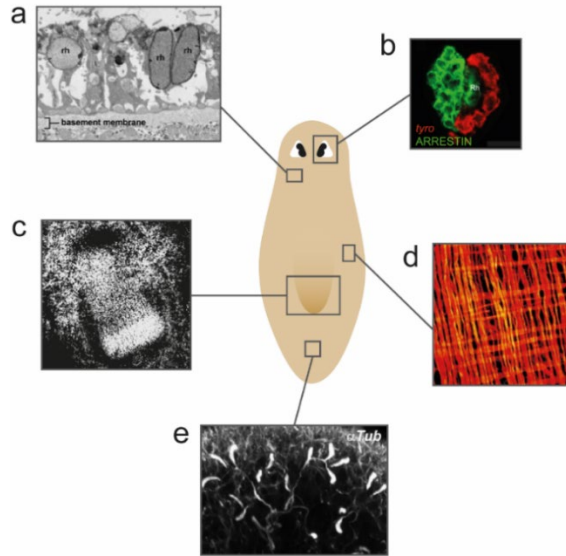


Figura 2. Òrgans i estructures principals de les planàries.

a) Epidermis. Estructura de l'epidermis observada amb microscòpia electrònica. A la imatge es pot observar, de baix a dalt, la musculatura circular, la làmina basal, i les cèl·lules epidèrmiques. A la zona més apical de les cèl·lules epidèrmiques es poden observar les rabdites (Rh) (Cheng *et al.*, 2018).

b) Sistema òptic. A la imatge es poden apreciar els fotoreceptors en verd (marcats amb anti-arrestina) i en vermell la copa pigmentària, que dona el color negre característic als ulls (Lapan i Reddien, 2011).

c) Faringe. Faringe de la planària observada a partir del marcatge de nuclis amb DAPI.

d) Fibres musculars. Imatge de les fibres musculars més externes de la planària, les fibres circulars, marcades amb l'anticòs TMUS-13 (Cebrià *et al.*, 1997).

e) Protonefridis. Detall de la protonefridis que formen el sistema excretor de la planària, marcats amb anti-Tubulina (Rink, Vu i Alvarado, 2011).

El sistema nerviós de les planàries consta d'un sistema nerviós central amb un cervell bilobulat connectat a dos cordons nerviosos (Figura 3a). Els cordons nerviosos s'estenen longitudinalment a través del tot el cos de la planària (Cebrià *et al.*, 2002) (Figura 2f). A més del cervell i els cordons nerviosos, el sistema nerviós central de la planària inclou un sistema visual. Aquest sistema visual consta de dos ulls formats pels fotoreceptors, que connecten amb el lòbul del cervell oposat i es creuen formant el quiasma òptic, i les cèl·lules pigmentàries, que són les que es veuen en el cap de la planària degut al seu color marró fosc (Lapan i Reddien, 2012) (Figura 2b).

Les planàries presenten un sistema muscular organitzat en tres tipus de fibres diferenciades: circulars, longitudinals i diagonals (Figura 2d). Les fibres circulars són les més externes i envolten l'animal en l'eix dorsal-ventral. La següent capa muscular està composta per fibres longitudinals i van en direcció de l'eix antero-posterior de l'animal. A *S. mediterranea* podem trobar

dues capes de fibres longitudinals: la més externa, propera a les fibres circulars i una més interna i gruixuda. Les fibres diagonals les podem trobar entre les dues capes de fibres longitudinals. Aquest capa de fibres diagonals permet que el cos de les planàries tingui una alta extensibilitat (Cebrià, 2016). Les planàries manquen de sistema esquelètic per la qual cosa la capa muscular fa la funció de mantenir la forma i la integritat del cos, a més de contribuir a la locomoció conjuntament amb els cilis.

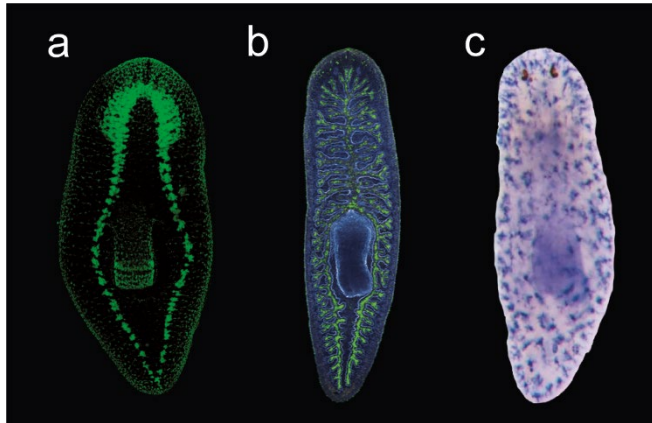


Figura 3. Sistemes de la planària.

a) Sistema nerviós. Marcatge de les connexions sinàptiques la de la planària amb l'anticòs anit-Sinapsina

b) Sistema digestiu. En verd es poden observar les cèl·lules intestinals. Imatge del laboratori del Dr. Newmark (EEUU).

c) Sistema excretor. Marcatge dels protonefridis al llarg de la planària (*innexin-10*) (Elliott i Sánchez Alvarado, 2013).

L'alimentació de les planàries es fa a través de la faringe, localitzada en la zona ventral. Aquesta estructura és mòbil i extensible, i permet l'obtenció d'aliment i l'eliminació de substàncies de rebuig (Figura 2c). L'aliment, un cop ingerit, és distribuït a través de tot l'animal gràcies al sistema digestiu. Aquest sistema consta de tres branques principals que es van ramificant permetent la difusió de l'aliment a totes les parts del cos (Figura 3b). Les substàncies de rebuig són eliminades a través de la faringe o del sistema excretor compost per protonefridis (Figura 2e i Figura 3c). Els protonefridis són un sistema tubular que conté cèl·lules filtradores capaces de filtrar el líquid intersticial per tal de poder eliminar composts nocius per l'animal derivats del metabolisme (McKanna, 1968).

1.3. Les cèl·lules mare de la planària: els neoblasts

Una de les característiques principals que han convertit les planàries en organismes model és la presència d'una abundant població de cèl·lules mare anomenades neoblast. El terme neoblast en planàries va començar a ser

utilitzat gràcies a Harriet Randolph quan al 1892 els va definir com a “cèl·lules petites i indiferenciades similars a cèl·lules embrionàries trobades en algunes espècies de cucs terrestres” (Randolph, 1892). L'observació a través de tècniques de microscòpia electrònica va poder determinar que els neoblasts en planàries són cèl·lules petites (7-12 μm) amb un nucli que ocupa la majoria de la superfície cel·lular (Figura 4). Al citoplasma es poden observar unes estructures elecrodenses anomenades cossos cromatoides compostes per RNA i proteïnes. Aquestes estructures s'han relacionat amb la capacitat de mantenir l'estat indiferenciat (Auladell, Garcia-Valero i Baguñà, 1993). Els neoblasts es troben repartits al llarg de tot el cos de la planària a excepció de la punta del cap i la faringe (Figura 4).

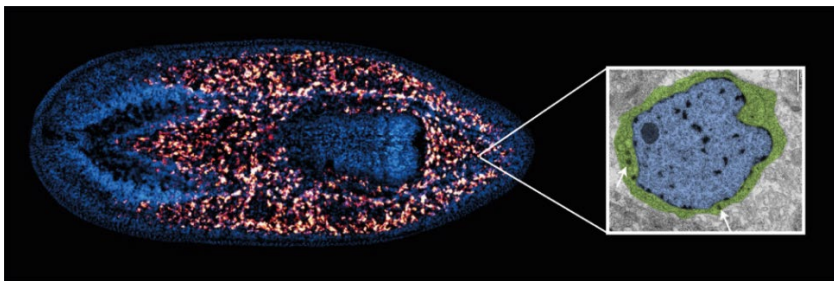


Figura 4. Neoblast de les planàries.

La imatge de l'esquerra mostra la distribució dels neoblasts al llarg de la planària. En vermell-taronja destaquen els neoblasts repartits per tot el cos a excepció de la faringe i la punta del cap. A la dreta, una imatge de microscòpia electrònica de transmissió d'un neoblast de *S. mediterranea*. Es pot observar que el nucli ocupa la major part de la superfície cel·lular. En blau, el nucli i en verd, el citoplasma. Les fletxes indiquen els cossos cromatoides (King i Newmark, 2012).

Harriet Randolph va postular que els neoblasts eren similars a cèl·lules embrionàries. Aquesta definició no dista de la realitat. Els neoblasts són cèl·lules totipotents i, per tant, poden donar lloc a tots els tipus cel·lulars de l'animal, tal com ho fan les cèl·lules embrionàries. Gràcies a aquesta població de cèl·lules mare les planàries presenten la plasticitat cel·lular que les caracteritza. Les primeres demostracions de la implicació dels neoblasts en la regeneració i remodelació en planàries arriben a mitjans del segle XX. En aquests experiments s'eliminaven tots els neoblasts mitjançant irradiació i es comprovava que els animals perdien la capacitat regenerativa i acabaven morint (Wolff i Dubois, 1948). Per tal de poder rescatar la plasticitat cel·lular s'injectaven diferents extractes cel·lulars provinents d'un animal donant no irradiat i es comprovava si es restablí la capacitat regenerativa. És va comprovar que quan s'injectaven extractes cel·lulars que contenien cèl·lules diferenciades els animals no recuperaven la capacitat de regenerar i acabaven morint, però quan s'injectaven neoblasts hi havia una petita taxa de supervivència i aquests animals podien regenerar normalment (Baguñà, Saló i

Auladell, 1989). Aquest experiment va ser la primera demostració de què els neoblasts eren les cèl·lules encarregades de proveir la capacitat regenerativa a les planàries i descartava la desdiferenciació de cèl·lules diferenciades com a mecanisme d'obtenció de noves cèl·lules. Aquest descobriment va suposar una ruptura en el paradigma de la regeneració establert, on la majoria de models de regeneració es basen en la desdiferenciació de cèl·lules diferenciades per donar lloc a les noves estructures (Seifert i Muneoka, 2018; Joven, Elewa i Simon, 2019; Marques, Lupi i Mercader, 2019).

La identificació dels neoblasts com a precursors de totes les cèl·lules de la planària obre un nou debat: hi ha una única colònia homogènia de cèl·lules totipotents o el que anomenem neoblasts és en realitat un conjunt heterogeni de cèl·lules amb capacitat de donar lloc a diferents llinatges cel·lulars? Al 2011 es va demostrar que, trasplantant un únic neoblast en animals irradiats es podien obtenir tots els tipus cel·lulars de la planària, derivats d'aquesta única cèl·lula, i que acabarien recuperant la capacitat regenerativa i homeostàtica de la planària (Wagner, Wang i Reddien, 2011). És així com es va definir una població de neoblasts anomenada neoblasts clonogènics o cNeoblasts. Aquest experiment demostra la presència dels cNeoblasts com a cèl·lula totipotent però amb l'aparició de la seqüenciació d'una sola cèl·lula (scSeq) es va demostrar que hi ha altres poblacions de neoblasts amb destins cel·lulars restringits (Van Wolfswinkel, Wagner i Reddien, 2014; Molinaro i Pearson, 2016; Fincher *et al.*, 2018; Plass *et al.*, 2018; Swapna *et al.*, 2018). Les anàlisis de scSeq han permès, a més de definir diferents poblacions cel·lulars de les planàries, trobar marcadors dels diversos llinatges cel·lulars, des del neoblast fins als diferents tipus de cèl·lules diferenciades.

1.4. Plasticitat tissular

Les planàries s'han convertit en un organisme model gràcies a la seva alta capacitat de remodelar i regenerar la totalitat del seu cos. Aquesta gran plasticitat tissular en organismes adults les fa un animal perfecte per a poder entendre quins són els senyals que guien la formació de noves estructures així com les vies de senyalització que permeten un correcte posicionament de tots els òrgans i teixits en un organisme adult.

Regeneració

L'amplia població de neoblasts present a la planària és la responsable de l'alta capacitat regenerativa d'aquest animal. Quan hi ha una amputació de qualsevol part de la planària, el primer pas del procés regeneratiu és el tancament de la ferida. Quan es talla una planària, els epitelis de la ferida contacten entre si i una petita capa d'epidermis antiga cobreix la ferida en menys d'una hora (Baguna *et al.*, 1988). Un cop s'ha tancat la ferida hi ha l'activació de diversos gens responsables del procés regeneratiu i de la formació del blastema. El blastema és una zona sense pigmentació que apareix a una zona on hi ha hagut un tall o amputació i on s'agrupen diferents cèl·lules parenquimàtiques indiferenciades que permetran la regeneració dels teixits perduts de la planària.

Estudis recents apunten que el senyal iniciador del procés regeneratiu, i per tant la formació del blastema, és un augment de les espècies reactives de l'oxigen (ROS) (Pirotte *et al.*, 2015; Jaenen *et al.*, 2021). Els pics de ROS detectats després del tancament de la ferida permeten l'activació de la via MAPK/ERK (Jaenen *et al.*, 2021) iniciant així la formació del blastema (Figura 5). La via MAPK s'ha demostrat que no té efectes en el tancament de la ferida però la seva acció és imprescindible per a la formació del blastema i per tant per a la iniciació de la regeneració (Owlarn *et al.*, 2017).

En el procés regeneratiu on, en el cas de la pèrdua de teixit, no només es recuperaran les estructures perdudes, sinó que també es readaptarà la mida del cos de la planària. Aquests canvis, tant locals, a la zona de la ferida, com globals, estan regulats per canvis temporals de la proliferació i de mort cel·lular. La resposta proliferativa s'inicia 6h després de l'amputació amb un augment de les mitosi al llarg de tot el cos de la planària. A les 48h posteriors a l'amputació trobem un segon pic proliferatiu, en aquest cas localitzat la regió propera al blastema on hi ha un augment de neoblasts que permeten la regeneració de les estructures perdudes. (Baguñà, 1976; Saló i Baguñà, 1984; Wenemoser i Reddien, 2010) (Figura 5). A més de la creació de nou teixit és important l'eliminació de cèl·lules per tal de regenerar noves estructures o bé adaptar la mida de la planària. A les 4h després del tall hi ha un primer pic de mort acumulada a la zona del blastema. A les 72h apareix un altre pic de mort cel·lular, en aquest cas generalitzat a tot el cos de la planària (Pellettieri *et al.*, 2010) (Figura 5). La resposta, tant proliferativa com a nivell de mort, que observem a partir de les 48h només es dona en animals que han tingut pèrdua de teixit però no apareixen quan hi he ferides que no requereixen una producció substancial de teixit, com les incisions (Pellettieri *et al.*, 2010; Wenemoser i Reddien, 2010).

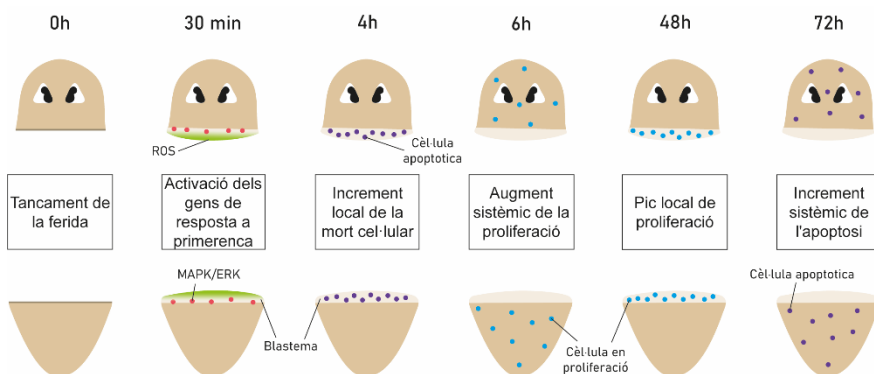


Figura 5. Procés de regeneració de les planàries.

El procés regeneratiu en planàries es basa primer lloc en tancar la ferida per tal de poder iniciar posteriorment la senyalització necessària per la formació del blastema. 4h hores després del tall inicial es produeix el primer pic apoptòtic que és localitzat en el blastema. El segon augment de mort cel·lular arriba a les 72h i en aquest cas afecta a

tot l'animal. Els canvis en la proliferació s'inicien 6h després de la lesió, on hi ha un augment sistèmic de la divisió cel·lular. Passades 48 hores hi ha un segon augment de la proliferació, localitzat al blastema.

Per tal de poder regenerar les estructures perdudes hi ha d'haver diverses senyals capaces de guiar quines estructures s'han de formar de nou. Aquesta informació posicional és proporcionada per una sèrie de gens que donaran lloc a molècules capaces de senyalitzar els neoblasts i formar les estructures correctes en la posició correcta. Aquests gens són anomenats gens d'informació posicional (*position control genes* o PCG) i constitueixen una xarxa gènica expressada constitutivament en organismes adults capaç de mantenir l'organització cel·lular i tissular de la planària durant la regeneració i la remodelació tissular. L'estudi d'aquests gens ha estat un dels camps on s'han fet grans avanços les últimes dècades. A través d'estudis de RNAi s'han anat descrivint gens importants pel manteniment dels diversos eixos de la planària però també per a la regeneració de diversos teixits o estructures (Sureda-Gomez i Adell, 2019). El teixit encarregat de l'expressió dels PCG és sobretot el múscul (Witchley *et al.*, 2013; Scimone *et al.*, 2016; Lucila Scimone, Cote i Reddien, 2017; Fincher *et al.*, 2018).

Canvi de la mida corporal

A més de poder regenerar qualsevol part del seu cos les planàries poden canviar la seva mida corporal per adaptar-se a la situació nutricional. Així quan les planàries es poden alimentar augmenten la seva mida, però en èpoques de falta d'aliment decreixen per tal de poder sobreviure. La taxa de creixement i decreixement depèn de la mida inicial de l'animal i de la temperatura ambient (Brøndsted i Brøndsted, 1961). En el cas de *S. mediterranea* la mida del cos es redueix un 76% després de 90 dies de dejú a 20°C (González-Estévez *et al.*, 2012). Durant tot aquest procés les proporcions del cos de la planària es mantenen fins a arribar a una mida mínima on hi ha pèrdua de les proporcions i l'animal acaba morint per lisi (Takeda, Nishimura i Agata, 2009).

Els mecanismes moleculars pels quals aquest canvi de mida ocorren estan lligats a canvis en el nombre de cèl·lules de la planària (Baguñà *et al.*, 1990). Quan hi ha una disminució de la mida s'ha demostrat que es mantenen un nivells basals de mitosi (Baguñà, 1976; González-Estévez *et al.*, 2012) i augmenta la mort cel·lular (Pellettieri *et al.*, 2010; González-Estévez *et al.*, 2012). El resultat d'aquet balanç és que es manté una proporció estable de neoblasts però disminueix el nombre de cèl·lules diferenciades i progenitors en alguns teixits a mesura que ve disminuint la mida de l'animal (González-Estévez *et al.*, 2012). Durant aquest procés també hi ha l'activació de diferents PCG que permeten el correcte escalat del cos (Witchley *et al.*, 2013; Scimone *et al.*, 2016; Lucila Scimone, Cote i Reddien, 2017; Fincher *et al.*, 2018).

1.5. Metabolisme

La planària és un organisme increïblement plàstic capaç d'adaptar-se a diferents situacions nutricionals. Aquestes característiques fan molt interessant poder estudiar el metabolisme d'aquests animals però tot i això el coneixement en aquesta àrea és molt limitat. Entendre com les planàries processen el nutrients permet saber com obtenen l'energia necessària per viure però també s'ha demostrat, en molts altres organismes, que els canvis en el metabolisme impliquen canvis en les funcions de la cèl·lula (Ghosh-Choudhary, Liu i Finkel, 2020).

Des dels inicis del segle XX es va començar a estudiar el consum d'oxigen com a mesura de la taxa metabòlica en planàries. Aquests primers estudis clàssics varen establir que en planàries alimentades hi ha un augment de la taxa metabòlica (Child, 1911; Allen, 1919; Hyman, 1919). L'evolució del consum d'oxigen en animals dejunats ha donat lloc a resultats diversos, però sembla que quan les planàries decreixen mantenen (Pedersen, 1956) o augmenten la seva taxa metabòlica (Child, 1911; Allen, 1919; Hyman, 1919). Estudis més recents realitzats en animals sense alimentar han demostrat que en animals més petits hi ha un major consum d'oxigen i que aquesta variació de la taxa metabòlica és proporcional al nombre de cèl·lules de la planària (Osuma *et al.*, 2018; Thommen *et al.*, 2019). Aquest fet és sorprenent ja que, en general, durant processos de dejuni els animals disminueixen la taxa metabòlica i que aquesta torna a augmentar quan hi ha disponibilitat de nutrients (McCue, 2013). Tot i ser una línia d'investigació iniciada fa més de 100 anys encara és un gran incògnita el mecanisme pel qual les planàries regulen la seva taxa metabòlica en relació a la seva plasticitat cel·lular. S'han fet pocs estudis dels canvis metabòlics durant la regeneració, però recentment s'ha pogut relacionar el procés regeneratiu amb un increment de la glicòlisis anaeròbica (Osuma *et al.*, 2018).

Les tècniques de seqüenciació massiva estan permetent començar a identificar vies metabòliques clau en planàries. Estudis de reconstruccions metabòliques comparats han permès establir algunes peculiaritats metabòliques de *S. mediterranea*. Aquesta espècie de planària presenta mecanismes d'obtenció d'energia a partir del metabolisme d'àcids grassos i de la degradació d'aminoàcids ramificats que no apareixen en altres platihelminths (Swapna *et al.*, 2018).

2. La mitocòndria com a orgànel regulador de la cèl·lula

Les mitocòndries són un orgànel cel·lular clàssicament associat a la producció de l'energia necessària per a la cèl·lula. Aquest orgànel es va descriure per primer cop al voltant de 1840 per diversos investigadors però no va ser fins al 1898 que Carl Benda va establir el nom de mitocòndria (Benda, 1898). L'etimologia de la paraula prové dels mots grecs mitos (μίτος = fil) i khondros (χονδρίον = grànel) fent referència a la seva estructura de grànuls allargats. A partir de l'entrada del segle XX l'estudi d'aquests petits orgànuls va desvelar que la seva funció anava més enllà de la producció d'energia en forma d'ATP. Es va descobrir la seva implicació en la regulació del metabolisme i l'homeòstasi general. Actualment es continua investigant la possible implicació dels canvis en la mitocòndria en diverses patologies complexes com, per exemple, el càncer (Liu i Shi, 2020).

2.1. Estructura i dinàmica mitocondrial

La mitocòndria és un orgànel que consta de dues membranes. La membra externa (MEM) està recoberta de diferents proteïnes en forma de canal anomenades porines. Aquestes permeten l'entrada de diferents metabòlits. També podem trobar enzims encarregats dels primers passos en l'elongació d'àcids grassos entre altres (Figura 6a). A l'espai entre les dues membranes trobem l'espai intermembrana (EIM) o espai perimitocondrial. El citocrom C es localitza en aquest espai i és alliberat quan la membrana externa es trenca en processos apoptòtics (Figura 6b). La membrana interna (MIM) està plegada sobre ella mateixa formant les crestes mitocondrials. Aquests replegaments permeten augmentar la superfície de membrana interna ja que és en aquesta membrana on es troben localitzats els enzims de la cadena respiratòria encarregats de la formació d'ATP. També podem trobar diferents proteïnes de transport que permeten el pas controlat de proteïnes a l'interior de la mitocòndria (Figura 6c). Finalment, trobem l'espai més intern de l'orgànel, anomenat matriu (MM). La matriu és un espai molt ric en proteïnes, ja que és aquí on ocorren la majoria de les reaccions metabòliques principals, com per exemple el cicle de Krebs o l'oxidació del piruvat i els àcids grassos. En aquest espai és també on es localitzen diverses còpies del genoma mitocondrial (mtDNA). Aquest genoma es troba en forma de DNA circular de doble cadena altament empaquetat. La MM també té ribosomes propis de la mitocòndria a més de tota la maquinària que permet traduir els gens mitocondrials (Figura 6d).

L'origen simbiòtic de la mitocòndria va ser proposat per Lynn Margulis al 1967 (Sagan, 1967) i és la teoria més acceptada actualment. La científica nord-americana va proposar que l'origen de la cèl·lula eucariota prové d'un procés simbiòtic entre essers unicel·lulars amb diferents característiques metabòliques

i fisiològiques. Aquesta teoria explicaria la peculiar doble membrana present a la mitocondria i la seva alta especialització en la producció d'energia.

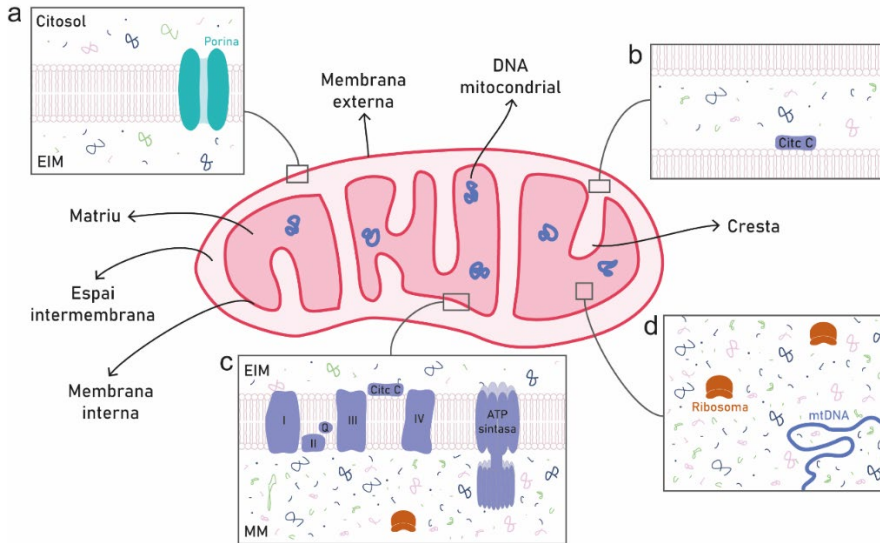


Figura 6. Estructures de la mitocondria.

a) Representació de la membrana externa mitocondrial. La membrana externa mitocondrial (MEM) està travessada per diferents proteïnes intermembrana, anomenades porines, que la fan altament permeable a diferents molècules.

b) Representació de l'espai intermembrana mitocondrial. L'espai intermembrana (EIM) té una composició molecular similar a la del citosol tot i que compta amb proteïnes pròpies de la mitocondria com el citocrom C.

c) Representació de la membrana interna mitocondrial. La membrana interna mitocondrial (MIM) és rica amb proteïnes especialitzades com la cadena transportadors d'electrons i la ATP sintasa.

d) Representació de la matriu mitocondrial. La matriu mitocondrial (MM) té una composició pròpia on es localitzen un gran quantitat d'enzims metabòlica així com els ribosomes propis de la mitocondria i el DNA mitocondrial (mtDNA).

Les mitocondries no es poden entendre com a elements individuals sinó que són òrgànuls plàstics interrelacionats capaços de formar xarxes complexes. Els canvis en la morfologia de la mitocondria es porten a terme a través dels processos de fusió i fissió. En la realització d'aquests processos hi estan involucrades GTPases de la família de les dinamines que es troben conservades en una gran varietat d'organismes, des de llevats fins a humans (Hoppins, Lackner i Nunnari, 2007).

El procés de fusió implica la unió de dues mitocondries per formar un nou òrgànul. Els processos de fusió de membrana són comuns en diversos sistemes de la cèl·lula, com a l'aparell de Golgi o en el transport de vesícules extracel·lulars, però el cas de la mitocondria és més complex ja que s'ha de

coordinar la fusió de dues membranes. El procés s'inicia per la unió de la membrana externa a través d'una GTPasa de membrana. Aquestes proteïnes estan altament conservades: en llevats (Rapaport *et al.*, 1998); en la mosca de la fruita (Hales i Fuller, 1997), on s'anomena Fuzzy Onions (Fzo); i en humans, que consta de dos homòlegs, la Mitofusina 1 i 2 (Mfn1/2) (Eura *et al.*, 2003). Quan les Mfn de dues membranes externes mitocondrials es reconeixen a través dels seus dominis citosòlics permeten la unió de les dues membranes externes en una sola. Per tal de permetre la unió de la membrana interna, la Mfn forma un complex amb una nova GTPasa associada a la MIM; OPA1. OPA1 és una proteïna que està altament conservada des de llevats fins a mamífers (Pelloquin *et al.*, 1998; Alexander *et al.*, 2000). La formació del complex Mfn-OPA1 permet la unió de les dues membranes internes finalitzant el procés de fusió (Figura 7a). Durant aquests processos tots els components de la matriu de les dues mitocòndries (DNA, enzims, ribosomes...) es mesclaran en la nova matriu.

La fissió mitocondrial és el procés pel qual una sola mitocòndria es divideix en dos nous orgànuls. El procés de fissió comença gràcies a l'acció de Drp1, que és reclutat des del citosol fins a la MEM per interacció amb Fis1 i Mdv1. Drp1 és una GTPasa que es troba en forma soluble al citosol i s'ha descrit en diversos animals, des del llevat (Dnm1p) (Bleazard *et al.*, 1999), passant per cucs (DRP-1) (Labrousse *et al.*, 1999) i fins als mamífers (Smirnova *et al.*, 2001). Fis1 és una proteïna transmembrana de la MEM amb un domini extern exposat al citosol que es troba distribuït per tota la superfície mitocondrial (Mozdy, McCaffery i Shaw, 2000). Mdv1 és una proteïna que permet la interacció entre Drp i Fis1. En el procés de fissió, Drp1 homoligomeritza i és reclutat a la mitocòndria per Fis1-Mdv1. Aquestes proteïnes, formen un anell al voltant de membrana externa on gràcies a l'acció conjunta del complex Drp1-Fis1-Mdv1 hi ha una constricció de les membranes. Aquesta unió donarà lloc a la separació de l'orgànul en dues noves unitats independents (Shaw i Nunnari, 2002; Cerveny i Jensen, 2003) (Figura 7b). La divisió de les mitocòndries es realitza de forma síncrona repartint de forma equitativa el material genètic i proteic.

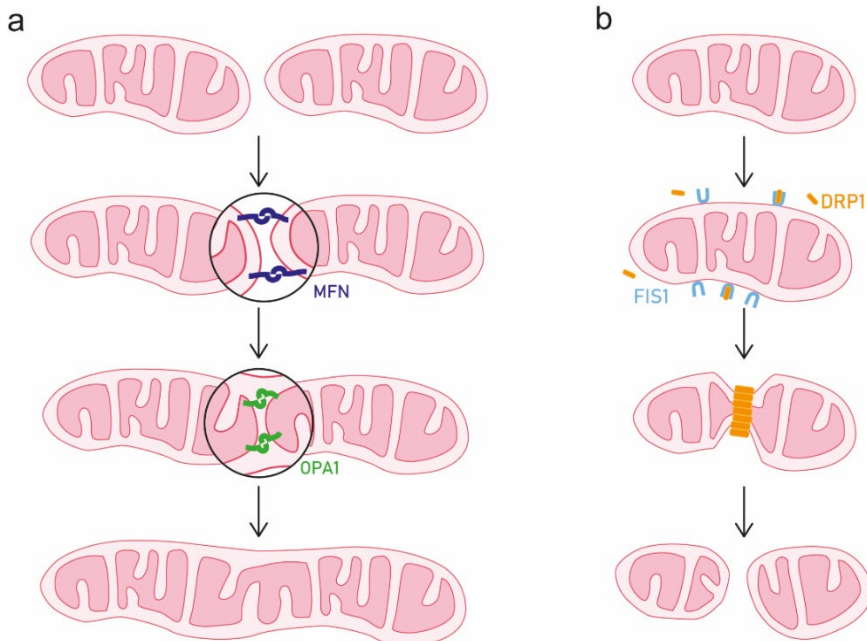


Figura 7. Mecanisme de fusió i fissió mitocondrial.

a) Representació gràfica del sistema de fusió mitocondrial. La fusió mitocondrial s'inicia amb la unió de la membrana externa a través de la Mitofusina (MFN) seguit per l'acoblament de la membrana interna per part de la proteïna mitocondrial OPA1.

b) Representació gràfica del sistema de fissió mitocondrial. La fissió mitocondrial requereix de l'expressió del receptor de membrana externa FIS1 que reconeix la proteïna DRP1. Gràcies a aquesta unió es forma un anell al voltant de la mitocòndria que permet la seva divisió.

2.2. Regulació de la homeòstasi cel·lular a través de l'estructura de la mitocòndria

La mitocòndria és l'eix central de la formació d'energia, per això, canvis en la mitocòndria provoquen canvis en el metabolisme cel·lular que poden afectar a l'homeòstasi de tota la cèl·lula. Tot i la gran importància del metabolisme, la mitocòndria no és només la "central energètica" de la cèl·lula sinó que és un òrgan regulador amb implicacions en la producció de ROS, la regulació de l'estat diferenciat, en el progrés del cycle cel·lular o en l'apoptosi. L'efecte de la mitocòndria en la homeòstasi cel·lular pot ser regulada per la seva estructura, de forma que l'estructura mitocondrial pot condicionar el bon funcionament de la cèl·lula.

Apoptosi

Un dels camps més estudiats és la relació de la mitocòndria amb l'apoptosi. En el procés d'apoptosi s'han descrit dos mecanismes principals: l'extrínsec, activat per receptors de mort i l'intrínsec o mitocondrial. Ambdós processos

es diferencien en l'origen dels senyals però acaben convergint en l'activació de la Caspasa-3, que permet la mort cel·lular (Figura 8). La via extrínseca es caracteritza per la transmissió de senyals de mort des de l'exterior de la cèl·lula a l'interior a través de receptors de mort de la família TNF. La unió del lligand als receptors de mort inicia una cascada de senyalització que permet l'activació de la Caspasa-8 que acabarà iniciant l'execució de l'apoptosi mitjançant la Caspasa-3 (Ashkenazi i Dixit, 1998). La via intrínseca integra senyals procedents de canvis intracel·lulars que deriven en canvis en la membra mitocondrial. Els senyals pro-apoptòtics provoquen l'obertura dels porus de transició de permeabilitat mitocondrial i la pèrdua del potencial de membrana. A causa de la ruptura de la integritat de la membrana externa hi ha alliberament de molècules pro-apoptòtiques de la mitocòndria al citosol (Saelens *et al.*, 2004). Un primer grup de molècules pro-apoptòtiques, on destaca el Citocrom C, formen l'apoptosoma que permetrà l'activació de la Caspasa-9, que al seu torn interactuarà amb la Caspasa-3 activant la mort cel·lular. Un segon grup de molècules serà l'encarregada de translocar-se al nucli i fragmentar el DNA (Susin *et al.*, 2000). Tot i l'existència de dos mecanismes diferenciats d'apoptosi, s'ha demostrat que les dues vies de senyalització estan lligades i una pot influenciar l'altra (Igney i Krammer, 2002).

L'estructura de la mitocòndria pot modular la sensibilitat de la cèl·lula als senyals pro-apoptòtics. Durant l'apoptosi s'ha observat una fragmentació de la xarxa mitocondrial, donant lloc a un major nombre de mitocòndries més petites. Aquest fraccionament és a causa de l'acció de Drp1, que és reclutat a la mitocòndria per senyals pro-apoptòtics (Frank *et al.*, 2001; Karbowski *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004). També s'ha demostrat que en animals on s'impedeix aquest procés de fissió hi ha disminució de l'apoptosi en presència de senyals pro-apoptòtics (Sugioka, Shimizu i Tsujimoto, 2004). En aquests estudis s'ha demostrat la importància dels canvis en l'estructura mitocondrial en l'activació o resistència de l'apoptosi.

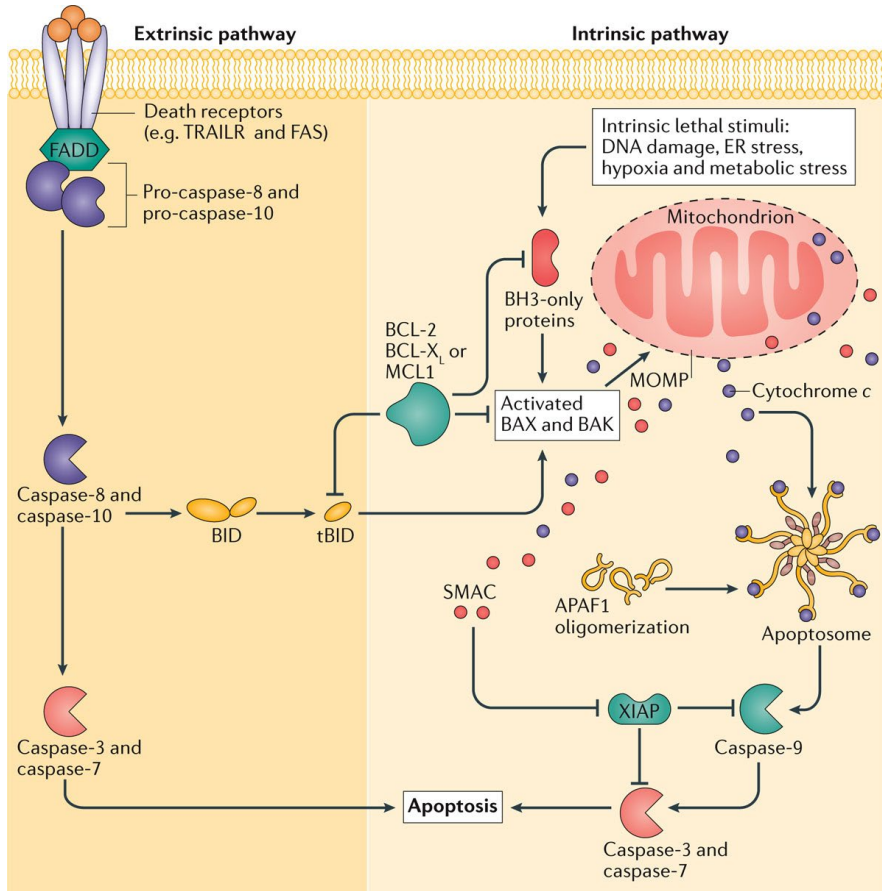


Figura 8. Vies d'apoptosi.

Molècules implicades en el procés apoptòtic. La via intrínseca permet l'activació de les Caspases efectores sense intervenció de la mitocondria. La via extrínseca es caracteritza per la formació de l'apoptosoma a través de la permeabilització de MEM i l'alliberació de Citocrom C (Ichim i Tait, 2016).

Producció d'espècies reactives de l'oxigen

Les espècies reactives de l'oxigen (ROS) són molècules amb poder reductor formades per ions d'oxigen (O₂⁻), radicals lliures d'oxigen (OH) o els seus derivats (H₂O₂). L'acumulació d'aquestes molècules estan associades a danys cel·lulars a causa del seu poder oxidatiu que pot provocar modificacions en proteïnes, lípids i àcids nucleics. Per exemple, modificacions en proteïnes poden alterar el funcionament de diferents enzims essencials (Stadtman i Levine, 2000) o bé l'oxidació del DNA, que provoca la ruptura de les cadenes donant lloc a apoptosi (Auten, Whorton i Mason, 2002). El paper de les ROS no sempre és deleteri. En localitzacions concretes i a baixes concentracions funcionen com a missatges cel·lulars, com per exemple en la regeneració en peix zebra (Helston i Amaya, 2021) o l'activació de la regeneració en planàries (Jaenen *et al.*, 2021). La formació de ROS pot ser endògena o exògena. La font

majoritària de ROS endògena són els enzims de la cadena respiratòria mitocondrial (Boveris, 1977).

L'augment de ROS provoca canvis en l'estructura mitocondrial. Sota l'estrès oxidatiu es modulen les proteïnes encarregades de la fusió i la fissió mitocondrial donant lloc a l'aparició d'un major nombre de mitocòndries petites. Aquest augment de la fissió pot ser rescatat en presència d'antioxidants que permeten de nou la fusió mitocondrial (Fan, Hussien i Brooks, 2010; Wu *et al.*, 2011). La relació entre ROS i l'estructura mitocondrial no és en una sola direcció. S'ha demostrat que en mutants on hi ha un augment de la fusió mitocondrial hi ha una disminució de ROS però aquests nivells augmenten quan hi ha un augment de la fissió (Yu, Robotham i Yoon, 2006; Yu *et al.*, 2008).

Control del cicle cel·lular

La divisió cel·lular és un procés altament regulat gràcies a diferents punts de control. La iniciació i progressió del cicle cel·lular només serà possible si es compleixen una sèrie de requisits. Els elements principals encarregats de controlar aquests processos són les ciclines i les cinases dependents de ciclines (CDKs). Durant el cicle cel·lular les mitocòndries canvien la seva morfologia. En la transició G1/S les mitocòndries sofreixen un procés de fusió per formar una estructura tubular hiperpolaritzada que haurà de ser fragmentada per entrar en mitosi. A l'acabar la mitosi es recupera l'estructura habitual de la xarxa mitocondrial (Figura 9). La formació de la gran xarxa tubular a l'entrada de la fase S permet a la mitocòndria produir més ATP i intermediaris necessaris per a la replicació del DNA. Aquesta estructura mitocondrial regula l'acció de la Ciclina E, permetent passar el punt de control de la fase G1/S del cicle (Mitra *et al.*, 2009). La fragmentació mitocondrial a l'inici de la fase M està regulada per la CDK1 i la ciclina B1. Aquestes dues molècules s'encarreguen de la fosforilació de la proteïna de fissió DRP1 permetent la fragmentació mitocondrial (Taguchi *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2014).

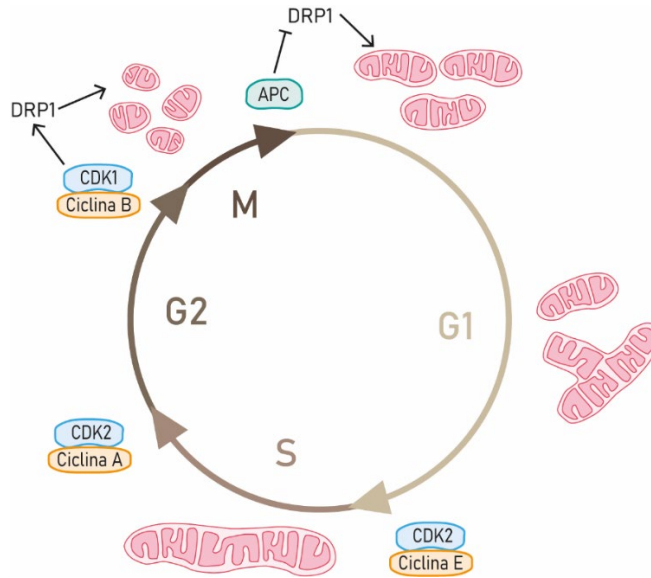


Figura 9. Regulació del cicle cel·lular a través de la dinàmica mitocondrial.

Canvis en l'estructura de la mitocondria són imprescindibles per a la progressió del cicle cel·lular. Per a l'entrada en la fase S s'estimula la fusió mitocondrial fins a la formació d'una mitocondria hiperfusió que s'ha de dividir per tal de poder entrar a la fase de mitosi. Durant la mitosi les mitocondries estan altament fissionades i es reparteixen en les cèl·lules filles. Figura modificada de Lopez-Mejia i Fajas (Lopez-Mejia i Fajas, 2015).

Destí cel·lular

Les mitocondries han demostrat ser un centre regulador de senyals que poden afectar a diferents funcions de la cèl·lula. Canvis en la seva estructura provoquen canvis en el flux d'energia cel·lular; una major fusió mitocondrial està relacionada amb l'augment d'activitat metabòlica i amb la producció d'energia per fosforilació oxidativa (OXPHOS), mentre que l'augment de la fissió és senyal de cèl·lules quiescents amb un metabolisme glicolític (Collins *et al.*, 2002). Aquests canvis en l'estat metabòlic de la cèl·lula han demostrat ser diferencials de diferents estats metabòlics. En el cas de la inducció de iPSCs s'ha demostrat que quan es realitza la reprogramació hi ha un canvi de l'ús de OXPHOS a glicòlisi i que aquesta reprogramació no és possible si no va lligada a l'activació de la maquinaria de fissió (Zhu *et al.*, 2010; Folmes *et al.*, 2011; Prieto *et al.*, 2016). Aquests canvis que ocorren en situacions fisiològiques també han estat relacionats en situacions patològiques com el càncer. Un dels descobriments més notables sobre els canvis metabòlics en càncer és l'efecte Warburg en el que és descrit que les cèl·lules cancerígenes canvien l'ús d'energia de OXPHOS a glicòlisi (Warburg, 1956). Tot i que en un principi s'havia postulat que aquest canvi era a causa de mitocondries defectuoses, actualment sabem que no és a causa de defectes en l'òrganul sinó en canvis en la seva funció.

3. La via Hippo com a integradora de senyals

Les primeres cinases efectores de la via Hippo van ser descrites per primer cop a *Drosophila* quan es realitzava un cribratge de gens relacionats amb la progressió tumoral (Xu *et al.*, 1995). Les primeres descripcions de la via Hippo varen descriure el rol d'aquesta via de senyalització en el control de la mida dels òrgans, restringint la proliferació i reduint l'apoptosi (Halder i Johnson, 2011). Tot i això s'ha demostrat que la via no només actua regulant la mida dels òrgans sinó que a més a més pot estar relacionada amb la regulació de la diferenciació cel·lular i en el manteniment de les cèl·lules mare (Cao *et al.*, 2021). Per tots aquests motius l'estudi de la via Hippo ha estat en el punt de mira no només en estudis del desenvolupament sinó també en la regulació de la homeòstasi en organismes adults i la seva relació amb l'aparició d'estats patològics (Zheng i Pan, 2019).

3.1. Elements principals de la via

La via Hippo consta d'una sèrie de cinases capaces de regular l'efector de la via, que al seu torn activa la transcripció de diferents gens relacionats amb la regulació de la mort cel·lular, la proliferació, la diferenciació i la supervivència (Huang *et al.*, 2005; Zhang, Pasolli i Fuchs, 2011; Wang *et al.*, 2018). En *Drosòfila*, les cinases de la via s'anomenen Hippo, Salvador, Mats i Warts mentre que en vertebrats són Mst1/2, Salvador, Mob1, Lats1/2. L'efector de la via és un coactivador de la transcripció anomenat Yki en *Drosòfila* i YAP/TAZ en vertebrats. Els elements principals de la via estan conservats en organismes anteriors als metazous, on ja es troben evidències de proteïnes amb funcions homòlogues a Hippo, Warts i YAP (Sebe-Pedrs *et al.*, 2012).

La cinasa principal de la via és Hippo, que és capaç de respondre a diferents senyals tant intracel·lulars com extracel·lulars i fosforilar-se. Hippo és una serina/treonina cinasa amb un domini cinasa N-terminal i un domini SARAH (Salvador/Ras-association domain family /Hippo) C-terminal, ambdós dominis estan units per un connector flexible. Quan Hippo és fosforilat es produeix un canvi de conformació que permet l'exposició del domini C-terminal on es podrà unir Salvador (Ni *et al.*, 2013). Salvador va ser identificat com una proteïna d'esquelet designada a connectar Hippo i Warts, però actualment es sap que també juga un paper important en el reclutament de Hippo a la membrana i en el manteniment de l'activitat de Hippo, inhibint la seva desfosforilació (Yin *et al.*, 2013; Sun, Reddy i Irvine, 2015). Gràcies a la acció conjunta de Hippo i Salvador, es fosforila Mats, tot permetent l'activitat de Warts. L'efecte de Mats sobre Warts és dual. Per un costat canvia la seva conformació fent-la accessible a ser activada i, per un altre, fa de proteïna de bastida perquè pugui interaccionar amb Hippo i ser fosforilada (Wei, Shimizu i Lai, 2007; Praskova, Xia i Avruch, 2008; Ni *et al.*, 2015). Aquest conjunt de cinases constitueix el nucli de la via Hippo que serà capaç de regular l'efector de la via (Figura 10).

L'efector de la via Hippo és Yki, un coactivador de la transcripció amb un domini WW que permet la interacció proteïna-proteïna (Sudol, 1994; Sudol *et al.*, 1995). Quan el nucli de cinases de la via està activat, Warts fosforila Yki, promovent la seva translocació del nucli al citoplasma i, per tant, la seva inactivació com co-activador transcripcional. Aquesta fosforilació també crea un lloc d'unió per les proteïnes 14-3-3, que s'encarreguen d'iniciar el procés de degradació de Yki (Liu *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010) (Figura 10). Pel contrari, si no s'activen les cinases principals de la via, Yki es mantindrà en el nucli i podrà activar la transcripció dels gens diana de la via. Yki no té motiu d'unió al DNA i, per tant, depèn d'altres factors de transcripció. Tot i que s'han identificat diverses proteïnes que podrien interaccionar amb Yki el company principal d'aquesta proteïna és Scalloped (Sd), anomenat TEAD en mamífers (Wu *et al.*, 2008; Koontz *et al.*, 2013). La cooperació d'aquestes dues proteïnes permet la unió a diferents promotors o estimuladors de gens diana (Oh *et al.*, 2013; Galli *et al.*, 2015; Stein *et al.*, 2015) (Figura 10).

L'efector de la via Hippo és Yki un coactivador de la transcripció amb un domini WW que permet la interacció proteïna-proteïna (Sudol, 1994; Sudol *et al.*, 1995). Quan el nucli de cinases de la via està activat, Warts fosforila Yki promovent la seva translocació del nucli al citoplasma. Aquesta fosforilació també crea un lloc de unió per les proteïnes 14-3-3 que s'encarreguen d'iniciar el procés de degradació de Yki (Liu *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010) (Figura 10). Per el contrari si no hi ha activa de les cinases principals de la via Yki es mantindrà en el nucli on podria activar la transcripció dels gens diana de la via. Yki ni té motiu d'unió al DNA per lo que depèn de altres factors de transcripció. Tot i que s'han identificat diverses proteïnes que podrien interaccionar amb Yki el company principal d'aquesta proteïna és Scalloped (Sd), anomenat TEAD en mamífers (Wu *et al.*, 2008; Koontz *et al.*, 2013). La cooperació d'aquestes dues proteïnes permet la unió a diferents promotors o estimuladors de gens diana (Oh *et al.*, 2013; Galli *et al.*, 2015; Stein *et al.*, 2015) (Figura 10).

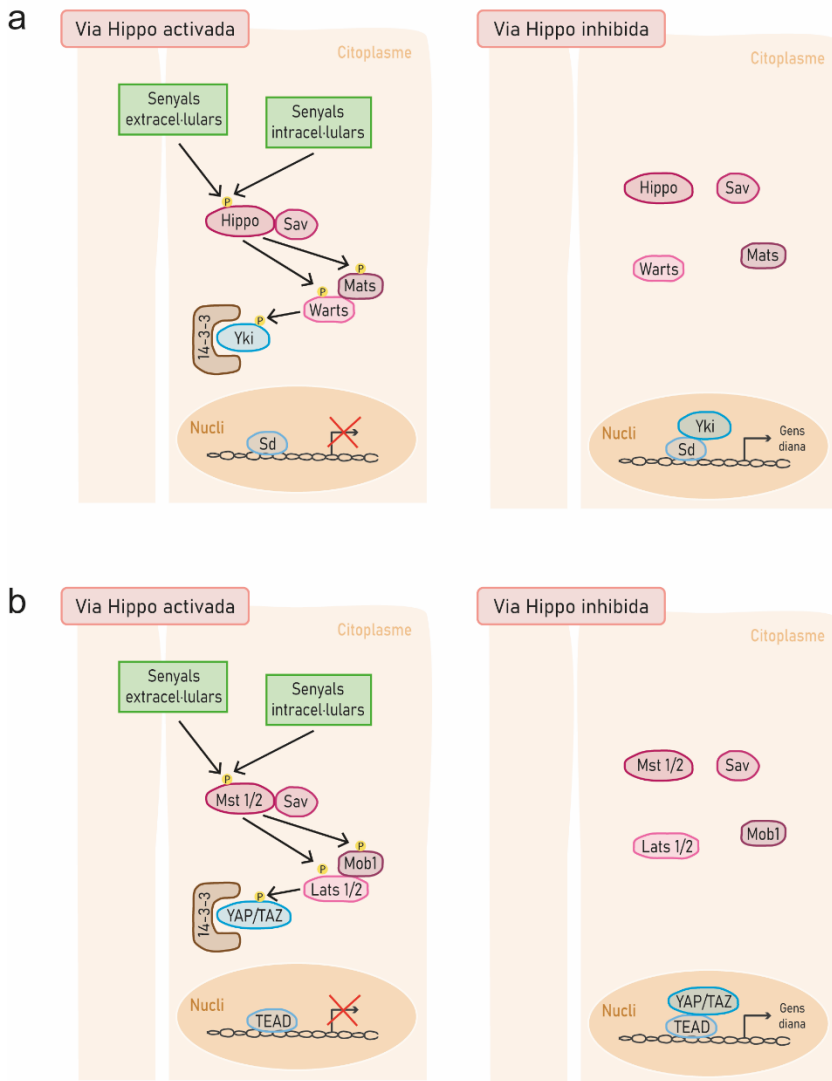


Figura 10. Funcionament de la via Hippo en Drosòfila i mamífers.

a) Regulació de la via Hippo en Drosòfila. Diverses senyals intracel·lulars i extracel·lulars permeten l'activació de la cinasa principal de la via, Hippo, tot iniciant una cascada de senyalització que impedeix l'entrada de Yki al nucli i la seva posterior degradació. Quan les cinases no estan activades, Yki pot entrar al nucli i interaccionar amb Sd.

b) Regulació de la via Hippo en mamífers. Diverses senyals intracel·lulars i extracel·lulars permeten l'activació de la cinasa principal de la via, Mst 1/2, tot iniciant una cascada de senyalització que impedeix l'entrada de YAP/TAZ al nucli i la seva posterior degradació. Quan les cinases no estan activades, YAP/TAZ pot entrar al nucli i interaccionar amb TEAD.

3.2. Integració de senyals

La via Hippo pot estar regulada per una gran diversitat de senyals tant intracel·lulars com extracel·lulars. La integració d'aquest conjunt de contribucions són les que permeten la fina regulació de la via.

La densitat cel·lular és una dels principals senyals reguladors de la via. En situacions d'alta densitat cel·lular, el contacte cèl·lula a cèl·lula inhibeix el creixement gràcies a l'acció de la via Hippo. Les unions estretes de les cèl·lules, a través de diferents proteïnes de membrana, poden activar les cinases de la via donat lloc a l'activació de Warts, que impedirà l'acció de Yki en el nucli (Zhao *et al.*, 2007; Silvis *et al.*, 2011; Aragona *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2016). Els canvis en la unió a la matriu extracel·lular (MEC) també regulen l'activitat de la via. La unió de les cèl·lules a la MEC permet l'entrada al nucli de Yki (Zhao *et al.*, 2012; Kim i Gumbiner, 2015), mentre que quan hi ha una disminució de l'adherència a la MEC, Yki és degradat a causa de l'acció de Warts (Zhao *et al.*, 2012). A més de les interaccions cèl·lula a cèl·lula, la via Hippo és sensible a l'estrès mecànic induït per les cèl·lules que l'envolten. La tensió del citoesquelet s'ha demostrat que regula la via; alguns estudis apunten a què la tensió del citoesquelet és dictada pels components de regulació superiors de la via (Crumbs, Merlin i Kibra) (Fletcher *et al.*, 2015) mentre que altres apunten a la fosforilació de la miosina com a molècula senyalitzadora (Deng *et al.*, 2015).

Els diferents senyals d'estrès també són reguladores de l'activació de la via Hippo. Hippo ha estat directament relacionat amb la resposta a l'estrès oxidatiu: quan hi ha un increment de ROS a la cèl·lula, s'activa Hippo que, a través de FoxO, regula l'eliminació de les ROS deletèries per la cèl·lula (Lehtinen *et al.*, 2006; Geng *et al.*, 2015). L'estrès energètic és també un regulador de la via; la falta de glucosa indueix la fosforilació de Yki per Warts gràcies a la acció de la AMPK (deRan *et al.*, 2014; Mo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

3.3. La via Hippo en planàries

Les planàries són uns animals que poden canviar la seva mida corporal i regenerar qualsevol part del seu cos. Per aquest motiu s'han convertit en un model d'estudi per entendre la regulació homeostàtica dels teixits adults. Els primers estudis de la via Hippo en planàries es van fer en relació a l'efector de la via, Yki. En aquests estudis es va demostrar el paper *yki* en la regeneració i l'establiment del correcte patronatge del cos. També es va veure que la inhibició de *yki* creava edemes que impedièn la supervivència de la planària (Lin i Pearson, 2014). Tot i el fenotip tan sever observat en *yki* RNAi, posteriorment s'ha pogut demostrar que efectivament Yki està regulat per Hippo (de Sousa *et al.*, 2018).

La inhibició de *hpo* provoca l'aparició de sobrecreixements i zones despigmentades que poden afectar a estructures importants de la planària com els ulls (Figura 11a). En aquests animals també s'han trobat defectes en altres estructures importants per la planària com el sistema nerviós o el digestiu (Figura

12b-c). A diferència del que passa en altres animals, en planàries no hi ha un augment de la mida al inhibir *hpo*. Quan es comprova la proliferació cel·lular es demostra que tot i que animal *hpo* RNAi hi ha un augment de cèl·lules en fase M aquestes no poden finalitzar el cicle cel·lular degut a defectes en l'assemblatge del fus mitòtic. En relació a al mort hi ha una disminució de les cèl·lules en apoptosi al inhibir *hpo*, que és la responsable de l'acumulació de cèl·lules en forma de sobrecreixement. L'estudi exhaustiu de del llinatge epidèrmic en animals *hpo* RNAi evidencia que aquests animals presenten cèl·lules on hi ha la expressió de marcadors de diferents estats diferenciats de la cèl·lula. A més a més es demostra que l'origen d'aquestes cèl·lules és a causa de processos de desdiferenciació.

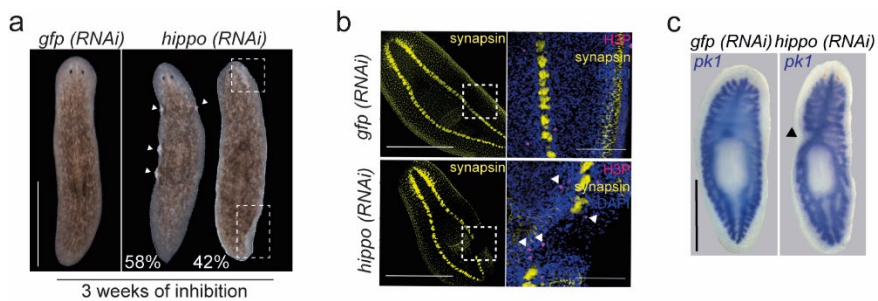


Figura 11. Fenotip dels animals *hpo* RNAi.

a) Aspecte *in vivo* dels animals *hpo* RNAi. Imatges de microscòpia d'animals *hpo* RNAi on es pot observar els sobrecreixements i les àrees despigmentades. Les puntes de fletxa blanques indiquen els sobrecreixements i els requadres discontinus les zones despigmentades (de Sousa *et al.*, 2018).

b) Sistema nerviós dels animals *hpo* RNAi. Marcatge dels sistema nerviós de la planària amb anti-Sinapsina. Els requadres indiquen la zona magnificada. Les puntes de fletxa blanques indiquen les cèl·lules en mitosi marcades amb un anticòs anti-H3P (de Sousa *et al.*, 2018).

c) Sistema digestiu dels animals *hpo* RNAi. Hibridació *in situ* de la sonda del gen *pk1* que marca el sistema digestiu de la planària. Les puntes de fletxa negres indiquen les zones on hi ha defectes en el sistema digestiu (de Sousa *et al.*, 2018).

En resum, l'estudi de la inhibició de *hpo* va proporcionar un major coneixement del funcionament de la via. Es va demostrar que en animals *hpo* RNAi no hi ha un increment de mida dels animals sinó acumulacions puntuals de cèl·lules desdiferenciades, que són degudes a la inhibició de l'apoptosi, a l'aturada del cicle cel·lular i a la desdiferenciació cel·lular (Figura 12) (de Sousa *et al.*, 2018). És important destacar que no s'havien descrit mai anteriorment processos de desdiferenciació a les planàries, pel que aquest estudi indica un rol essencial de *hpo* en l'establiment de la identitat cel·lular.

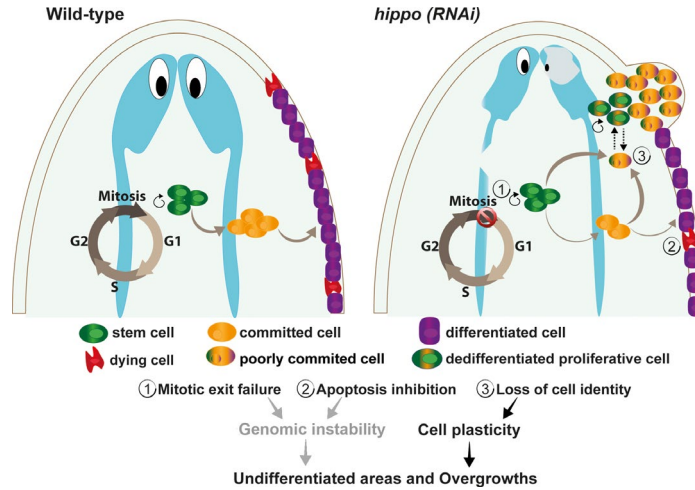


Figura 12. Model del funcionament de *hpo* en planàries.

En animals control, el neoblasts poden proliferar i diferenciar-se en tipus cel·lulars específics. Les cel·les proliferatives surten del cicle cel·lular per continuar amb el procés de diferenciació. El nombre de cèl·lules postmitòtiques també està controlat per la mort cel·lular programada. En les planàries *hpo* RNAi, les cèl·lules mare proliferants o els neoblasts queden atrapats a la fase M (1) i poques d'aquestes cèl·lules pateixen apoptosi (2). Ambdues alteracions poden provocar inestabilitat genòmica, perquè la fallada en sortir de la fase M està relacionada amb el dany de el DNA, i la inhibició de la resposta apoptòtica dificulta l'eliminació de cèl·lules velles i danyades. La inhibició de *hpo* també afavoreix la plasticitat cel·lular i facilita la dediferenciació cel·lular (3). Tant la inestabilitat genòmica com la plasticitat cel·lular podrien afavorir l'aparició d'àrees no diferenciades i de sobrecreixement (de Sousa *et al.*, 2018),

4. *foxo* com a gen clau en la regulació de la homeòstasi cel·lular

Els factors de transcripció forkhead (FOX) constitueixen una família gènica evolutivament molt conservada, amb funcions importants tant en el desenvolupament com en la vida adulta. La característica comuna de tots els membres d'aquesta família és la presència d'un motiu d'unió al DNA característic de 100 aminoàcids (el domini FOX) (Weigel i Jäckle, 1990; Clark *et al.*, 1993).

El primer cop que es va descriure un membre d'aquesta família va ser a *D. melanogaster*, on es va observar que la mutació d'un gen codificant per una proteïna nuclear provocava que les mosques presentessin un cap punxegut (Weigel *et al.*, 1989; Weigel i Jäckle, 1990). Aquesta observació donà el particular nom a la família gènica. A partir d'aquest moment s'han anat descobrint diferents gens amb el domini d'unió al DNA FOX, que s'han classificat sistemàticament en subfamílies que van de FoxA a FoxS (Kaestner, Knöchel i Martínez, 2000). Diferents espècies presenten diferents famílies i cada una de les famílies té una quantitat diferent de gens segons la espècie. El guany i la pèrdua de les famílies gèniques de Fox està marcat per l'evolució i la diferenciació de les espècies; per exemple, la família S és específica de vertebrats i es va originar a partir de la duplicació i l'evolució de la família C (Wotton i Shimeld, 2006).

La subfamília FoxO consta d'un sol gen en els invertebrats i quatre en els mamífers (*FOXO1, 3, 4, 6*) (Jacobs *et al.*, 2003). A *C. elegans* l'únic membre de la família FoxO s'anomena *daf-16* (Lin *et al.*, 1997), mentre que a *D. melanogaster* és *dFOXO* (Jünger *et al.*, 2003). Els gens de la subfamília FoxO s'han relacionat amb processos de càncer i envelliment (Greer i Brunet, 2005).

4.1. Regulació de *foxo*

FoxO és un factor de transcripció amb capacitat de modular la transcripció de nombrosos gens i, per tant, la seva regulació afecta a diferents processos cel·lulars. El principal element regulador de FoxO és la Serina/Treonina proteïna-cinasa (Akt). Akt és una proteïna regulada per la via de la insulina capaç de fosforilar FoxO, excloent-lo del nucli i donant lloc a la seva degradació (Matsuzaki *et al.*, 2003). L'activació d'Akt es produeix quan, en presència de nutrients, el receptor d'insulina inicia una sèrie de fosforilacions en cascada de la via del fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) que desemboquen en l'activació d'Akt per doble fosforilació realitzades per la Cinasa dependent de fosfoinositida 1 (PDK1) i la diana de rapamicina en cèl·lules de mamífer (mTOR) (Alessi *et al.*, 1997; Sarbassov *et al.*, 2005) (Figura 13a). Quan hi ha limitacions de factors de creixement o en situacions d'estrès oxidatiu FoxO pot ser fosforilat per diferents proteïnes (JNK, MST1, AMPK) que permeten la seva entrada al nucli (Bocchitto i G. Kalb, 2011; Zhao, Wang i Zhu, 2011). Algunes de les modificacions

transcripcionals produïdes en resposta a situacions d'estrès poden dominar sobre l'efecte de Akt (Chaanine *et al.*, 2012). Un cop en el nucli, FoxO pot activar diferents gens diana que, entre altres funcions, inhibiran la funció de mTOR produint un bucle de retroalimentació positiva (Puig *et al.*, 2003; Jia, Chen i Riddle, 2004) (Figura 13b).

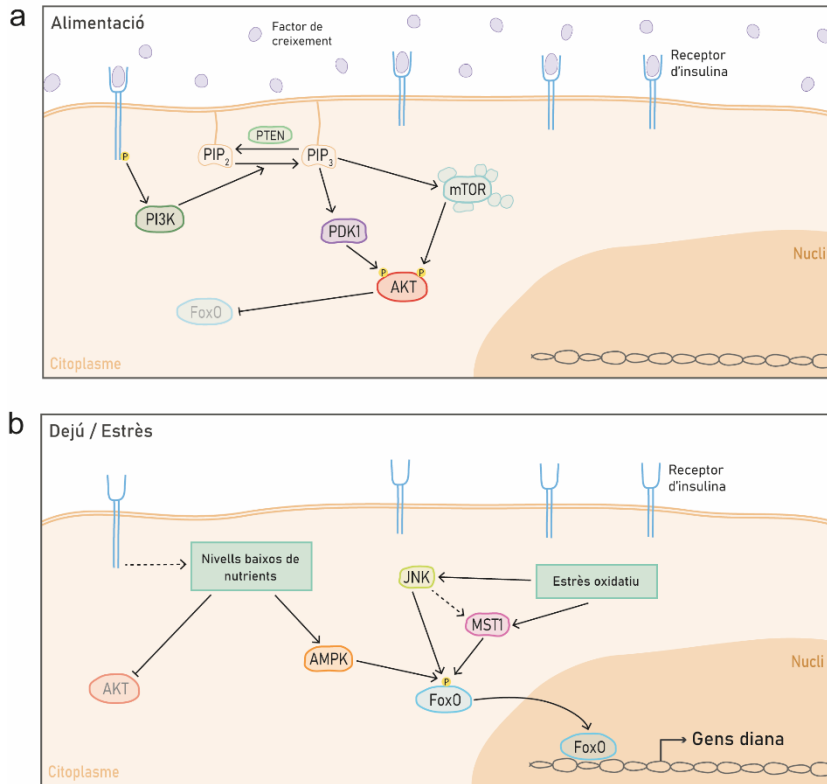


Figura 13. Regulació de FoxO en diferents estats nutricionals.

a) Regulació de FoxO en condicions d'alimentació. En condicions d'alimentació hi ha activació dels receptors d'insulina que permeten la fosforilació d'PI3K. Gràcies a aquesta cinasa obtenim la transformació de PIP₂ a PIP₃, que permetrà l'activació de la PDK1 i el complex mTOR. Aquests dos complexos proteics finalment seran capaços de fosforilar Akt que impedirà l'entrada de FoxO al nucli.

b) Regulació de FoxO en condicions de dejú o estrès cel·lular. En estat de falta de nutrients s'activen diferents vies de senyalització derivades dels receptors d'insulina que permeten la inhibició de Akt. Aquests mateixos senyals també poden activar AMPK, que afavoreix l'entrada de FoxO al nucli. En cas d'estrès oxidatiu s'activen les cinases JNK i MST1 (Hpo), que permeten la fosforilació selectiva de FoxO, tot provocant la seva translocació al nucli. Un cop al nucli, FoxO pot interaccionar amb el DNA i activar diferents gens diana.

La identificació dels gens diana de FoxO en les diferents espècies ha permès entendre millor quines funcions regula aquest factor de transcripció. Aquestes anàlisis han relacionat la funció de FoxO amb diversos processos cel·lulars com apoptosi, progressió del cicle cel·lular, resistència a l'estrès oxidatiu, autofàgia,

metabolisme o diferenciació (Van Der Vos i Coffey, 2011). En invertebrats, concretament en *C. elegans*, l'estudi de FoxO ha estat centrat en l'estudi de la longevitat a través de la resistència a l'estrès (Henderson i Johnson, 2001). Anàlisis comparatius dels gens diana directes de FoxO han demostrat que la seva implicació en envelliment depèn de mecanismes concrets de l'espècie tot i mantenir un mecanisme comú de control a través de FoxO (Webb, Kundaje i Brunet, 2016).

4.2. Control de la mort cel·lular

FoxO és un dels factors de transcripció encarregats de la regulació de l'apoptosi. El descobriment del rol de FoxO com a factor antitumoral va ser a partir de l'observació que en algunes formes de leucèmies *foxo* es trobava truncat per diferents translocacions cromosòmiques impeding la seva funció i donat lloc a càncer en humans (Lovell, D'Cruz i Barr, 1994; Borkhardt *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1998). L'activació d'aquest factor de transcripció permet la inhibició de l'apoptosi, jugant un paper important en la progressió tumoral (Seoane *et al.*, 2004; Kikuno *et al.*, 2007; Jagani, Singh i Khosravi-Far, 2008).

L'estudi dels gens diana de FoxO indiquen que el rol de FoxO en l'apoptosi es produiria, com a mínim parcialment, a través de Bcl-6. Bcl-6 és un repressor de la transcripció que pot ser activat per FoxO provocant la inhibició de la transcripció gènica de BCL-X_L una proteïna anti-apoptòtica (Tang *et al.*, 2002) (Figura 14). Una altra possible via d'activació de l'apoptosi és a través de la regulació directa de BIM; una proteïna de la família Bcl-2 encarregada de l'alliberament del Citocrom C al citoplasma, iniciant el procés d'apoptosi (Gilley, Coffey i Ham, 2003) (Figura 14). Finalment també s'ha descrit la implicació de FoxO en l'activació de l'apoptosi a través de l'expressió de diferents lligands activadors de FADD i TADD (Modur *et al.*, 2002; Rokudai *et al.*, 2002) (Figura 14).

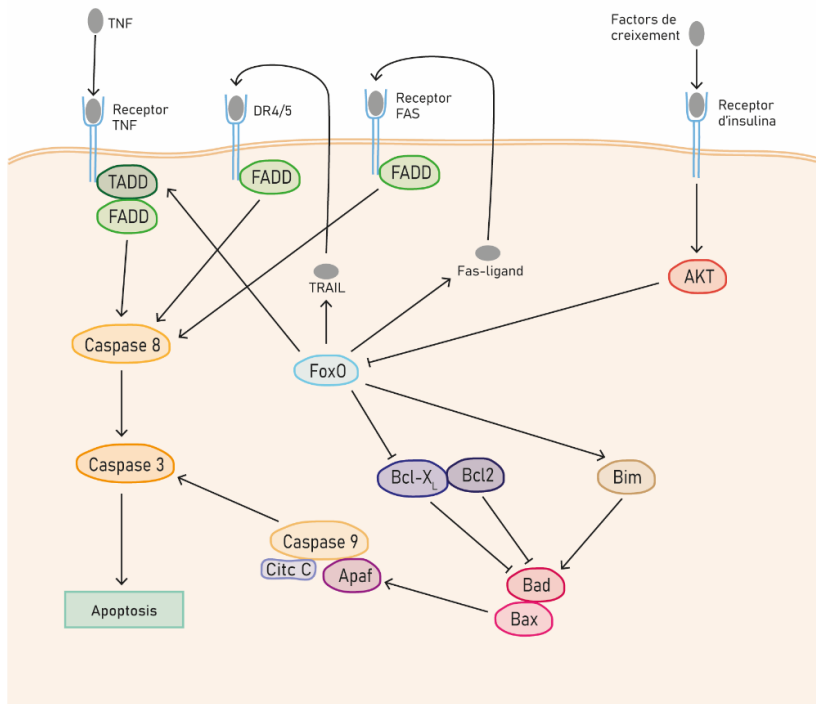


Figura 14. Regulació de l'apoptosi a través de FoxO.

L'activació de FoxO permet la inducció de l'apoptosi activant diferents lligands relacionats amb la mort cel·lular, com són TRAIL i Fas. A més a més, l'acció de FoxO també potencia l'acció de TADD en l'activació de l'apoptosi. Així mateix, de la interacció amb lligands de mort, FoxO també pot activar la mort cel·lular inhibint gens anti-apoptòtics de la família Bcl i activant altres gens pro-apoptòtics com Bim (Burgering i Medema, 2003).

4.3. Longevitat

Un dels factors més estudiats de FoxO és la seva relació amb la longevitat, sobretot a *C. elegans*. La descripció de *daf-16*, l'homòleg de FoxO a *C. elegans*, es va fer en larves que creixien en condicions desfavorables i entraven en un estat de quiescència anomenat dauer; mutacions en *daf-16* impedièren l'entrada en aquest estat de quiescència (Albert, Brown i Riddle, 1981). Tot i que pugui semblar paradoxal, el rol de *daf-16* descrit en el desenvolupament de *C. elegans* permet l'explicació de l'augment de longevitat en adults (Li *et al.*, 2019). La hipòtesi de la resposta a l'estrès (Johnson, Lithgow i Murakami, 1996) indica que un augment de la longevitat està relacionat amb un augment de la resistència a l'estrès diari; és a dir l'envelliment és causa de l'acumulació dels estressos quotidians de la cèl·lula. Seguint aquesta línia de pensament, l'activació de gens responsables de combatre l'estrès permetria revertir els efectes del envelliment; la sobreexpressió de *daf16* en *C. elegans* permet duplicar l'esperança de vida de l'animal (Lin *et al.*, 1997). L'estudi d'aquests

gens relacionats amb l'estrès han demostrat que la seva activació està relacionada amb l'augment de la longevitat en *C. elegans* i en molts altres organismes (Guarente i Kenyon, 2000; Accili i Arden, 2004).

Tan en vertebrats com en invertebrats la implicació de FoxO en l'envelliment està relacionada amb la regulació de l'estrès oxidatiu. Com ja s'ha descrit anteriorment, l'acumulació de ROS permet l'activació de proteïnes de resposta a estrès com JNK i MST, que permeten la translocació de FoxO al nucli, com es pot observar a la Figura 13b. Un cop al nucli, FoxO activa diferents enzims encarregats de l'eliminació de ROS, com la superòxid dismutasa mitocondrial (SOD2) (Honda i Honda, 1999; Kops *et al.*, 2002). A més de la desintoxicació de les espècies reactives del oxigen, FoxO activa Gadd45, una proteïna que permet reparar el dany al DNA (Kirkwood i Austad, 2000; Tran *et al.*, 2002).

5. Les tècniques d'alt rendiment com a eina d'estudi genòmic

El major avanç en la genètica ha estat sens dubte la implementació de les tècniques de seqüenciació massiva. El pas de poder analitzar només gens o mutacions concretes a tenir una visió completa del funcionament dels genomes i els transcriptomes ha suposat una gran revolució. No només el camp de la genètica s'ha vist alterat per aquests avenços, sinó que la disponibilitat d'informació genòmica i transcriptòmica, ràpida i barata, ha permès el desenvolupament de disciplines que semblaven només possibles en pel·lícules de ciència ficció, com la medicina personalitzada o la transgènesi. L'evolució de les tècniques de seqüenciació massiva i de l'estudi genòmic és un camp en expansió que seguirà millorant el coneixement que tenim de com es regulen els organismes i serà una eina indispensable en totes les ciències de la vida.

5.1. La seqüenciació massiva

El primer mecanisme de seqüenciació va ser proposat per Sanger al 1975 va ser el més utilitzat durant gairebé una dècada (Sanger i Coulson, 1975; Sanger, Nicklen i Coulson, 1977). Aquest mètode estava basat en la unió de nucleòtids de terminació marcats a l'extrem 3'-OH que permetien determinar quina era la base final del fragment de DNA. Aquest sistema es va anar millorant establint millors marcatges, de radioactius a fluorescents, automatitzant el procés i desenvolupant programaris per tal de poder analitzar les dades obtingudes (Figura 15). Tot i no ser mecanismes de seqüenciació massiva no es pot passar per alt la seva importància a l'hora d'establir les bases pels futurs mètodes. Gràcies a aquest mètode de seqüenciació es va poder seqüenciar per primer cop el genoma humà en un projecte públic que va unir diversos països i es va allargar més de 10 anys.

La primera versió seqüenciada del genoma humà utilitzant el mètode de Sanger es va elaborar en més d'una dècada i va ser una gran fita històrica (Lander *et al.*, 2001). Però actualment podem seqüenciar aquest genoma en menys d'un dia gràcies a les tècniques de seqüenciació de la següent generació (Next Generation Sequencing o NGS). S'ha anomenat NGS a totes aquelles tècniques que han esdevingut després de Sanger i permeten la seqüenciació massiva de dades genètiques. Aquestes tècniques es divideixen en generacions depenent del moment en el que es van desenvolupar. Els mètodes de seqüenciació de la segona generació es caracteritzen per no intervenir en la identitat del nucleòtid terminant la seqüenciació, sinó que es basen en la quantificació per fluorescència de la síntesis d'una nova cadena de DNA (Nyrén i Lundin, 1985). A més a més, en aquesta generació s'incorpora la seqüenciació paral·lela que es basa en la separació espacial d'una plantilla de DNA amplificada de forma clonal o una sola molècula de DNA en un *flowcell* (Margulies *et al.*, 2005; Fedurco *et al.*, 2006) (Figura 15). En aquesta generació

destaca el mètode de piroseqüenciació 454 i l'aparició del mètode Solexa de Illumina. Actualment la tecnologia de Illumina és una de les més utilitzades.

La tercera generació és la puntera i es defineix per ser capaç de seqüenciar molècules completes de material genètic sense la necessitat d'amplificació de DNA i a temps real. L'eliminació d'amplificació redueix els errors induïts per la polimerasa i permet una millor quantificació dels transcrits de DNA. Aquesta generació està dominada per la tecnologia desenvolupada per Pacific Biosciences (PacBio) i Oxford Nanopore Technologies (ONT) (Xiao i Zhou, 2020). La tecnologia de PacBio es basa en la seqüenciació completa d'una sola molècula de DNA a través d'una polimerasa localitzada en el fons d'un porus on hi ha un detector de fluorescència que detecta els canvis en la incorporació de cada nucleòtid. La tecnologia de ONT és la primera en no utilitzar un mètode basat en la polimerasa sinó que detecta canvis elèctrics produïts per la cadena de DNA a través dels porus del *flowcell* (Figura 15). Ambdues tècniques tenen la capacitat de detectar modificacions en el DNA, una característica que no era possible amb els sistemes de NGS de la segona generació (Kelleher *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019).

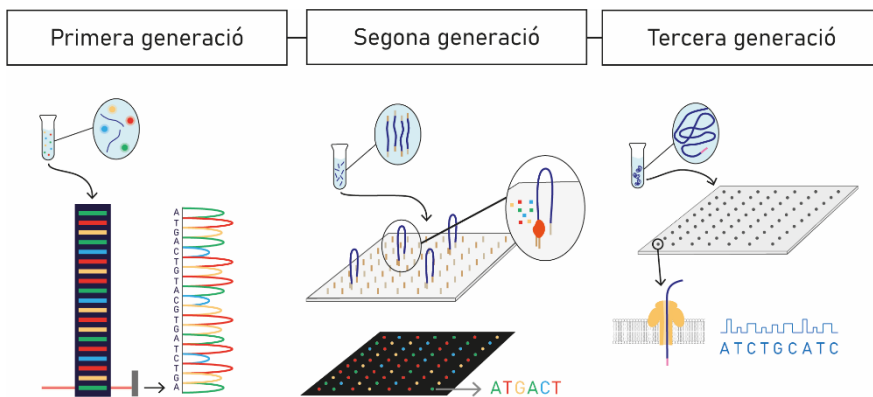


Figura 15. Evolució dels mètodes de seqüenciació al llarg del temps.

Les tècniques de seqüenciació de primera generació es basaven en determinar la seqüència del material genètic a partir del marcatge d'un nucleòtid terminal. A la imatge podem veure una representació del mètode de Sanger acoblat a un capil·lar que permet l'automatització del procés.

La segona generació de NGS determina la seqüència a partir de síntesi. A la imatge podem veure el sistema de SOLEXA que es basa en la síntesi en plaques on hi ha unides adaptadors específics.

La tercera generació permet seqüenciar molècules de llargada completa. A la imatge podem observar el funcionament de la seqüenciació utilitzat ONT que es basa en la detecció de canvis elèctrics.

5.2. Marc actual de la genòmica en planàries

La implementació de les tècniques de seqüenciació massiva va suposar un canvi de paradigma en l'estudi en planàries; es va passar d'estudis a nivell d'un sol gen a poder tenir una visió més general dels canvis gènics produïts en

aquest l'organisme. La impossibilitat de poder realitzar transgènics en planàries va suposar durant molt temps un impediment important en l'ús d'aquest model, però l'aparició de les tècniques de NGS van permetre posar les planàries en l'avantguarda dels estudis de regeneració i remodelació tissular. Des de la implementació de les tècniques d'alt rendiment s'han anat obtenint diferents transcriptomes de *S. mediterranea*; actualment es disposa de diversos assemblatges *de novo* del transcriptoma (Abril *et al.*, 2010; Blythe *et al.*, 2010; Adamidi *et al.*, 2011; Sandmann *et al.*, 2011; Labbé *et al.*, 2012; Resch *et al.*, 2012; Kao, Felix i Aboobaker, 2013; Brandl *et al.*, 2016; Clark *et al.*, 2016). Per tal de poder agrupar tota aquesta informació, al 2019 es va generar un nou conjunt de dades, combinant la informació dels transcriptomes anteriors amb les dades genòmiques publicades (Grohme *et al.*, 2018) i donant lloc a un transcriptoma que és l'utilitzat actualment com a referència (Rozanski *et al.*, 2019). L'obtenció del genoma i transcriptomes d'alta qualitat en planàries va permetre l'obtenció i anàlisi de dades d'alt rendiment, com l'anàlisi de l'expressió gènica (RNA-seq) o d'accessibilitat de la cromatina (ATAC-seq o ChIP-seq) que es troben disponibles per a la comunitat (Castillo-Lara i Abril, 2018; Castillo-Lara, Pascual-Carreras i Abril, 2019; Rozanski *et al.*, 2019; E. Pascual-Carreras *et al.*, 2020).

Tot i els avanços realitzats tant a nivell de transcriptòmica com de genòmica, el genoma actual de *S. mediterranea* segueix dividit en 481 *scaffolds* (Grohme *et al.*, 2018). El motiu principal és que les tècniques utilitzades per a la seqüenciació del genoma estan basades en la utilització de polimerases. La darrera versió publicada del genoma de planàries va ser seqüenciada utilitzant PacBio (Grohme *et al.*, 2018). Aquesta tecnologia va permetre obtenir seqüències llargues (10-15 kb), millorant la qualitat respecte de genomes anteriors. Però, tot i això, PacBio és una tecnologia que ha reportat dificultats en la seqüenciació de zones riques en A-T (Ross *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2021). En planàries s'ha demostrat que hi ha una gran presència de zones riques en homopolímers A-T. Aquestes bases suposen aproximadament un 70% del contingut nucleotídic del genoma (Grohme *et al.*, 2018), fet que podria ser el causant de seguir tenint zones amb falta de resolució.

Les dades de transcriptòmica s'han obtingut principalment amb metodologies basades amb Illumina. La seqüenciació per Illumina és la més assentada a causa de la seva maduresa com a tecnologia i la seva àmplia gama de plataformes. Tot i el seu gran potencial, Illumina presenta dos inconvenients principals quan s'aplica a les planàries. Primer, cal tenir en compte que és un mètode de seqüenciació basat en fragments curts, obtenint *reads* amb una llargada màxima de 150 pb. En el cas de les planàries, on es té un genoma fragmentat, la reconstrucció dels transcrits a partir de *reads* curts podria donar lloc a errors d'assemblatge. En segon terme, aquest mètode està basat en polimerases i, per tant, pot introduir errors en presència d'homopolímers i regions de baixa complexitat, especialment en zones riques en A-T o G-C (Dohm *et al.*, 2008; Harismendy *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2011). Unint

aquests dos factors, la principal mancança dels transcriptomes actuals és la resolució a nivell d'isoformes. En planàries, com en d'altres models, s'ha demostrat que canvis a nivells d'isoformes són determinants pel correcte funcionament de les cèl·lules, i més concretament dels neoblasts (Solana *et al.*, 2016). Tanmateix, no s'ha fet cap estudi per determinar les diferents isoformes de *splicing* presents en el transcriptoma de *S. mediterranea*.

Objectius

En aquesta tesis hi un objectiu principal que és l'estudi del rol de les mitocondries en el manteniment de la homeòstasi en planàries.

Per tal de poder complir aquest objectiu principal es plantegen tres objectius específics:

- Determinar si la regulació de la funció mitocondrial és un factor clau de la via Hippo.
- Caracterització funcional de *foxo* i la seva implicació en la funció mitocondrial en planàries.
- Establir el mètode de seqüenciació d'Oxford Nanopore Technologies per obtenir nous transcrits en planàries.

Resultats

1. Implicació de les mitocòndries en el funcionament de la via Hippo en planàries

1.1. Anàlisis transcripcionals de les dianes de la via Hippo

Els primers estudis sobre la funció de la via Hippo en planàries varen aportar informació sobre la seva relació amb el destí cel·lular i efectes en la pèrdua del balanç cel·lular (de Sousa *et al.*, 2018), però el mecanisme de funcionament de la via encara no es coneix completament. Una de les majors incògnites és poder entendre quins són els efectors de la via i com donen lloc a la pèrdua de la homeòstasi cel·lular. Per tal de poder tenir una visió global del funcionament de la via hem analitzat dades de transcriptòmica derivades de la inhibició de gens claus de la via. Per fer-ho comparem els gens desregulats després d'inhibir *hpo* i *yki*, dos dels efectors principals de la via. Es comptava amb un conjunt de dades ja publicat en el qual s'inhibia *hpo* durant 1 setmana i 3 setmanes (de Sousa *et al.*, 2018). També es disposava d'un altre conjunt de dades en el qual s'inhibia *yki* durant 1 setmana (pendent de publicació). Tenint en compte que el funcionament d'aquests dos gens és oposat, ja que a l'activar Hpo s'impedeix la entrada de Yki al nucli, vam seleccionar els gens que estan regulats a l'alta en *hpo* RNAis i a la baixa en *yki* RNAis, i viceversa (Figura 16). Els resultats de la comparació ens aporten un conjunt de possibles gens diana de la via (Apèndix 1). En la comparació *hpo* RNAi 1 setmana i *yki* RNAi 1 setmana només trobem 5 gens que passin les restriccions imposades en aquesta anàlisi, i els identifiquem com els primers gens a respondre a canvis en l'activitat de la via. Aquests gens són: *cecr5*, *tdh*, *b3galt5*, *slc12a9*, *ece2*.

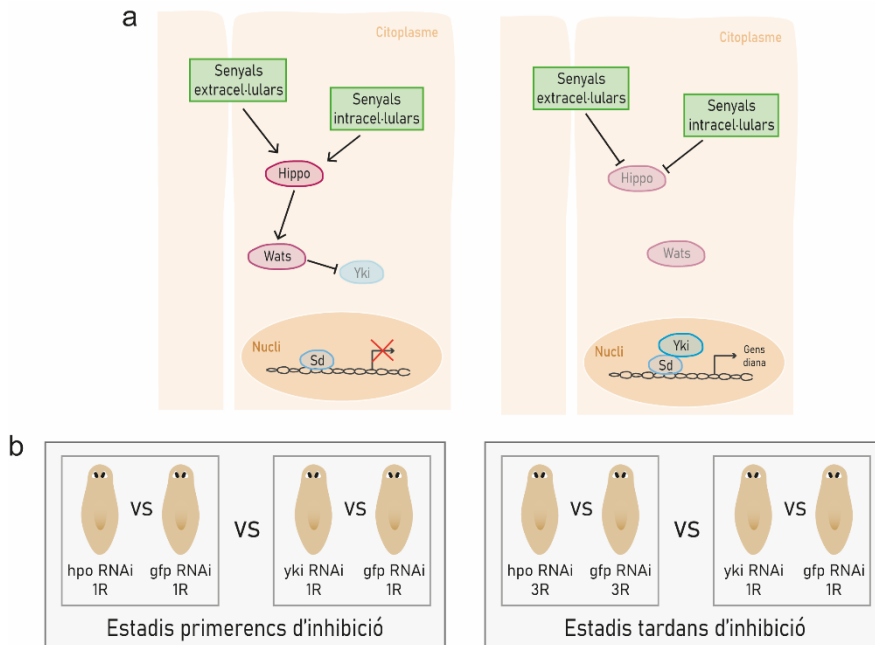


Figura 16. Anàlisi dels gens diana de la via Hippo.

a) Representació simplificada del funcionament dels principals elements de la via Hippo. Quan la via Hippo és activada per diferents estímuls s'activa una cascada de fosforilació que acaba impedit l'entrada de Yki al nucli i la seva posterior degradació. Quan els senyals externs impedeixen la funció de Hippo, Yki pot entrar al nucli i activar els gens diana de la via.

b) Esquema del anàlisi dels gens diana. Per tal de determinar els gens diana de la via Hippo es varen comparar els gens diferencialment expressats entre els animals *hpo* RNAi i els animals *yki* RNAi. Els gens amb una sola ronda o setmana de inhibició són aquells importants per a les transformacions més primerenques de la via mentre que els gens obtinguts a partir d'animals *hpo* RNAi de tres setmanes són els que tenen un efecte més tardà en el fenotip.

L'anàlisi d'ontologia gènica (GO) d'aquests gens de resposta ràpida de la via, derivats de la comparació a una setmana (Apèndix 2) ens indica que el terme de GO relacionat amb component cel·lular que més destaca és el de mitocondria (Figura 17b). En el cas del procés biològic destaquen diversos processos metabòlics i biosintètics (Figura 17c).

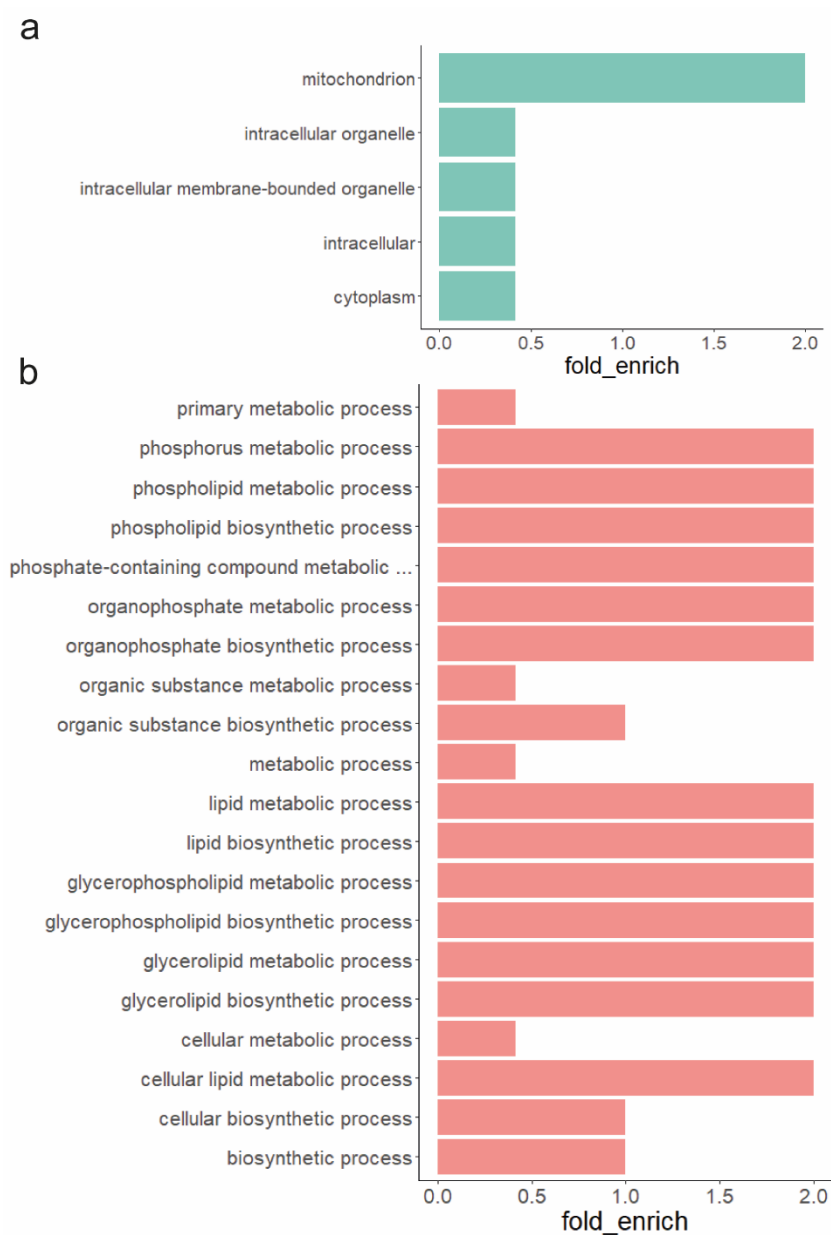


Figura 17. Anàlisi dels gens diana de la via Hippo.

a) GO de component cel·lular. Representació de l'enriquiment dels termes de GO de component cel·lular significatius en l'anàlisi dels gens diferencialment expressats després d'una setmana de inhibició de *yki* i *hpo*.

b) GO de procés biològic. Representació de l'enriquiment dels termes de GO de procés biològic significatius en l'anàlisi dels gens diferencialment expressats després d'una setmana de inhibició de *yki* i *hpo*.

Aquests resultats evidencien que la mitocondria i el metabolisme es veuen afectats en els estadis primerencs després de la inhibició de la via Hippo (1 setmana de inhibició). Cal tenir en compte que en aquest moment els animals encara no presenten cap fenotip aparent (de Sousa *et al.*, 2018).

1.2. Estudi funcional de gens diana de la via Hippo

Les anàlisis anteriors apunten a què les mitocondries podrien tenir un paper fonamental en la funció de la via Hippo. Per tal de poder esclarir el rol de les mitocondries es varen seleccionar diversos gens candidats desregulats quan *hippo* o *yki* es troben inhibits per tal d'analitzar la seva funció a les planàries. Els gens seleccionats són *L-Treonina Deshidrogenasa (tdh)*, *Cat Eye Syndrome Chromosome Region, Candidate 5 (cecr5)* i *Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase (bck)*. Els dos primers gens corresponen a gens que es troben inhibits a primera ronda després de la inhibició de *hippo*, i *bck* es troba desregulat a tercera ronda. Els tres gens es varen escollit perquè tenen funcions metabòliques a la mitocondria (Aoyama i Motokawa, 1981; Footz *et al.*, 2001; Quental *et al.*, 2008). En el cas de *tdh* i *bck* es tracta de gens implicats en el metabolisme d'aminoàcids (Aoyama i Motokawa, 1981; Quental *et al.*, 2008). La funció de *cecr5* no està completament descrita però es sap que compleix una funció a la mitocondria, que té un domini hidrolasa i que defectes en aquest gen s'han relacionat amb la síndrome del ull de gat (Footz *et al.*, 2001).

Després de tres setmanes d'inhibició per RNAi els animals injectats amb cadascun dels tres gens candidats presenten zones despigmentades en diferents parts del cos. En el cas dels animals *bck* RNAi, un petit percentatge també presenten sobrecreixements (Figura 18a). Aquests fenotips són els mateixos que els prèviament observats en animals *hpo* RNAi (de Sousa *et al.*, 2018). Per analitzar en major profunditat el fenotip es va fer un marcatge del sistema nerviós amb un anticòs, l'anti-Sinapsina. El resultat és que en els animals RNAi de tots els gens candidats, en major o menor mesura, es poden observar perturbacions dels cordons nerviosos o el cervell (Figura 18b). Un fenotip similar també va ser observat en animals *hpo* RNAi, amb la interrupció dels cordons nerviosos i el cervell, que ha estat interpretat com la impossibilitat d'aquests animals de mantenir els teixits diferenciats (de Sousa *et al.*, 2018).

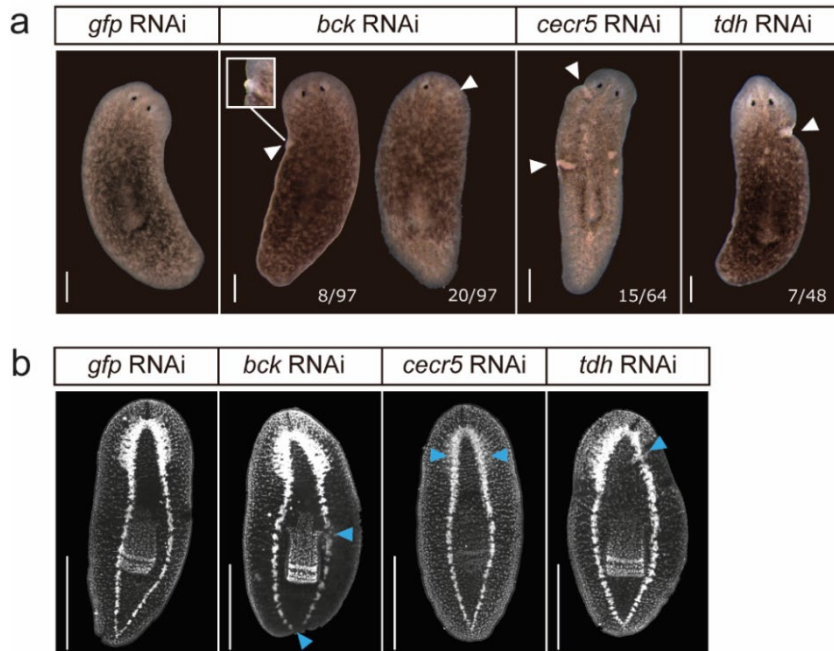


Figura 18. Fenotip dels gens candidats després de la seva inhibició.

a) Fenotip observat *in vivo* després de la inhibició dels gens candidats. Puntes de fletxa blanques indiquen zones despigmentades o sobrecreixements.

b) Marcatge del sistema nerviós. Observació del sistema nerviós a través del marcatge de Sinapsina després de la inhibició dels diferents gens candidats. Les puntes de fletxa blaves indiquen deficiències o interrupcions en el cervell o en els cordons nerviosos.

Anteriors estudis varen demostrar que després de la inhibició de *hpo* es veia afectat el balanç cel·lular, ja que augmenten les mitosi i disminueix l'apoptosi (de Sousa *et al.*, 2018). Per tal de poder comprovar si els gens candidats també presentaven aquests desajusts es van comprovar els nivells de proliferació i de mort cel·lular. Es va mesurar la quantitat de cèl·lules en fase M en cada condició utilitzant un anticòs anti-H3P (Histona 3 fosforilada a la Serina 10). El resultat va ser que després de la seva inhibició tant *cecr5* com *bck* presenten un augment de les cèl·lules en mitosi, similar a l'observat en animals *hpo* RNAi. Aquest augment de la proliferació no ocorre en el cas de *tdh* (Figura 19a). Mirant la mort cel·lular ocorre un fet similar. La disminució de l'apoptosi és només visible en *bck* i *cecr5* (Figura 19b). Per tal de descartar que hi hagués un augment de mida a causa d'un desajust del balanç cel·lular es varen mesurar els animals després de cada ronda d'injecció. Els animals RNAi dels gens candidats no varen variar la seva mida durant l'experiment, tal i com passa en els animals *hpo* RNAi (Figura 19c).

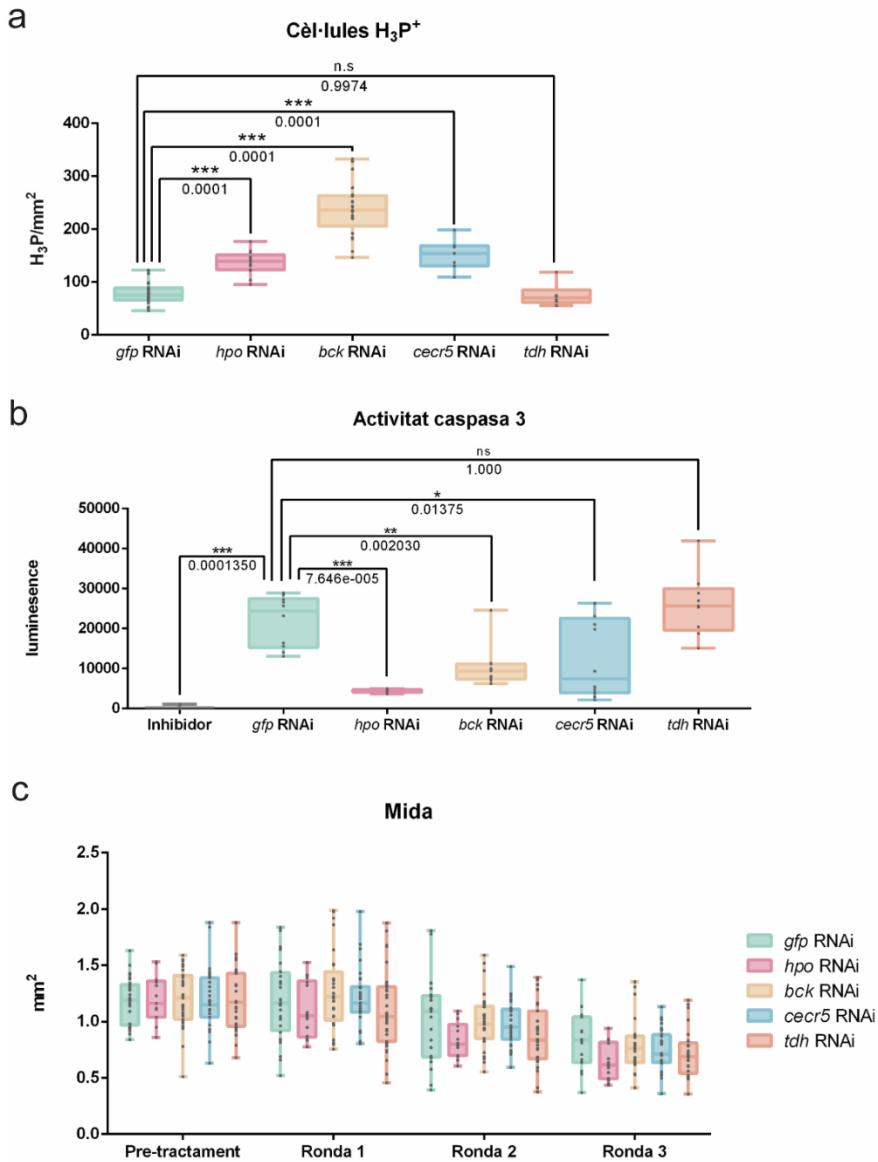


Figura 19. Canvis en el balanç cel·lular després de la inhibició dels gens candidats.

a) Marcatge de les cèl·lules en mitosi. Quantificació de cèl·lules H₃P⁺ durant les tres setmanes, o rondes, experimentals

b) Mort cel·lular determinada per la quantificació de l'activitat de la Caspasa 3. Quantificació de l'activitat Caspasa 3 normalitzada per la quantitat de proteïna del animal.

c) Canvis en la mida de les planàries. Àrea dels animals quantificada després de la finalització de cada una de les rondes de injecció.

Els gens candidats seccionats amb una funció a la mitocòndria produeixen el mateix fenotip que *hpo* després de la seva inhibició. Dos d'aquests gens (*bck* i *cecr5*) també presenten alteracions del balanç cel·lular, el què és compatible amb la hipòtesis de que el fenotip dels animals *hpo* RNAi té relació amb la funció mitocondrial.

1.3. Estructura de les mitocòndries després de la inhibició de *hpo*

Tant les anàlisis transcriptòmiques inicials com les anàlisis funcionals dels candidats ens indiquen que la funció mitocondrial podria desenvolupar un rol rellevant en el desenvolupament del fenotip observat després de la inhibició de *hpo*. La mitocòndria és un orgàdul determinant pel funcionament cel·lular, i canvis en la seva estructura poden significar canvis en la homeòstasi de la cèl·lula. Per aquest motiu, l'estudi de la ultraestructura mitocondrial és un bon indicador dels canvis en la seva funció.

Per a l'observació de l'estructura mitocondrial en aquests estudi s'utilitzaran dues tècniques diferents: la microscòpia electrònica de transmissió (*transmission electron microscopy* o TEM) i la microscòpia electrònica de rastreig de cara en sèrie (*serial block-face scanning electron microscopy* o SBFSEM).

Després de la inhibició de *hpo* durant tres rondes la ultraestructura de les mitocòndries va ser analitzada utilitzant TEM. En aquest estudi es varen poder observar que moltes estructures cel·lulars perdien la seva organització després de la inhibició de *hpo*. Per tal de poder trobar estructures comparables entre condicions experimentals es va decidir estudiar la zona subepidèrmica, que és fàcilment identificable. En aquesta zona les estructures principals com puguin ser la làmina basal o la musculatura circular es troben pobrament mantingudes però fàcilment identificables (Figura 20a). Per tal d'entendre els possibles canvis en l'estructura mitocondrial en aquest estudi es centra en les mitocòndries associades a la musculatura circular, la més externa de la planària (Figura 20a, fletxes).

Utilitzant TEM es van obtenir imatges de les zones subepidèrmiques de al menys dos animals per condició. Per a cada mitocòndria es va calcular l'àrea i el perímetre. El resultat d'aquesta quantificació indica que després d'inhibir *hpo* les mitocòndries presenten una major àrea i major perímetre (Figura 20b-c).

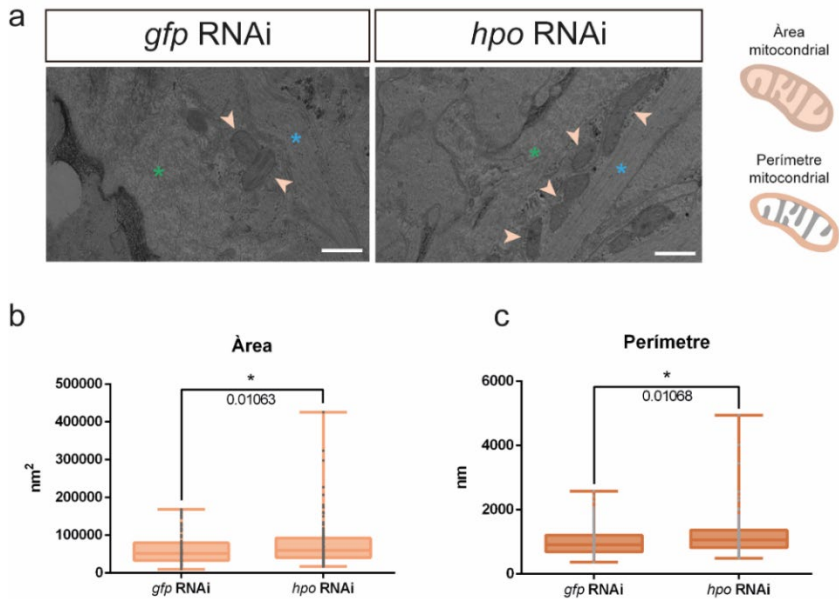


Figura 20. Mida de les mitocondries en imatges de TEM.

a) Imatges de TEM de la zona subepidèrmica. Els asteriscs verds indiquen la membrana basal, els asteriscs blaus la musculatura circular; les puntes de fletxes taronges senyalen les mitocondries. Barra d'escala 500nm.

b) Àrea calculada per les mitocondries de les imatges de TEM. Àrea calculada a partir de les imatges de TEM utilitzant Fiji.

c) Perímetre calculat per les mitocondries de les imatges de TEM. Perímetre calculat a partir de les imatges de TEM utilitzant Fiji.

Els estudis en TEM ens permeten observar l'estructura mitocondrial en dues dimensions però perdem informació sobre el volum total de l'orgànul. Per tal de poder fer un estudi en tres dimensions es va optar per utilitzar una nova tècnica de microscòpia que permetés reconstruir l'estructura 3D de les mitocondries, la SBFSEM. Amb Aquesta tècnica s'obtenen imatges consecutives que permeten la reconstrucció en tres dimensions de les estructures cel·lulars. Per fer aquestes reconstruccions es perfila manualment cada una de les estructures desitjades per tal de després poder integrar tots aquests plans en una estructura en tres dimensions (Figura 21a i Apèndix 3). Les reconstruccions d'aquesta anàlisi inclouen les estructures subepidèrmiques i les mitocondries associades a la musculatura circular. A partir de les reconstruccions obtingudes es pot calcular la superfície i el volum de les mitocondries. El que demostren aquests càlculs és que després de la inhibició de *hpo* hi ha un augment tant del volum com de la superfície de les mitocondries (Figura 21b-c).

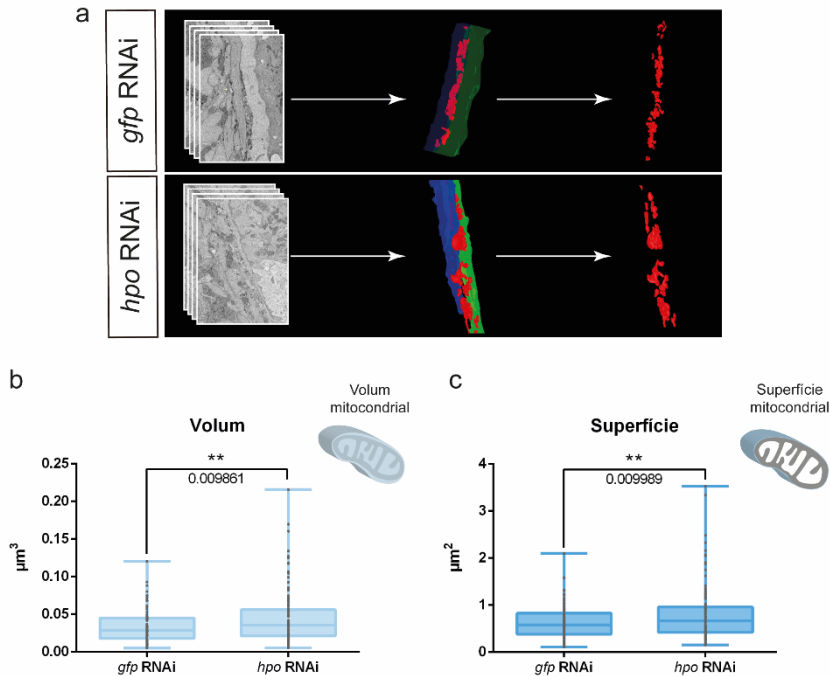


Figura 21. Mida de les mitocondries en les reconstruccions 3D.

a) Procediment per a la reconstrucció en 3D de les mitocondries i les estructures adjacents. Esquema del procés de reconstrucció utilitzant 3Dmod a partir de les imatges de SBFSEM. En blau la musculatura circular; en verd la làmina basal; en vermell les mitocondries.

b) Volum de les mitocondries reconstruïdes a partir de les imatges de SBFSEM. Valors calculats a partir de les dades del programa 3Dmod.

c) Superfície de les mitocondries reconstruïdes a partir de les imatges de SBFSEM. Valors calculats a partir de les dades del programa 3Dmod.

Els resultats de les anàlisis utilitzant TEM i SBFSEM conclouen que les mitocondries augmenten la seva mida després de la inhibició de *hpo*.

Les tècniques de microscòpia ens permeten afirmar que hi ha un augment en la mida de les mitocondries, però no sabem si aquest canvi de mida va associat a un canvi en la forma de les mitocondries. Seria possible que l'augment de mida no impliqués un canvi en la forma de la mitocondria, creant mitocondries més inflades. Una altra hipòtesis es que la forma de les mitocondries després de la inhibició de *hpo* sigui diferent a la observada en controls, donant lloc a mitocondries més allargades. Per tal d'esbrinar quina hipòtesis és certa es va mirar la forma de les mitocondries.

Utilitzant TEM podem determinar la forma de la mitocondria utilitzant dos paràmetres: la circularitat (Circ.) i la relació d'aspecte (AR). La circularitat és la relació entre l'àrea i el perímetre, que indica com de propera a una

circumferència es la forma de la mitocòndria; valors propers a 1 indiquen major circularitat. La relació d'aspecte és la raó entre l'eix major de la mitocòndria i el menor. Com major és el valor d'aquest índex més allargada és la mitocòndria. Després de la inhibició de *hpo* s'observa que la circularitat és menor, indicant que les mitocòndries canvien la seva forma allunyant-se més d'una circumferència que els controls (Figura 22a). En el cas de la relació d'aspecte podem observar que els animals *hpo* RNAi presenten una raó major, indicant que les mitocòndries en aquesta condició experimental són més allargades (Figura 22b). Ambdós resultats indiquen que la hipòtesi correcta és la segona: que en el animals *hpo* RNAi les mitocòndries pateixen un canvi de forma i són més allargades.

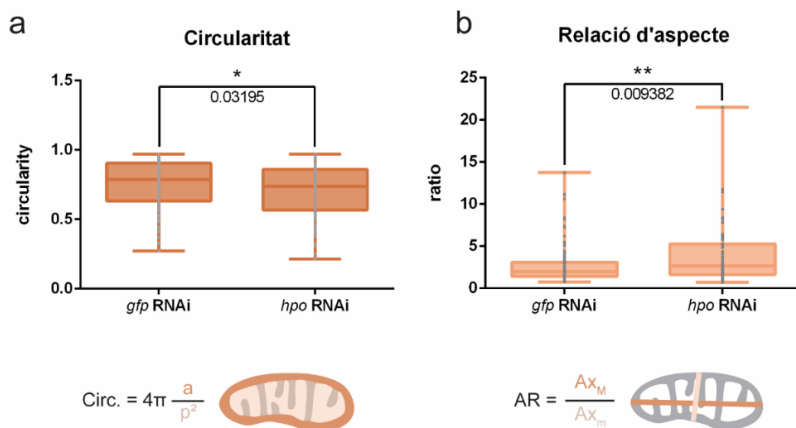


Figura 22. Estructura de les mitocòndries observades per TEM.

- a) Circularitat de les mitocòndries.** Càlcul de la circularitat a partir de l'àrea i el perímetre de les mitocòndries en animals *hpo* RNAi i controls observades per TEM.
- b) Relació d'aspecte de les mitocòndries.** Proporció entre l'eix major i menor de les mitocòndries en animals *hpo* RNAi i controls observades per TEM.

En el cas de les reconstruccions tridimensionals fetes a partir de les imatges de SBFSEM podem calcular com s'assimilen a una esfera les reconstruccions obtingudes, és a dir la seva esfericitat. Per poder calcular aquest paràmetre es fa el quocient del volum de la reconstrucció amb el suposat volum de l'esfera obtingut a partir del radi de la reconstrucció (Figura 23a). Quan la circularitat sigui propera a 1 indicarà que les mitocòndries són similars a una esfera, en canvi, un resultat major que 1 indica que la mitocòndria és major que una esfera. El càlcul de la esfericitat en les reconstruccions apunta a què les mitocòndries dels animals *hpo* RNAi són més diferents a una esfera que les control (Figura 23b). La diferència de forma de les mitocòndries després de la inhibició de *hpo* és pot observar a les reconstruccions, donant suport als càlculs d'esfericitat (Figura 23c i Apèndix 3)

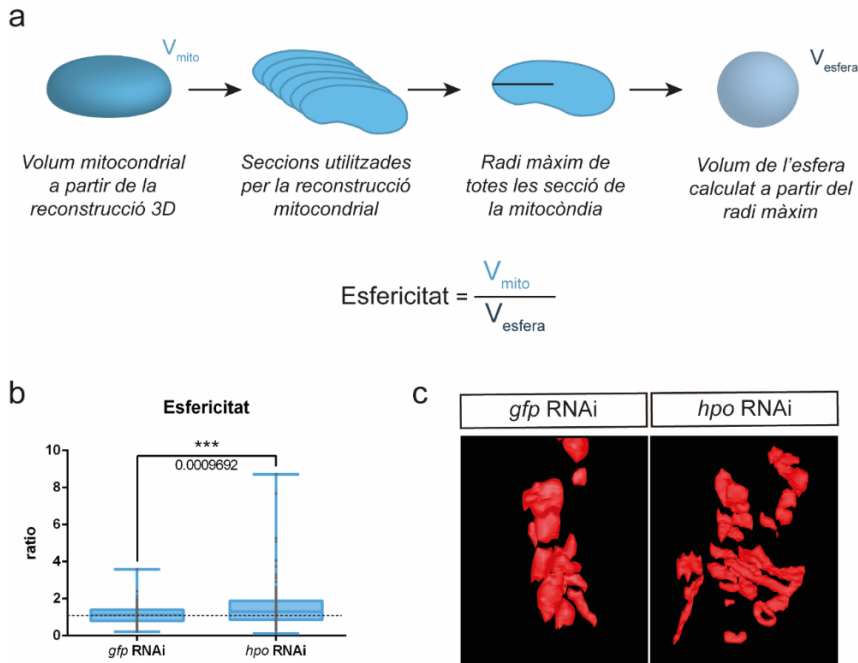


Figura 23. Forma de les mitocondries reconstruïdes a partir de les imatges de SBFSEM.

a) Esquema de l'estratègia utilitzada per calcular l'esfericitat de les mitocondries. Es divideix el volum obtingut a partir de les reconstruccions 3D amb el volum l'aproximació a una esfera d'aquesta mitocondria.

b) Esfericitat de les mitocondries. Càlcul de l'esfericitat utilitzant la relació descrita anteriorment.

c) Reconstruccions de les mitocondries en *gfp* RNAi i *hpo* RNAi. Imatge de la reconstrucció de les mitocondries on es pot apreciar les diferències de forma de les mitocondries.

Analizant les imatges en dues dimensions i en tres dimensions podem concloure que les mitocondries dels animals *hpo* RNAi són més allargades. Unes mitocondries més grans podrien ser a causa de què les mitocondries estiguessin inflades però aquesta hipòtesis queda eliminada a l'haver comprovat que aquestes canvien de mida. El resultats obtinguts demostren que en els animals *hpo* RNAi les mitocondries estan més fusionades.

1.4. Capacitat bioenergètica mitocondrial després de la inhibició de *hpo*

La forma de les mitocondries té implicacions en la seva funció cel·lular, com per exemple canvis en la eficiència bioenergètica, o capacitat metabòlica. Les imatges de TEM poden ajudar a extrapolar aquesta capacitat energètica de les mitocondries observant les crestes mitocondrials (Figura 24a). El coeficient d'eficiència energètica a la mitocondria (CEEM) permet determinar la capacitat

bioenergètica a través de l'estructura de la mitocondria i de les seves crestes. Com més gran és el valor d'aquest índex major serà la capacitat bioenergètica de la mitocondria. Utilitzant les imatges obtingudes per TEM es va calcular la quantitat de crestes i l'àrea de les mitocondries per tal d'obtenir el CEEM. Els resultats d'aquest càlcul es poden observar a la Figura 24b. Aquest anàlisi conclou que després de la inhibició de *hpo* hi ha un augment de la capacitat bioenergètica de les mitocondries.

Per tal de determinar amb una altra aproximació la capacitat bioenergètica de les mitocondries també es va decidir utilitzar un marcador molecular. Per fer-ho es va voler determinar els nivells proteics de la Citrat sintasa (CS) com a marcador d'activitat metabòlica. Aquest enzim és un enzim clau en l'entrada del cicle de Krebs, per tant és un bon marcador per a determinar la capacitat bioenergètica de l'organisme (Wiegand i Remington, 1986). Emprant la tècnica de Western blot es va poder determinar que els nivells de CS en animals *hpo* RNAi és major que en els controls, reafirmant la hipòtesis d'una major capacitat bioenergètica després de la inhibició de *hpo* (Figura 24c).

Tant el càlcul del CEEM utilitzant imatges de TEM com els nivells de CS indiquen que les mitocondries més allargades o fusionades del animals *hpo* RNAi tenen una major capacitat bioenergètica.

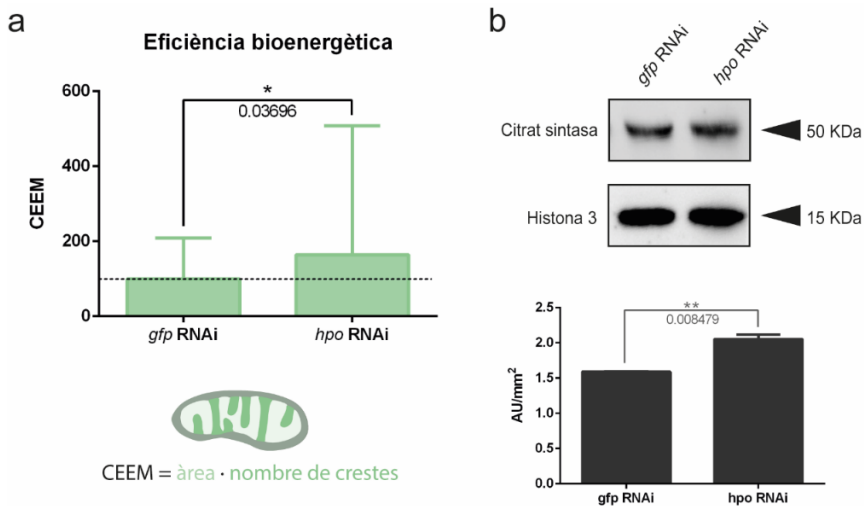


Figura 24. Capacitat energètica de les mitocondries després de la inhibició de *hpo*.

a) Eficiència bioenergètica calculada a partir de les imatges de TEM. Determinació de la CEEM a partir de l'àrea i el nombre de crestes de les mitocondries observades a les imatges de TEM.

b) Nivells proteics de Citrat sintasa. Quantificació dels nivells de la proteïna citrat sintasa per Western Blot. S'utilitza la quantificació de Histona 3 com a control de càrrega i per a normalitzar.

2. Caracterització de *foxo* i la seva implicació en la homeòstasi cel·lular en planàries

2.1. Anàlisi funcional de *foxo*

Nous anàlisis de la família gènica Fox (Forkhead box) han permès discernir noves famílies genètiques que es desconeixien en *S. mediterranea* (Pascual-Carreras *et al.*, 2021) (Article 1). Una d'aquestes famílies és la família gènica FoxO, que en planàries només consta d'un sol gen. Com la resta de Fox, *foxo* codifica per a un factor de transcripció capaç de regular la funció gènica.

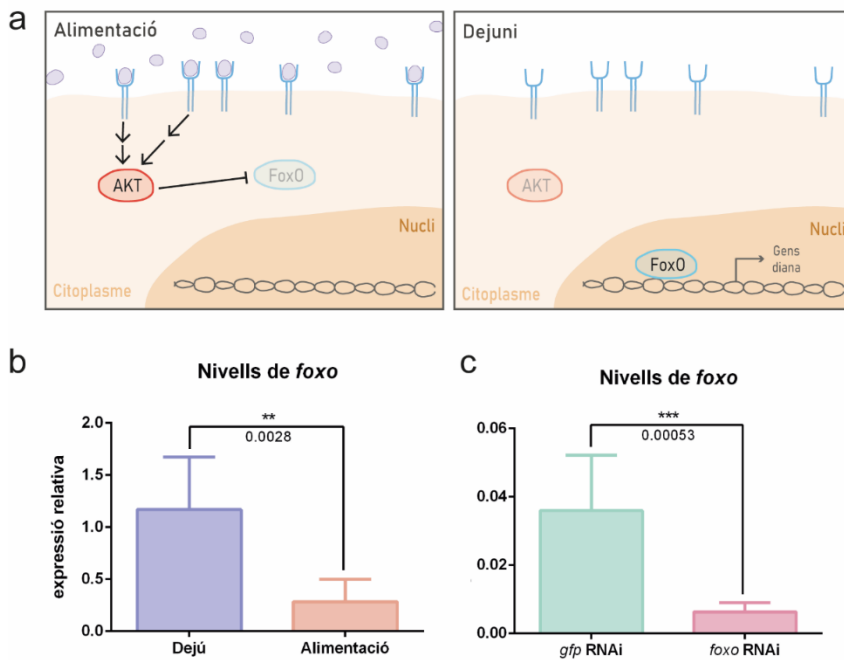


Figura 25. Regulació de FoxO a través de l'estat nutricional.

a) Esquema del mecanisme de regulació de FoxO a través de AKT en resposta a canvis nutricionals. En presència de nutrients hi ha activació dels receptors d'insulina que permeten l'activació d'AKT, que al seu torn, fosforila FoxO impedit la seva entrada la nucli. Quan AKT no està activat per senyals nutricionals FoxO pot translocar-se al nucli i activar els gens diana.

b) Nivells de *foxo* en diferents condicions nutricionals. Quantificació per qPCR dels nivells del mRNA de *foxo* en animals desdejunats i animals alimentats.

c) Nivells de *foxo* en animals RNAi en condicions de dejú. Quantificació per qPCR dels nivells del mRNA de *foxo* en animals desdejunats injectats durant dues setmanes amb *gfp* RNAi o *foxo* RNAi.

En diversos animals model s'ha demostrat que la funció de *foxo* es troba estretament regulada pels nivells nutricionals a través d'AKT. Quan l'animal té disponibilitat de nutrients, AKT inhibeix la funció de FoxO impedit que es localitzi al nucli; en canvi en situació de dejú AKT es troba inhibida i FoxO pot translocar-se al nucli i activar els gens diana (Figura 25a). Per tal de comprovar si els estats nutricionals també tenen un efecte en els nivells de FoxO en planàries, es van analitzar per qPCR els nivells de RNA de *foxo* en animals alimentats i en dejú. El resultat indica que efectivament en presència de nutrients *foxo* és troba inhibit (Figura 25b). Com a conseqüència d'aquest mecanisme tots els estudis funcionals de *foxo* es realitzaren en animals en dejú on s'ha comprovat que la inhibició del gen per RNAi és efectiva (Figura 25c).

La majoria dels gens de la família Fox estudiats en planàries produeixen un fenotip molt fort quan s'inhibeixen en animals regenerants, el que fa especialment interessant l'estudi de FoxO en aquesta condició. La inhibició de *foxo* durant dues setmanes amb amputació anterior indica que els animals no són capaços de regenerar correctament les estructures. Es pot observar que 11 dies després de l'amputació, els animals *foxo* RNAi no són capaços de regenerar correctament el cap. Si ens fixem en el sistema nerviós podem veure que aquests animals no han pogut regenerar el cervell (Figura 26a). Tot i que els animals presenten deficiències en la regeneració no hi ha canvis en la quantitat de cèl·lules en fase M durant els pics mitòtics ni a 11 dies després de l'amputació (Figura 26b).

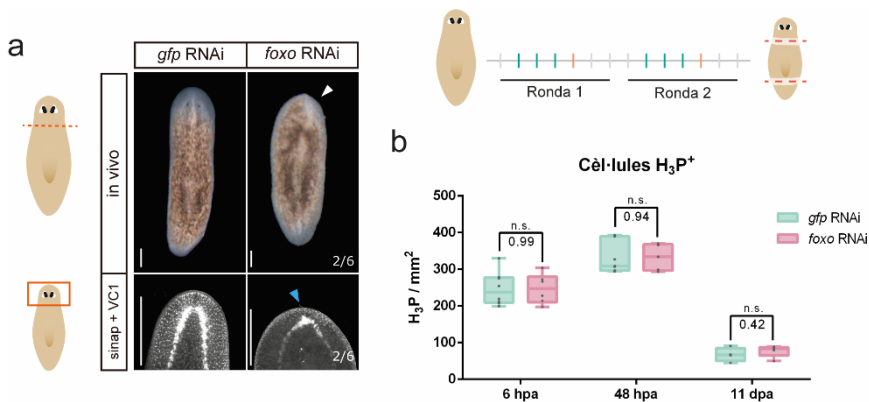


Figura 26. Fenotip dels animals *foxo* RNAi en regeneració.

a) Fenotip del animals 11 dies després de l'amputació. Al panell superior animals *in vivo*. En el panell inferior marcatge del sistema nerviós (Sinapsina) i òptic (VC1). Els animals varen sotmetre's a dues rondes d'injecció. Barra d'escala de 1mm.

b) Marcatge de les cèl·lules en mitosi. Quantificació de cèl·lules H₃P⁺ a diferents punts temporals després de dues rondes d'injecció.

En altres animals model s'ha establert *foxo* com un gen important en la regulació de la longevitat. Aquests resultats fan interessant l'estudi de la

inhibició de *foxo* en planàries intactes, que només has de regular la renovació tissular. L'estudi funcional en animals intactes indica que en planàries *foxo* RNAi hi ha una pèrdua d'estructures principals, com per exemple els ulls, a més de l'aparició de zones despigmentades (Figura 27a). El fenotip observat *in vivo* recorda al fenotip que apareix en animals *hpo* RNAi. Si observem el sistema nerviós és pot veure que hi ha interrupcions en el cervell o en els cordons nerviosos d'alguns animals (Figura 27a). Altres estructures de la planària també es veuen afectades, com per exemple la faringe. En animals on *foxo* ha estat inhibit hi ha una disminució significativa de la mida de la faringe i aquesta perd la estructura (Figura 27b).

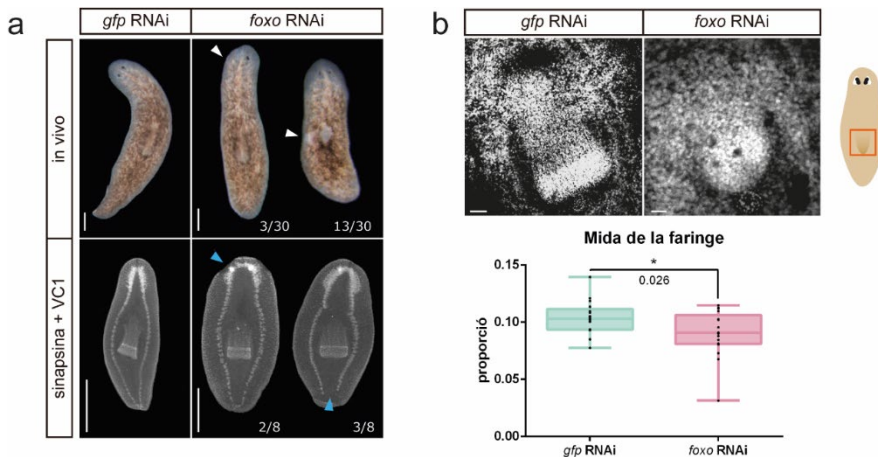


Figura 27. Fenotip dels animals intactes després de la inhibició de *foxo*.

a) Fenotip dels animals *foxo* RNAi després de dues setmanes d'injecció. Al panell superior animals *in vivo*. En el panell inferior marcatge del sistema nerviós (Sinapsina) i òptic (VC1). Barra d'escala de 1 mm.

b) Mida de la faringe. En el panell superior observació de la faringe a través del marcatge dels nuclis cel·lulars amb DAPI. Barra d'escala 1mm. Al panell inferior proporció de l'àrea de la faringe en comparació de l'àrea total del animal.

Les anàlisis funcionals realitzades tant en animals regenerats com intactes indiquen que després de la inhibició de *foxo* els animals presenten defectes en estructures importants de la planària com el sistema nerviós o la faringe, i que aquests defectes recorden molt el fenotip observat després d'inhibir *hpo*.

2.2. Estudi de la proliferació i la mort cel·lular després de la inhibició de *foxo*

Com hem vist, la inhibició de *foxo* en animals intactes dona lloc a defectes en estructures importants de la planària, que sembla que no puguin mantenir l'estat diferenciat. Aquests trets distintius són iguals als observats després de la inhibició de *hpo*, on s'han demostrat desequilibris en el balanç cel·lular (de

Sousa *et al.*, 2018). Per aquest motiu és interessant l'estudi de la proliferació i la mort en animals *foxo* RNAi.

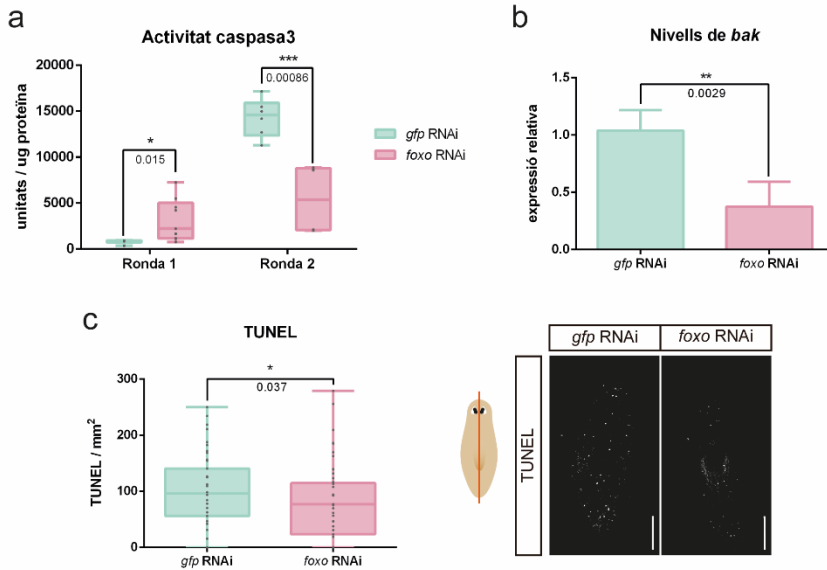


Figura 28. Canvis en la mort cel·lular després de la inhibició de foxo.

a) Quantificació de la mort per l'activitat de la Caspasa 3. Quantificació de l'activitat Caspasa 3 normalitzada per la quantitat de proteïna de l'animal.

b) Quantificació de la mort pels nivells de bak. Quantificació dels nivells de gen proapoptòtic *bak* per qPCR.

c) Quantificació de la mort per marcatge de cèl·lules TUNEL⁺. Al panell esquerre, quantificació de les cèl·lules TUNEL⁺ normalitzada per l'àrea total de la planària. Al panell dret, imatges d'una secció transversal de la planària marcada amb TUNEL en animals *gfp* RNAi i *foxo* RNAi. Barra d'escala 100 µm.

Per poder entendre si hi ha un desajust en el balanç cel·lular es va estudiar la mort en animals intactes utilitzant diferents aproximacions. L'estudi de l'activitat de Caspasa 3 permet determinar la mort després d'una i dues rondes d'inhibició. Aquest resultat ens indica que hi ha un augment de la mort després de la primera setmana de tractament però que acaba disminuint fins a valors inferiors al control (Figura 28a). Per tal de poder corroborar aquest resultat es van determinar els nivells de *bak* un gen implicat en l'apoptosi (Westphal, Kluck i Dewson, 2014). Es pot observar que es repeteixen els resultats obtinguts per Caspasa 3 en dues rondes (Figura 28b). Finalment es comprova mitjançant TUNEL, que també permet quantificar cèl·lules en apoptosi, sobre talls de parafina la quantitat de cèl·lules marcades en animals inhibits durant dues setmanes. Els resultats també indiquen una clara disminució de la mort en animals *foxo* RNAi (Figura 28c).

Sabent que hi ha canvis en la regulació de l'apoptosi en animals *foxo* RNAi és interessant mirar canvis en la proliferació. La quantificació de la quantitat H₃P en animals on *foxo* ha estat inhibit demostra que no hi ha augment de proliferació (Figura 29a). Sabent que hi ha canvis en la regulació de la mort però no de la proliferació es va quantificar la mida dels animals i es va demostrar que no hi ha variació en l'àrea de les planàries durant les dues rondes de inhibició (Figura 29b).

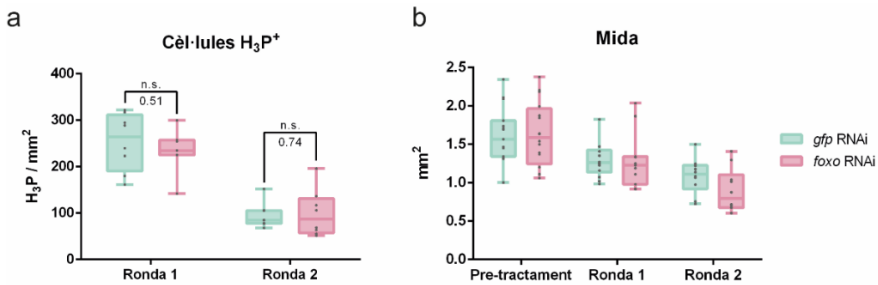


Figura 29. Canvis en proliferació i mida cel·lular després de la inhibició de *foxo*.

a) Marcatge de les cèl·lules en mitosi. Quantificació de cèl·lules H₃P⁺ durant les dues setmanes, o rondes, experimentals.

b) Mida de les planàries. Àrea dels animals quantificada després de la finalització de cada una de les rondes de injecció.

S'ha comprovat que en planàries on *foxo* es troba inhibit hi ha un augment de la mort, però que aquest no va associat a canvis en proliferació, i que es manté la mida de les planàries durant tot l'experiment. Per tal de poder estimar si hi ha un augment del nombre de cèl·lules, s'estudia l'epidermis de la planària. L'epidermis és una monocapa cel·lular organitzada que permet fàcilment comptar el nombre de cèl·lules presents. Es pot observar que després de la inhibició de *foxo* hi ha un augment de la densitat cel·lular a més d'una desorganització visible la monocapa (Figura 30a). La quantificació del nombre de cèl·lules per unitat d'àrea indica que hi ha un augment de cèl·lules epidermiques en animals *foxo* RNAi (Figura 30b).

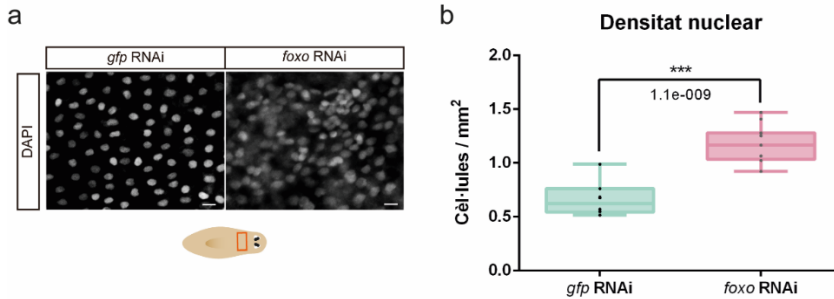


Figura 30. Densitat cel·lular de l'epidermis.

a) Distribució dels nuclis de l'epidermis. Observació dels nuclis de l'epidermis després de dues setmanes d'experimentació. Barra d'escala 10 µm.

b) Densitat dels nuclis del l'epidermis. Quantificació del nuclis de la monocapa epidèrmica normalitzat per l'àrea de la secció quantificada.

Per tant, podem concloure que després de la inhibició de *foxo* els animals no canvien la seva mida tot i que disminueix el nombre de cèl·lules que moren. Com a resultat d'aquest desequilibri entre la mort i la proliferació cel·lular es pot observar un augment del nombre cèl·lules, si més no de les epidèrmiques.

2.3. Observació de l'epidermis en animals *foxo* RNAi

En l'apartat anterior s'ha observat que hi ha un augment del nombre de cèl·lules a l'epidermis i que hi ha una possible desorganització d'aquest teixit. L'estructura cel·lular de la capa epidèrmica es pot observar marcant les unions intercel·lulars amb un anticòs anti- β -catenina (Figura 31a). En els controls es pot observar que l'epidermis forma una xarxa organitzada d'unions cèl·lula-cèl·lula i el nucli es troba el centre; en canvi després de la inhibició de *foxo* es perd el patró organitzat de les unions intercel·lulars, així com, l'estructura de monocapa característica de l'epidermis.

Per poder comprovar que hi ha un augment de les cèl·lules epidèrmiques vam quantificar els nivells de *vimentina*, un gen que s'expressa en cèl·lules diferenciades de l'epidermis (Eisenhoffer, Kang i Alvarado, 2008). El resultat indica que després de només una ronda d'inhibició ja hi ha un augment de l'expressió de *vim* i, per tant, del nombre de cèl·lules epidèrmiques (Figura 31b).

Els resultats obtinguts suggereixen que hi podria haver una acumulació de cèl·lules en zones puntuals de la planària però que aquestes no afecten a la mida de l'animal. Mitjançant talls de parafina es pot observar que en algunes zones dels animals on s'ha inhibit *foxo* apareixen sobrecreixements o acumulacions de cèl·lules que expressen PIWI (Figura 31c), un marcador de neoblasts (Reddien *et al.*, 2005). L'expressió de PIWI en zones properes a l'epidermis no s'observa en animals control. Al comprovar els nivells de mRNA

de *piwi* s'observa que hi ha un augment d'aquest marcador en animals on *foxo* ha estat inhibit (Figura 31d).

Podem concloure que després de la inhibició de *foxo* l'epidermis perd la seva estructura a causa de l'acumulació de cèl·lules. A més, en les cèl·lules d'aquest teixit s'observa un augment de marcadors de neoblasts o cèl·lules proliferatives que no s'expressen en els controls.

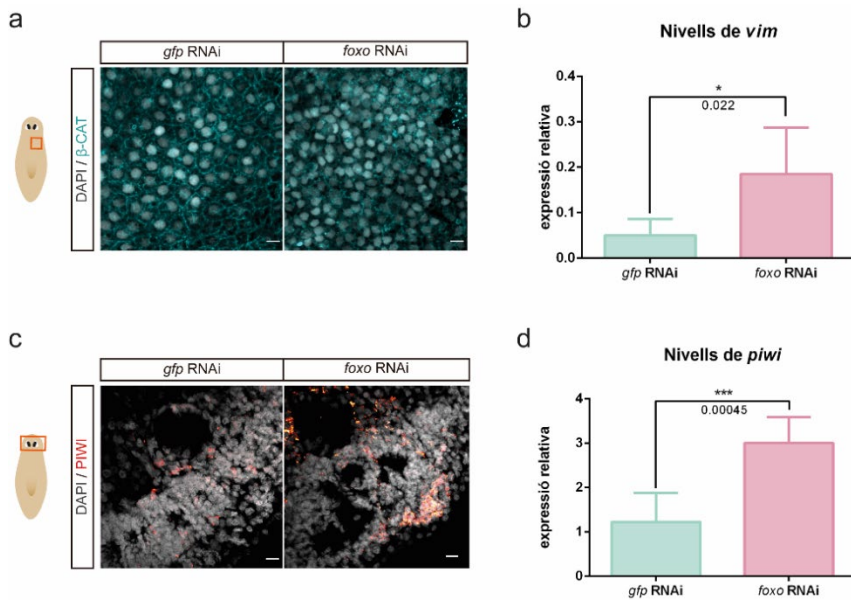


Figura 31. Estudi de l'estructura de l'epidermis.

a) Observació de les unions adherents de l'epidermis. Imatge de la monocapa epidèrmica, els nuclis es poden observar en gris i en blau es poden observar les unions adherents marcades amb β -catenina. El requadre vermell indica la zona de la planària representada a la imatge. Barra d'escala 10 μ m.

b) Quantificació dels nivells de *vimentina*. Quantificació per qPCR dels nivells de *vim* com a marcador de cèl·lula diferenciada de l'epidermis.

c) Imatge de l'acumulació de cèl·lules PIWI+. Immunohistoquímica sobre talls de parafina de la distribució de les cèl·lules PIWI+ en animals *gfp* RNAi i *foxo* RNAi. El requadre vermell indica la zona de la planària representada a la imatge. Barra d'escala 10 μ m.

d) Nivells de *piwi*. Quantificació dels nivells de *piwi* per qPCR.

2.4. Canvis en els nivells de ROS relacionats amb la funció de *foxo*

FoxO és un factor de transcripció amb capacitat d'unir-se al DNA i regular l'expressió de diferents gens. Per tal de poder determinar quins gens tenen motius d'unió a FoxO en les zones de regulació gènica vàrem utilitzar dades d'experiments d'ATAC-seq generades pel nostre laboratori (E. Pascual-Carreras *et al.*, 2020). La llista completa d'aquests gens es pot trobar a l'Apèndix 4. En aquesta llista trobem diversitat de gens que potencialment podrien ser regulats per *foxo*, entre ells gens encarregats de l'eliminació de ROS: la *superòxid dismutasa mitocondrial (sod2)* i l'enzim *glutatió peroxidasa (gpx)* (Figura 32a-b). La SOD2 és un enzim encarregat de l'eliminació dels superòxids (O_2^-) convertint-los en oxigen diatòmic (O_2) o peròxid d'hidrogen (H_2O_2). El peròxid d'hidrogen format té capacitat reductora de forma que també ha de ser eliminat a través de la GPx (Figura 32c).

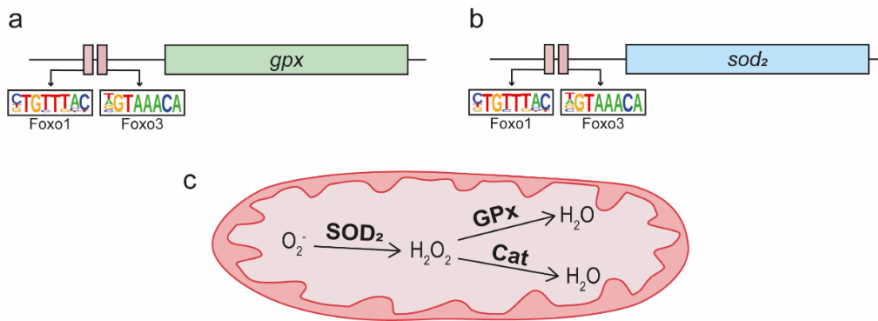


Figura 32. Mecanismes d'eliminació de ROS.

a) Representació dels mecanismes d'eliminació de ROS mitocondrials. Les ROS produïdes per la mitocondria es poden eliminar utilitzant tres enzims diferents depenent de la naturalesa química de les ROS.

b) Localització dels motius d'unió de FoxO en el gen *gpx*. Representació dels motius d'unió de FoxO a la zona reguladora de *gpx* segons la informació extreta de experiments d'ATAC-seq (E. Pascual-Carreras *et al.*, 2020).

c) Localització dels motius d'unió de FoxO en el gen *sod2*. Representació dels motius d'unió de FoxO a la zona reguladora de *sod2* segons la informació extreta de experiments d'ATAC-seq (E. Pascual-Carreras *et al.*, 2020).

Per tal de comprovar si FoxO controla l'expressió d'aquests gens reguladors de ROS, vam quantificar els seus nivells d'expressió per qPCR després de dues rondes d'inhibició de *foxo*. El resultat demostra que els dos gens que presentaven motius d'unió a FoxO, *gpx* i *sod2*, presenten significativament disminuïda la seva expressió després de la inhibició de *foxo* (Figura 33a-b). En canvi, els nivells de *cat* no és veuen afectats en animals *foxo* RNAi (Figura 33c). Cat és un altre enzim encarregat de l'eliminació de ROS que no mostrava dominis d'unió de FoxO en la seva regió reguladora.

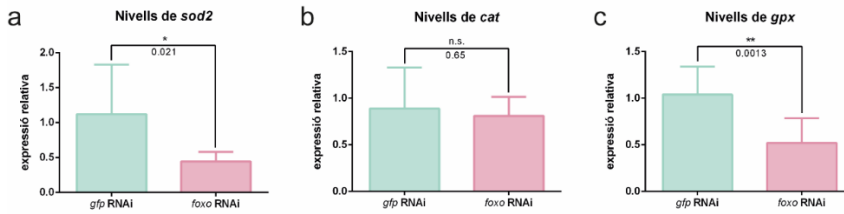


Figura 33. Nivells dels gens encarregats de l'eliminació de ROS a la mitocondria.

a) Nivells de *sod2* en animals RNAi. Quantificació per qPCR dels nivells del mRNA de *sod2* en animals injectats durant dues setmanes amb *gfp* RNAi o *foxo* RNAi.

b) Nivells de *cat* en animals RNAi. Quantificació per qPCR dels nivells del mRNA de *cat* en animals injectats durant dues setmanes amb *gfp* RNAi o *foxo* RNAi.

c) Nivells de *gpx* en animals RNAi. Quantificació per qPCR dels nivells del mRNA de *gpx* en animals injectats durant dues setmanes amb *gfp* RNAi o *foxo* RNAi.

Sabent que a l'inhibir *foxo* disminueixen els nivells dels gens encarregats de mantenir l'equilibri oxidatiu a la cèl·lula és interessant estudiar si hi ha canvis en els nivells de ROS. Per analitzar si varia la quantitat d'espècies reactives de l'origen en animals on *foxo* es troba inhibit vam tractar homogenats d'animals *foxo* RNAi amb H₂DCFDA. Aquesta molècula té la capacitat de travessar la membrana cel·lular i interaccionar amb esterases que canviaran la seva conformació retenint-la a l'interior de la cèl·lula. Finalment aquest reactiu canvia la seva estructura al ser oxidada per les ROS presents a la cèl·lula donant lloc a la DCF una molècula fluorescent (Figura 34a). Per determinar l'efectivitat d'aquesta nova tècnica es va aplicar el protocol en animals on ja s'havia descrit que hi havia un augment de ROS anteriorment. En un article publicat recentment s'ha demostrat que hi ha una explosió de ROS als 30 minuts després de l'amputació. A més a més en aquest mateix estudi també demostren que les planàries podrien sobreviure en concentracions d'entre 1,5 mM i 2,25 mM de H₂O₂ que la presència d'aquesta substància augmenta les ROS endògenes. (Jaenen *et al.*, 2021). A causa d'aquests resultats es va decidir provar el funcionament del H₂DCFDA en animals 30 minuts després de l'amputació del cap i en animals amputats tractats durant 2h amb 1,5 mM de H₂O₂. Els resultats d'aquests experiments indiquen que hi ha un augment de ROS en aquestes condicions, confirmant el bon funcionament d'aquest protocol (Figura 34b).

Gràcies a aquest nou protocol, que hem posat a punt en aquest treball, s'ha pogut quantificar els nivells de ROS en animals *foxo* RNAi a una i a dues rondes. El resultat, però, mostra que no es poden detectar diferències significatives en els nivells de ROS en animals *foxo* RNAi respecte els controls (Figura 34c)

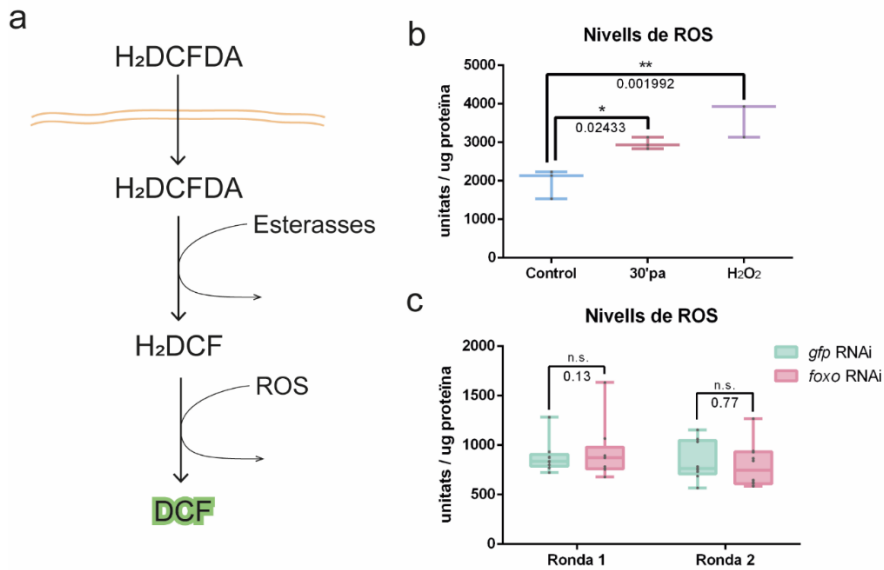


Figura 34. Determinació dels nivells de ROS.

a) Mecanisme d'acció de la H₂DCFDA. La molècula H₂DCFDA és capaç de creuar les membranes cel·lulars i ser reduïda per diferents ROS. La molècula reduïda emet fluorescència.

b) Nivells de ROS detectats per H₂DCFDA en condicions d'estrès oxidatiu. Quantificació dels nivells de ROS en animals control intactes, animals on s'ha amputat el cap 30 minuts abans i en animals tractats amb 1,5 mM de H₂O₂.

c) Nivells de ROS detectats per H₂DCFDA en animals *foxo* RNAi. Quantificació dels nivells de ROS després de les diferents setmanes de inhibició de *foxo*.

2.5. Regulació de *hpo* a través de *foxo*

A partir de l'anàlisi anterior de les dades de ATACseq, a més de gens relacionats amb l'eliminació de ROS, vam trobar que FoxO també presenta dos dominis d'unió en les zones reguladores del gen *hpo* (Figura 35a). Per tal de poder comprovar si FoxO té capacitat de regular la funció de *hpo* vam analitzar els seus nivells d'expressió mitjançant una hibridació in situ amb la sonda de *hpo* en animals on *foxo* es troba inhibït. El resultat indica que quan *foxo* es troba inhibït l'expressió de *hpo* també es veu minvada (Figura 35b).

En conclusió, *foxo* regula l'expressió de *hpo* molt probablement de manera directa, a través dels motius d'unió a les zones reguladores del gen. Això podria explicar la similitud entre els fenotips de *hpo* i *foxo* RNAi.

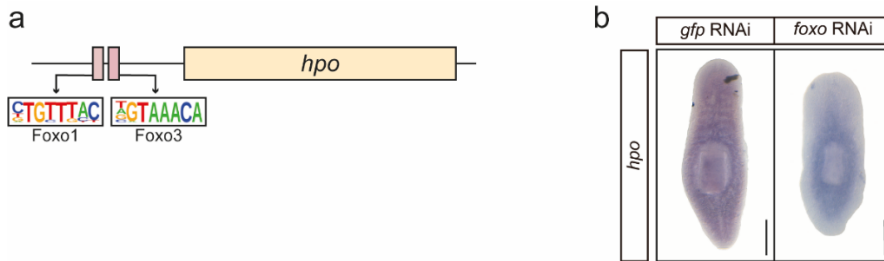


Figura 35. Relació de FoxO amb la via Hippo.

a) Localització dels motius d'unió de FoxO en el gen *hpo*. Representació dels motius d'unió de FoxO a la zona reguladora de *hpo* segons la informació extreta de dades d'ATAC-seq (E. Pascual-Carreras *et al.*, 2020).

b) WISH de *hpo* en animals *foxo* RNAi. Hibridació *in situ* de la sonda contra *hpo*. Barra d'escala 2 mm. $n \geq 5$.

3. Establiment de la seqüenciació utilitzant ONT per a l'estudi dels estats nutricionals en planàries

La seqüenciació per ONT és basa en la seqüenciació utilitzant nanopors associats a un enzim. Aquesta seqüenciació permet seqüenciar transcrits complets i a més és independent de polimerasa. Aquestes característiques el fan aquest mètode especialment atractiu per la seqüenciació en planàries on tant el transcriptoma com el genoma presenten zones mal anotades. La posada apunt d'aquesta tècnica permetrà la obtenció de nous transcrits millor anotats en planàries.

3.1. Anàlisi del rendiment del mètode de seqüenciació

La seqüenciació es va portar a terme a partir d'una llibreria de cDNA que constava de 12 mostres multiplexades; quatre rèpliques de tres condicions experimentals (animals alimentats, desdijunats i regenerants). La tècnica de multiplexat consisteix en la seqüenciació d'una sola llibreria on les diferents mostres estan etiquetes amb diferents *barcodes* o etiquetes identificatives. La seqüenciació duta a terme utilitzant MinION d'ONT on es varen obtenir 3692000 *reads* que varen ser filtrats depenent del seu valor Q; 3340000 *reads* amb qualitat suficient ($Q \geq 7$) varen ser classificats com a “*pass*” mentre que 352000 *reads* no varen superar aquest llindar i varen ser classificats com a “*fail*”. Al seu torn totes aquestes seqüències varen ser catalogades segons la seva etiqueta identificativa o *barcode*. A la Figura 36 podem observar la distribució de les seqüències entre els diferents *barcodes*. La categoria de no classificats correspon a les seqüències on no s'ha pogut detectar cap etiqueta. L'eficiència de classificació de les diferents etiquetes és bastant similar tot i que destaca el *barcode03* que presenta un major nombre de *reads* que la resta (15,23% en “*pass*” i 0,39% en “*fail*”). El *barcode* amb menor eficiència és el *barcode12* (3,67% en “*pass*” i 0,10% en “*fail*”). Cal destacar que les seqüències “*pass*” representen el 90,46% de seqüències etiquetades, indicant el bon funcionament del mètode de la seqüenciació.

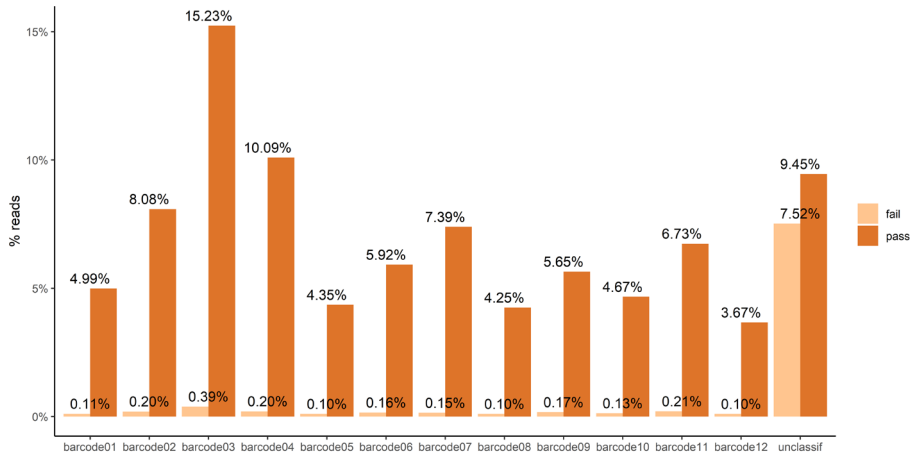


Figura 36. Distribució dels reads en els diferents codis d'etiquetatge.

Quantitat de seqüències identificades per les diferents etiquetes. La categoria "pass" fa referència a les seqüències amb $Q \geq 7$ i la "fail" a aquells reads amb $Q < 7$.

Les seqüències obtingudes a la categoria "pass" varen ser utilitzades per a la realització de la resta d'experiments. Durant el procés de seqüenciament es va realitzar el *basecalling* i el demultiplexat. El procés de *basecalling* consisteix en assignar a cada pic elèctric detectat pel porus del sistema de seqüenciament una base nitrogenada. A causa de la naturalesa de l'encebador utilitzat per a obtenir el cDNA, els reads encara presentaven una seqüència flanquejant que havia de ser eliminada. El procés de neteja subsegüent va permetre l'eliminació d'aquest encebador en un 99,9993% (3339978 / 3340000) de les seqüències. A la Figura 37 podem observar que després de l'eliminació de l'encebador hi ha una disminució, esperada, de la mida dels reads. La llargada mitjana dels reads inicials és de 385,5927 pb i disminueix a 368,1455 pb després de la neteja. Aquesta relació és manté estable a les dades repartides entre els diferents codis d'etiquetatge.

Les seqüències obtingudes a partir de la seqüenciament amb ONT en planàries són d'alta qualitat i el mètode d'etiquetatge funciona correctament donant resultats d'alta resolució.

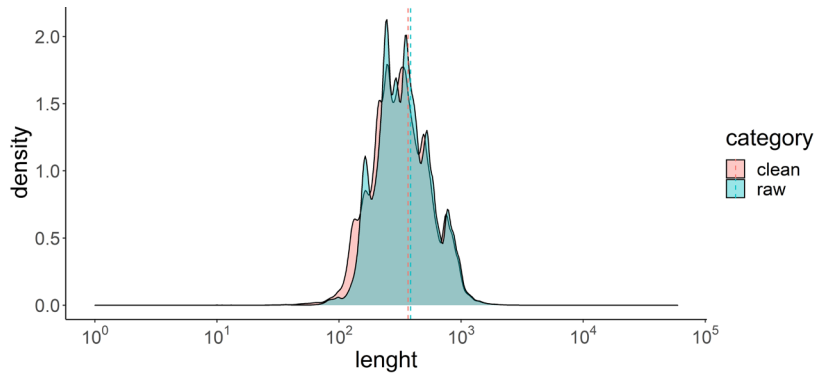


Figura 37. Mida dels *reads* després de l'eliminació de les seqüències flanquejants.

Distribució de la mida dels *reads* abans i després de la neteja de la seqüència flanquejant. Les línies discontinues mostren les mitjanes: “clean” 368,1455 pb, “raw” 385,5927 pb.

3.2. Assemblatge *de novo* del transcriptoma

A partir de les dades netes es va poder assemblar el transcriptoma utilitzant el programa `RATTLE`. Aquest nou programa ens va permetre agrupar i autocorregir els *reads* per a finalment aconseguir un nou transcriptoma. A la Figura 38 podem observar la distribució de mides i el percentatge de guaninacitocina (%GC) dels *contigs*. El nou transcriptoma consta de 9010 *contigs* diferents, on el més llarg obtingut està compost per 20,695 kpb. El %GC en el transcriptoma és de 33,93%, al voltant del que hom esperaria donada la composició del genoma (Grohme *et al.*, 2018)

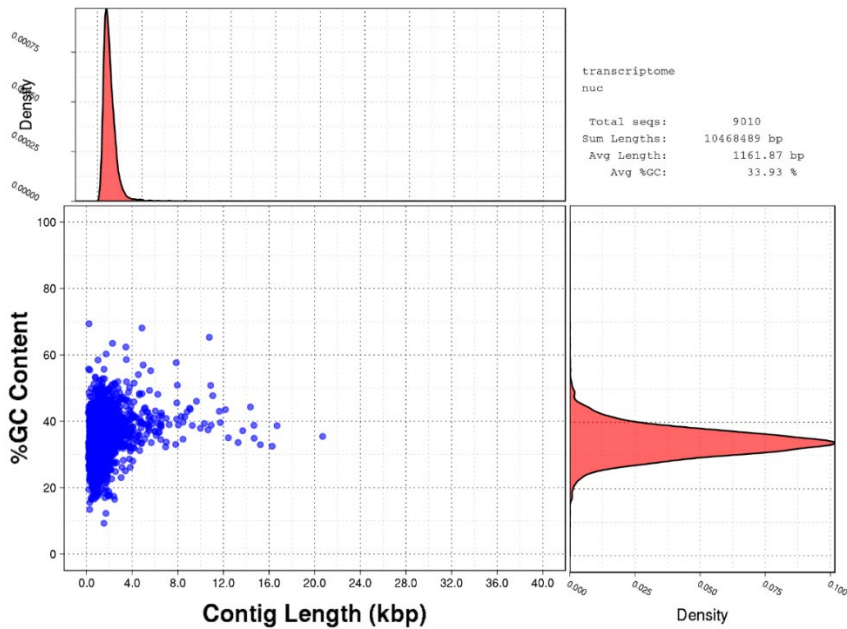


Figura 38. Distribució dels *contigs* per mida i %GC.

Densitat de *contigs* per llargada i %GC després de l'assemblatge i refinament del transcriptoma amb RATTLE.

Per tal de poder avaluar la fiabilitat dels *contigs* obtinguts vàrem determinar quina era la pauta de lectura oberta (ORF) més llarga utilitzant ESTscan. Aquest programa té la capacitat de predir el ORF dels diferents *contigs* obtinguts tenint en compte possibles errors de seqüenciació (tant a nivell de substitucions com d'insercions/delecions) que poden alterar la pauta de lectura. L'obtenció del ORF de forma directa pot donar lloc a transcrits truncats a causa de l'aparició d'errors de seqüenciació que provoquen la terminació de la transcripció. A la Figura 39 es mostra una comparació entre la traducció directa de l'ORF més llarg o bé de les ORF predites utilitzant ESTscan. Es pot comprovar en aquesta comparació que utilitzant la predicció directa en la majoria dels *contigs* només un 25% de la seqüència és identificada com a ORF (Figura 39a). A l'utilitzar ESTscan aquest percentatge puja considerablement; podem observar que els transcrits de mida gran tenen associat un ORF llarg, indicant que aquestes seqüències putativament podrien ser traduïdes totalment a proteïna (Figura 39b).

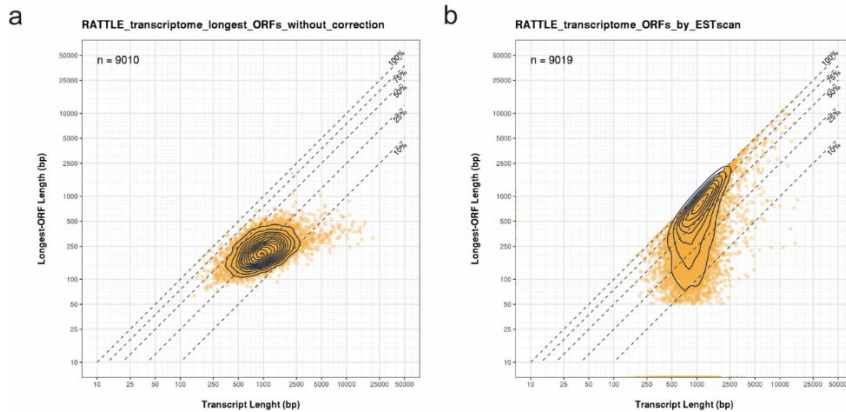


Figura 39. Comparació dels ORFs obtinguts sense correcció i amb ESTscan .

a) Comparació dels ORFs sense correcció d'errors. Gràfica de la llargada dels transcrits contra la dels ORFs més llargs obtinguts per traducció directa de la pauta de lectura per cada transcrit.

b) Comparació dels ORFs utilitzant ESTscan. Gràfica de la llargada dels transcrits contra la dels ORFs predit utilitzant ESTscan. Cada punt correspon a la seqüència d'un *contig*, n correspon al nombre de seqüències, les línies discontinues de les diagonals indiquen el percentatge de la mida del transcrit que es pot traduir a una ORF.

Per poder estimar la validesa del nou assemblatge a la Figura 40 es mostra la predicció d'ORFs sobre diferents conjunt de dades de referència. A la Figura 40b podem veure representades les dades de tots els CDS "complets" disponibles a GenBank per planàries. Aquestes són seqüències validades que s'han utilitzat per construir la matriu de predicció d'ESTscan; per tant aquest seria el conjunt de dades de referència amb evidències experimentals que ja han estat descrites i validades. A la Figura 40c-d s'observen dos transcriptomes en planàries; la Figura 40c correspon a les dades del transcriptoma de Dresden (dd_Smed_v6) (Brandl *et al.*, 2016) un transcriptoma assemblat *de novo* a partir de *reads* curts seqüenciats amb Illumina mentre que a la Figura 40d hi ha representades les dades del transcriptoma de referència més recent obtingudes a partir de la predicció de gens utilitzant les dades d'altres transcriptomes disponibles i del genoma (Rozanski *et al.*, 2019). Podem observar que en ambdós conjunts de dades la distribució de la mida del transcrit i l'ORF és una mica millor que la nostra, perquè hi ha un major nombre de *contigs* (identificats a les gràfiques com a n). A l'estar treballant amb un conjunt de dades amb una cobertura més gran és fàcil que hi hagi un augment de la qualitat de les seqüències, que inicialment hauria de facilitar l'assemblatge.

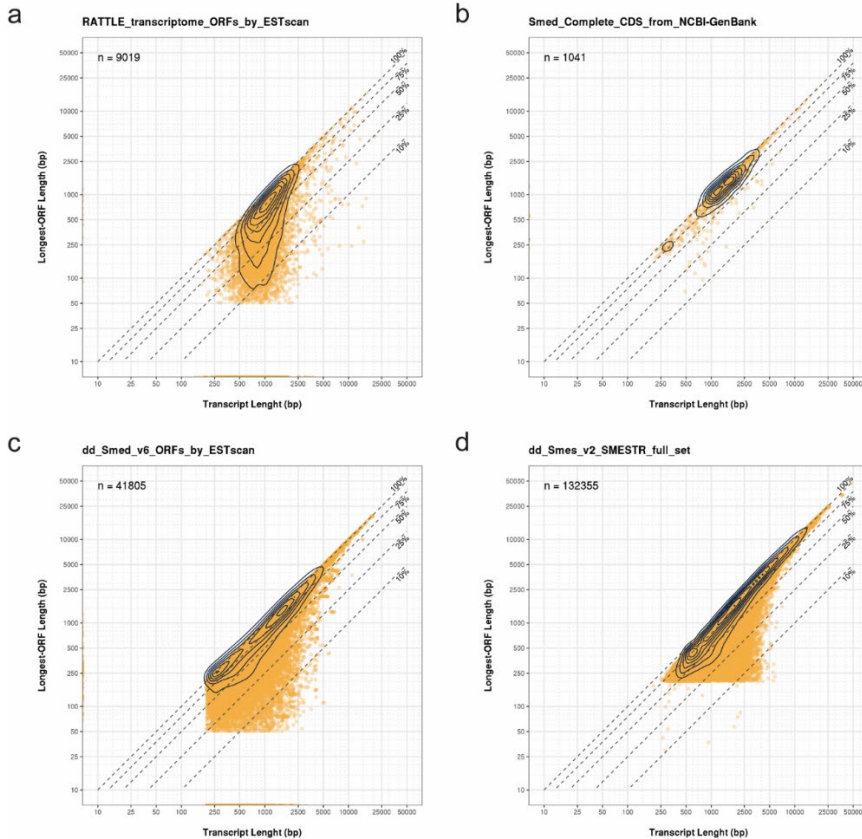


Figura 40. Comparació dels ORFs sobre diferents conjunts de dades de referència.

a) Comparació dels ORFs del nou transcriptoma *de novo*. Gràfica de la llargada dels transcrits contra els ORFs predits utilitzat *ESTscan* del nou transcriptoma obtingut en aquest treball.

b) Comparació dels ORFs utilitzant els CDS de GenBank. Gràfica de la llargada dels transcrits contra els ORFs anotats com a CDS disponibles a GenBank.

c) Comparació dels ORFs de les dades del transcriptoma de Dresden. Gràfica de la llargada dels transcrits contra els ORFs predits per les seqüències del transcriptoma *dd_Smed_v6*.

d) Comparació del ORF de les dades de SMESTR. Gràfica de la llargada dels transcrits contra els ORFs predits per les seqüències del transcriptoma. Cada punt correspon a la seqüència d'un contig, *n* correspon al nombre de seqüències, les línies discontinües de les diagonals indiquen el percentatge de la mida del transcrit que es pot traduir a una ORF.

En resum podem veure que tot i tenir un nombre de *reads* menor que en la resta de transcriptomes les nostres dades presenten transcrits que poden traduir a proteïna amb una ràtio similar a les dades de referència. Es pot concloure que la seqüenciació amb ONT proporciona *reads* útils per a la reconstrucció de genomes *de novo*.

3.3. Anotació dels *contigs*

Després de l'obtenció del transcriptoma es va procedir a la seva anotació. Per fer-ho es va fer un NCBI-BLAST contra els transcriptomes de referència en planàries (SMESTR v2 i Dresden v6). Per fer aquest alineament no es van utilitzar les seqüències dels *contigs* sinó la seqüència proteica predita a partir dels resultats de ESTscan. Els resultats obtinguts indiquen un 70,16% (6321/9010) de les seqüències tenen un encert a les bases de dades de planàries. A més a més els *contigs* del nostre transcriptoma es van alinear contra el genoma de referència amb l'eina GMAP, doncs es va decidir visualitzar-los al navegador genòmic JBrowse de PlanNet (Castillo-Lara i Abril, 2018). Aquesta navegador permet visualitzar la ubicació dels *contigs* respecte de la resta de transcrits descrits en els conjunts de transcriptomes previs, així com poder comparar fàcilment les estructures exòniques anotades a cadascuna de les pistes (*annotation tracks*). A la Figura 41 podem veure dos exemples d'aquesta visualització. A la Figura 41a podem observar com a través d'ONT s'ha pogut anotar una nova isoforma, amb l'identificador `clúster_88503` (exons en groc), del gen anotat al genoma `SMESG000006323.1` (exons en lila). L'homòleg en humans d'aquest gen és AFG3L2, un gen amb funció mitocondrial implicat la paraparèsia espàstica hereditària (Pierson *et al.*, 2013). En el cas de la Figura 41b, aquesta ens permet veure clarament com el `SMESG000027224.1` (exons en lila) està truncat en l'assemblatge de Dresden (exons en verd), però s'ha recuperat sencer en el `clúster_352` (exons en groc). Aquests són dos exemples de la utilitat d'aquesta representació genòmica que podrà permetre als investigadors buscar noves isoformes per estudiar algun gen, o conjunt de gens, d'interès.

Podem concloure que el transcriptoma obtingut utilitzant ONT és de bona qualitat i pot ser alineat amb els transcriptomes anteriorment disponibles en planàries. A més a més aquest sistema de seqüenciació permet observar noves isoformes de *splicing* que no havien estat detectades fins al moment.

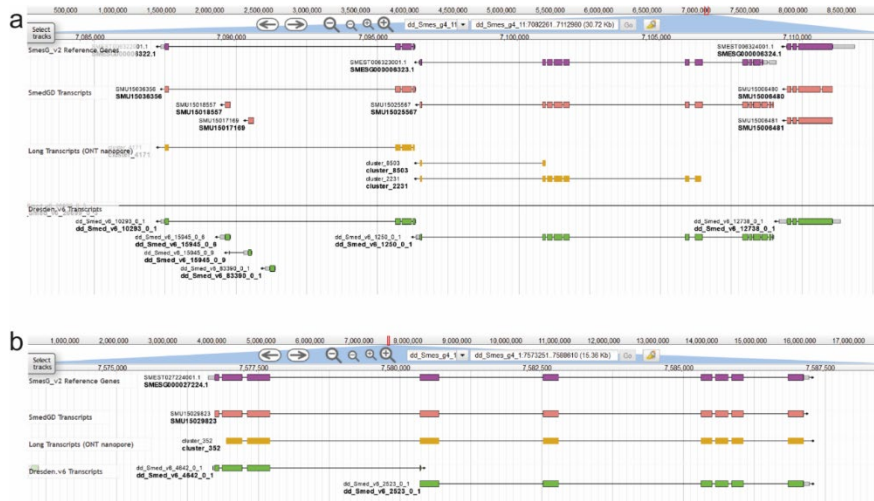


Figura 41. Visualització dels contigs al navegador genòmic JBrowse de PlanNet.

a) Representació dels transcrits de la regió genòmica dd_Smes_g4:7082261-7112980. Visualització dels transcrits obtinguts amb diferents estratègies on inclou els contigs assemblejats amb ONT.

b) Representació dels transcrits de la regió genòmica dd_Smes_g4:7573251-7588610. Visualització dels transcrits obtinguts amb diferents estratègies on inclou els contigs assemblejats amb ONT.

En lila transcrits predits a partir del genoma (SmesGenes v2) (Rozanski *et al.*, 2019), en vermell transcrits projectats amb les anotacions de la base de dades SmedGD (Robb *et al.*, 2015), en groc transcrits obtingut per ONT en aquest treball, en verd transcrits anotats pel transcriptoma de Dresden (dd_Smed v6) (Brandl *et al.*, 2016). Coordenades segons el format:

scaffold_assemblat_genoma_versió_4:coordenada_inicial-coordenada_final.

3.4. Anàlisi d'expressió diferencial

L'anàlisi d'expressió diferencial (Differential Gene Expression Analysis o DGE), es va iniciar alineant els diferents *reads* contra tots els contigs del nostre assemblat del transcriptoma. Amb Salmon vàrem obtenir el conjunt de comptatges per a cadascuna de les mostres seqüenciades. En qualsevol anàlisi de DGE és important normalitzar i filtrar les dades. El primer filtratge utilitzat consisteix en eliminar tots els transcrits que presentin menys de dos comptatges a la suma de totes les condicions experimentals. L'objectiu d'aquest refinament és corregir els efectes de la mida mostral disminuint el biaix en el processament posterior de les dades. En relació a la normalització es poden utilitzar diferents mètodes; a la Figura 42 podem veure 3 mètodes diferents. La representació del comptatges crus presenta una major diferència entre els valors extrems (Figura 42a). Per tal de poder disminuir aquesta dispersió els valors es poden representar com a comptatges per milió (CPM) (Figura 42b), que permet corregir la profunditat de seqüenciació i el biaix de la

composició del transcriptoma. La funció *rlog* del paquet *DESeq2* (Love, Huber i Anders, 2014) és un altre mètode de normalització que transforma els comptatges per minimitzar les diferències entre mostres amb columnes amb valors petits. L'expressió normalitzada utilitzant aquest mètode es mostra a la Figura 42c. Aquest mètode és el que proporciona menor dispersió de l'expressió dels tres mètodes utilitzats. A més a més, podem observar que aquesta baixa variació es manté després del filtratge per baix comptatge (Figura 42d).

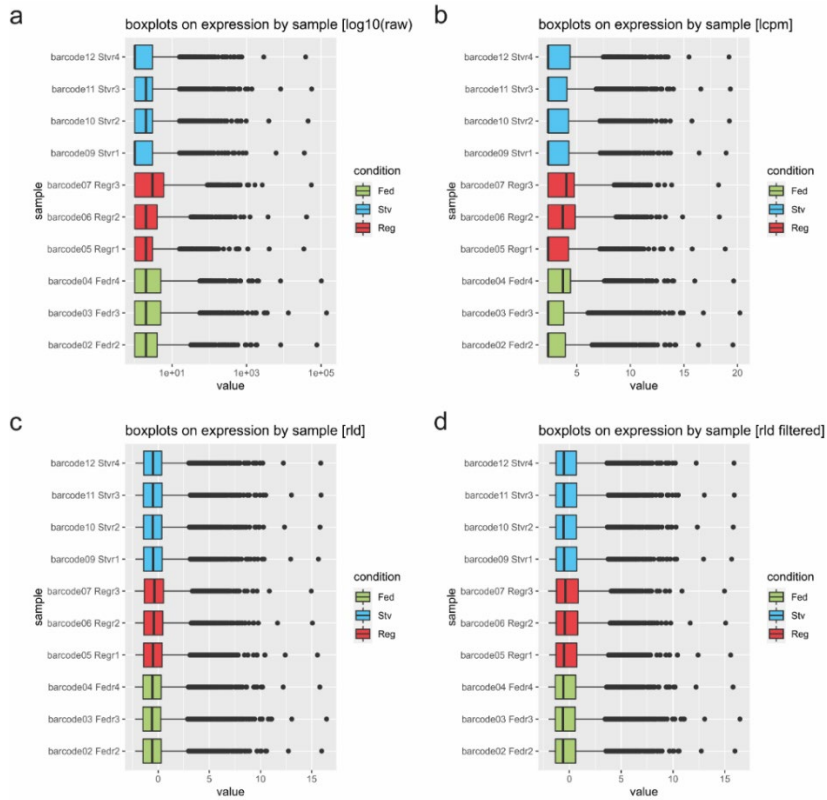


Figura 42. Expressió a cada rèplica amb diferents transformacions.

a) Expressió de les mostres com a comptatges absoluts. Expressió de les diferents llibreries sense cap transformació, directament com a comptatges.

b) Expressió de les mostres com a CPM. Expressió de les diferents llibreries transformant les dades a Counts per Million (CPM).

c) Expressió de les mostres com a *rlog*. Expressió de les diferents llibreries transformades amb la funció *rlog*.

d) Expressió de les mostres com a *rlog*. Expressió de les diferents llibreries transformades amb la funció *rlog* eliminats aquells gens que tenen menys de dos comptatges a totes les rèpliques.

Un cop s'han obtingut les dades filtrades s'ha comprovat si les dades s'agrupen per condició mitjançant un anàlisi de components principals (*Principal Component Analysis* o *PCA*). A la Figura 43a podem observar com es distribueixen les diferents mostres en l'espai de la primera i la segona component (on tenim aproximadament un 31% de la variància acumulada). En el cas de les rèpliques de la condició "Strv" trobem que s'agrupen totes però aquesta divisió no és tan clara per les altres dues condicions. Les rèpliques 2, 3 i 4 de "Fed" queden més diferenciades, però la rèplica 1 d'aquesta condició sembla estar clarament dins el grup de "Reg". Quan ens fixem amb el grup regenerats podem observar que Reg4 també està allunyat de la resta de mostres de la mateixa condició. Per tots aquests motius es decideix prescindir de la les rèpliques Reg4 i Fed1. Al calcular una nova PCA sense les rèpliques anteriorment esmentades podem veure com clarament en aquest cas es divideixen correctament les tres condicions experimentals, on a més augmentem la variància acumulada a gairebé un 37% (Figura 43b).

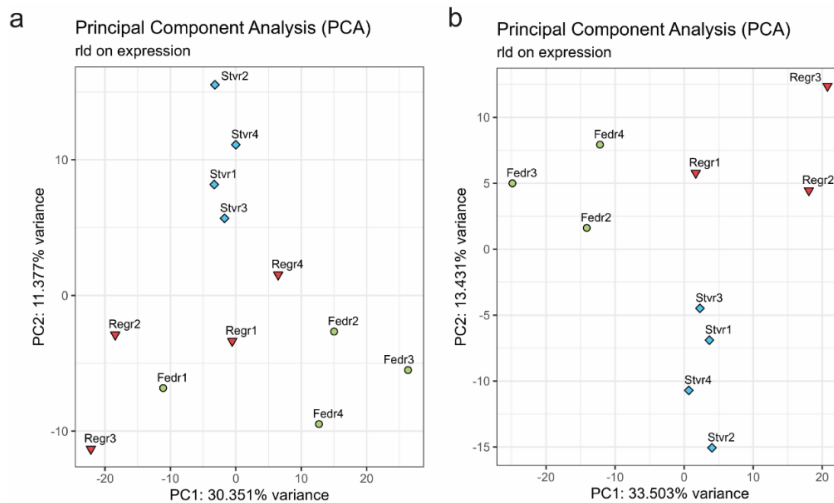


Figura 43. Anàlisi de components principals.

a) PCA de totes les rèpliques. Representació de totes les mostres seqüenciades en l'espai de les dues primeres coordenades principals.

b) PCA eliminant dues rèpliques considerades valors aberrants. Representació de la distribució de les mostres en l'espai de les dues primeres coordenades principals després d'eliminar Regr4 i Fedr1.

Es van realitzar tres contrast d'hipòtesi diferents per obtenir els gens diferencialment expressats. Les tres condicions són: animals alimentats contra desdejunats, animals regenerants contra animals alimentats i animals regenerants contra animals desdejunats. Per cadascuna d'aquestes condicions es va obtenir una taula dels gens diferencialment expressats de manera significativa (Apèndix 5). Els gens diferencialment expressats han estat filtrats

pel canvi relatiu (fold change o FC) i el p-valor. A la Figura 44 podem veure aquests filratges representats en forma de *Volcano plot*. La condició que reuneix més gens diferencialment expressats és la comparació dels animals alimentats amb el regenerants (Reg_vs_Fed) i la que presenta una menor quantitat de gens que divergeixin de forma significativa és la comparació entre animals regenerants i alimentats (Reg_vs_Stv).

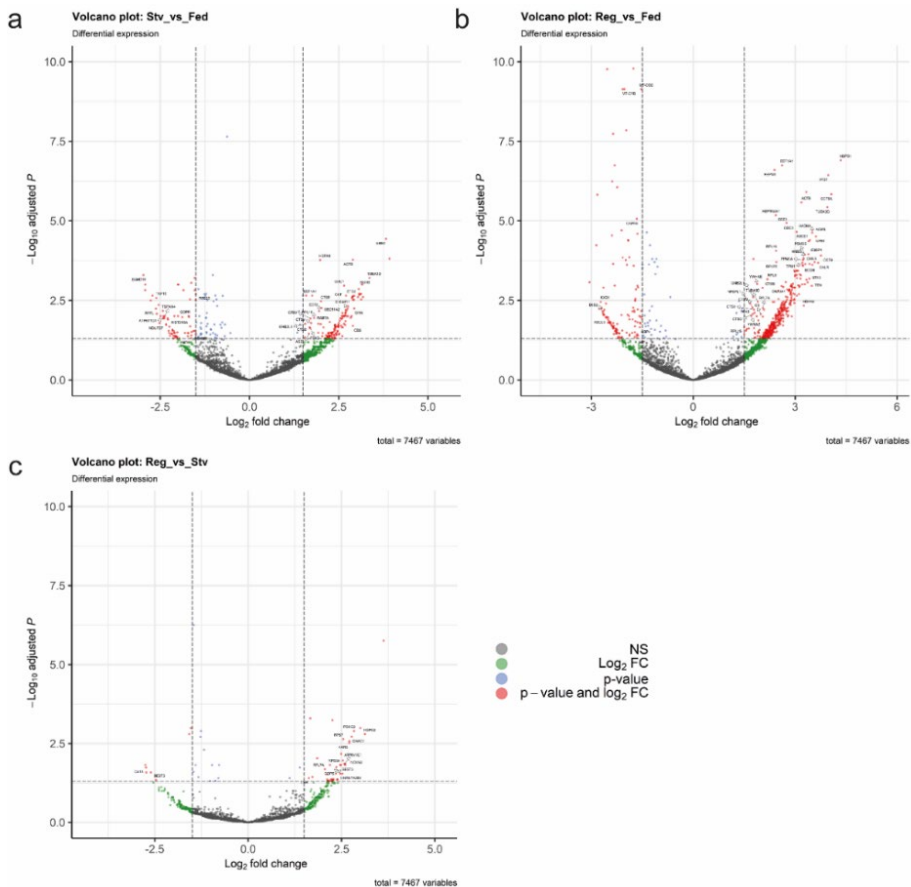


Figura 44. *Volcano plot* dels gens identificats al DGE.

a) *Volcano plot* de la comparació d'animals desdejunats contra alimentats. Representació de tots els clústers en la comparació de Stv_vs_Fed.

b) *Volcano plot* de la comparació d'animals regenerants contra alimentats. Representació de tots els clústers en la comparació de Reg_vs_Fed.

c) *Volcano plot* de la comparació d'animals regenerants contra desdejunats. Representació de tots els clústers en la comparació de Reg_vs_Stv.

En vermell els transcrits que passen el filratge per p-valor i FC, en blau els que només passen el filratge per p-valor, en verd els que només passen el filratge per FC i en gris els que no són significatius per cap de les condicions.

Entre els gens diferencialment expressats es comprova si hi ha presència de *blitzschnell* (*bls*) un gen específic de planàries que s'ha descrit com a imprescindible per a l'adaptació durant els canvis nutricionals (Eudald Pascual-Carreras *et al.*, 2020). Aquest gen es troba diferencialment expressat en la comparació entre animals desdejunats i alimentats (Apèndix 5).

A partir dels gens diferencialment expressats i anotats es va portar a terme una anàlisi d'enriquiment en ontologies gèniques (GO) per tal de poder identificar quins processos biològics, components cel·lulars o funcions moleculars es troben més representats en les diferents comparacions (Apèndix 6).

A la Figura 45 observem els GO enriquits en la comparació dels animals desdejunats contra els alimentats. En aquesta figura podem veure que hi ha un enriquiment dels GO relacionats amb la mitocondria. Podem observar que a nivell de component cel·lular hi ha una disminució de FC en mitocondria que podria estar relacionat amb els canvis metabòlics que apareixen a nivell de procés biològic, com el metabolisme de molècules petites o processos catabòlics dependents de ubiquitina. També podem observar que hi ha canvis en la regulació del estat oxidatiu de la cèl·lula; a nivell de procés biològic observem l'aparició de termes com desintoxicació d'oxidants o regulació positiva del procés metabòlic de les espècies reactives d'oxigen. A nivell de funció molecular trobem l'activitat de la glutatió peroxidasa, un dels enzims importants en l'eliminació d'espècies reactives de l'oxigen a la mitocondria. Entre els GO que destaquen a nivell de component cel·lular apareix el citoesquelet i el centrosoma que es poden associar a altres termes de procés cel·lular com la regulació del fus mitòtic o la funció dels microtúbuls i de la miosina V. Aquestes estructures cel·lulars podrien, per tant, estar relacionades amb el cicle cel·lular. A nivell de balanç cel·lular també es poden observar GO relacionats amb la regulació negativa de l'apoptosi per la via extrínseca. També cal destacar l'aparició de GO relacionats amb la síntesis de proteïnes.

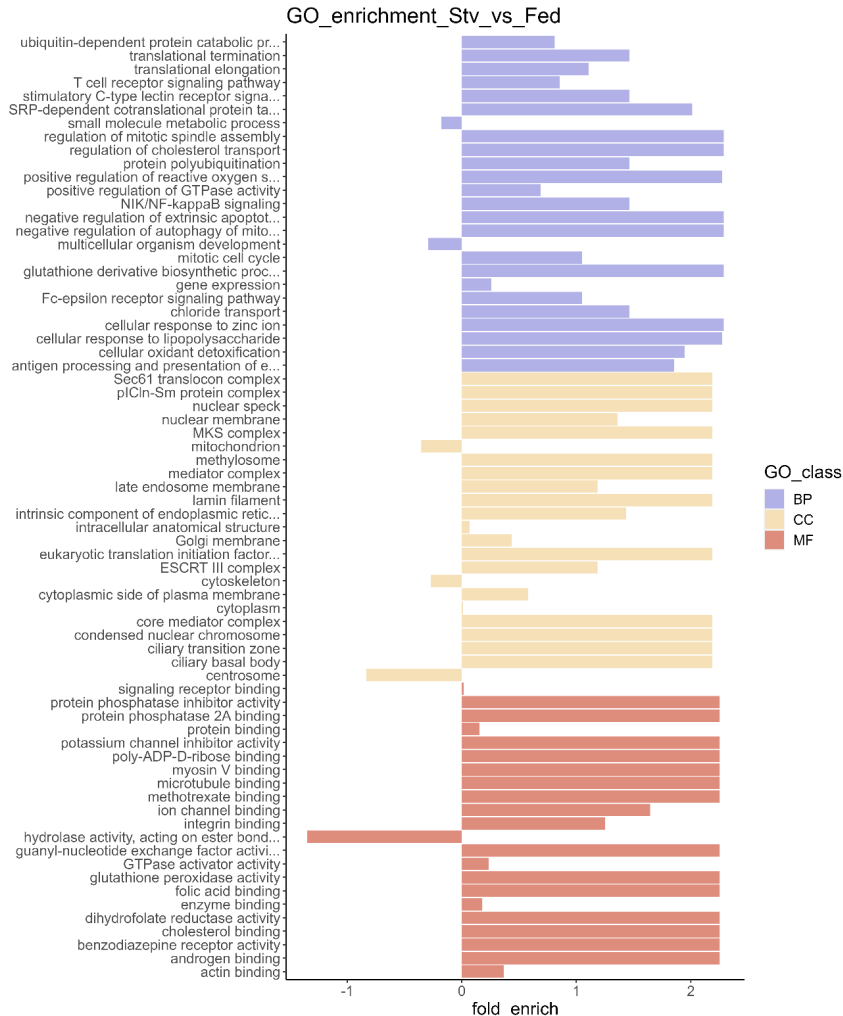


Figura 45. Termes de GO enriquits al comprar animals desdejunats contra els alimentats.

Resultats de les anàlisis d'enriquiment de GO. En blau els GO corresponents a la categoria de procés biològic (BP), en groc de component cel·lular (CC) i en vermell de funció molecular (MF).

La comparació de GO entre animals regenerants i alimentats (Figura 46) indica la importància de diferents processos relacionats amb la regulació de l'estat oxidatiu de la cèl·lula, el citoesquelet i la síntesis de proteïnes. Alguns dels GO observats en la comparació entre els animals desdejunats amb els alimentats torna aparèixer en aquesta comparació, entre animals regenerants i alimentats, com és el cas de la regulació del estat oxidatiu o del citoesquelet, indicant que són processos comuns en els animals alimentats. Tot i això apareixen en aquest cas alguns processos nous relacionats amb els lisosomes.

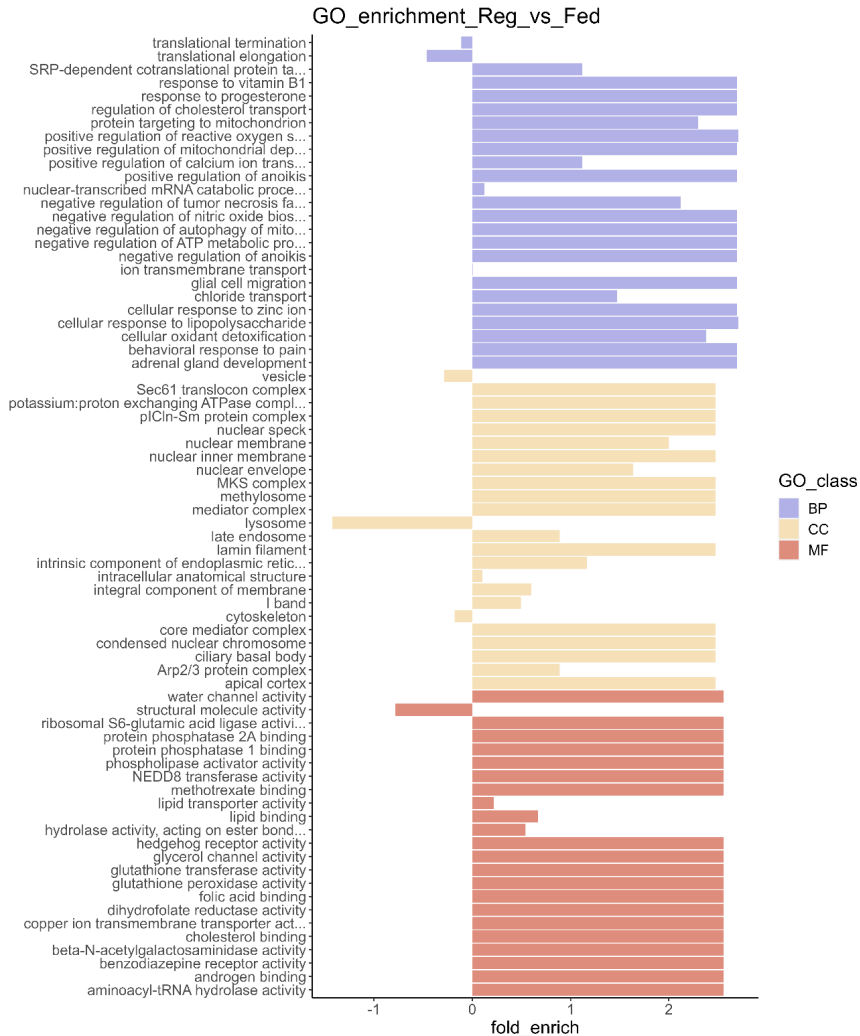


Figura 46. Termes de GO enriquets al comprar animals regenerants i alimentats.

Resultats de les anàlisis d'enriquiment de GO. En blau els GO corresponents a la categoria de procés biològic (BP), en groc de component cel·lular (CC) i en vermell de funció molecular (MF).

Quan ens fixem en la comparació entre els animals regenerants i desdijunats (Figura 47) es pot observar que apareixen elements que ja s'havien descrit en altres condicions, com els lisosomes, o GO relacionats amb la regulació de la mitosi. Es interessant destacar en aquesta comparació l'aparició de nous GO relacionats amb la membrana extracel·lular (MEC) i la regulació de membranes com, per exemple, receptors de contacte cèl·lula-cèl·lula, transport transmembrana o secreció de transmissors. També és interessant observar que apareixen GO relacionats amb la mitocondria, però a diferència de la comparació d'animals desdijunats contra els alimentats, en aquest cas la

importància recau en elements estructurals de l'òrganul, com la cadena transportadora d'electrons.

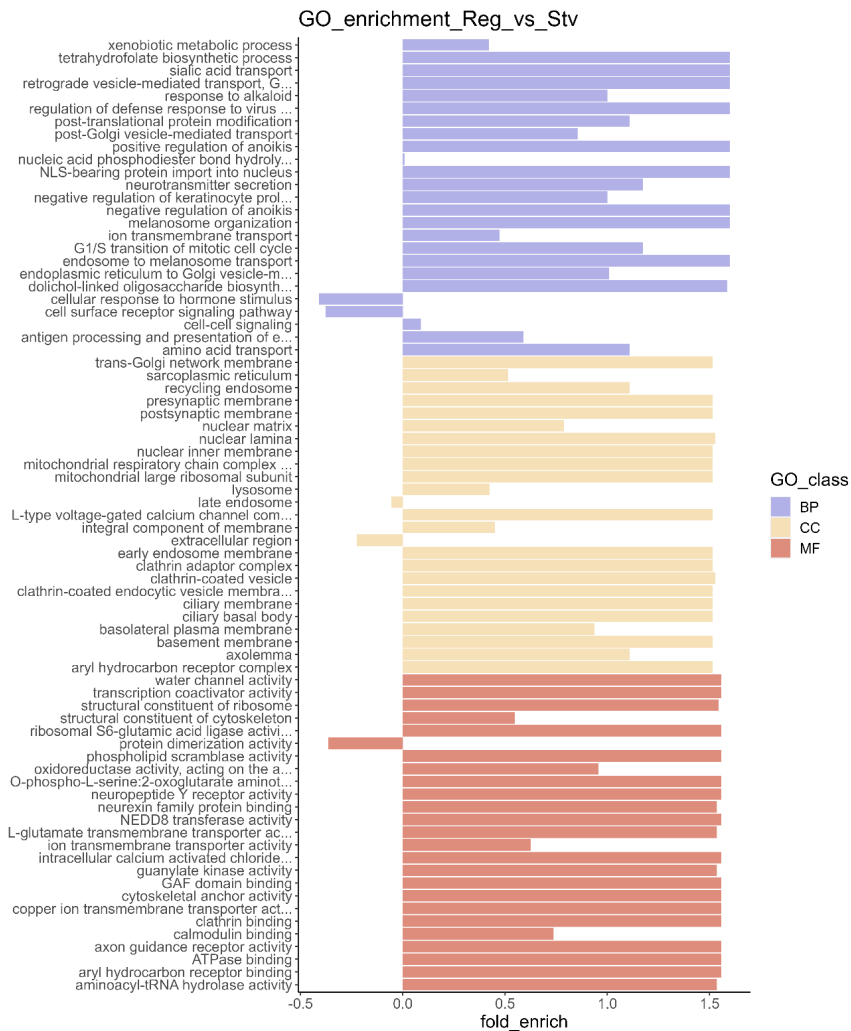


Figura 47. Termes de GO enriquits al comprar animals regenerants i desdejuntats.

Resultats de les anàlisis d'enriquiment de GO. En blau els GO corresponents a la categoria de procés biològic (BP), en groc de component cel·lular (CC) i en vermell de funció molecular (MF).

En aquest anàlisis s'han comparat dos a dos les diferents condicions experimentals, però és interessant poder determinar quin conjunt de gens són importants per a cadascun d'aquests processos fisiològics. Per tal de fer-ho s'han buscat els gens comuns entre les diferents comparacions. Els gens que corresponen a la intersecció entre dues condicions són els gens que són específics pel correcte desenvolupament d'aquesta condició. A la Figura 48

podem observar el nombre de gens comuns entre les diferents condicions i a l'Apèndix 7 trobem el llistat d'aquests gens anotats. Com era d'esperar no hi ha cap gen comú en les tres condicions però sí que es poden identificar gens característics de les interseccions entre dues condicions. Destaca que els gens diferencialment expressats específicament en animals alimentats és el més nombrosos (105) respecte als desdijunats (8) o els regenerants (17).

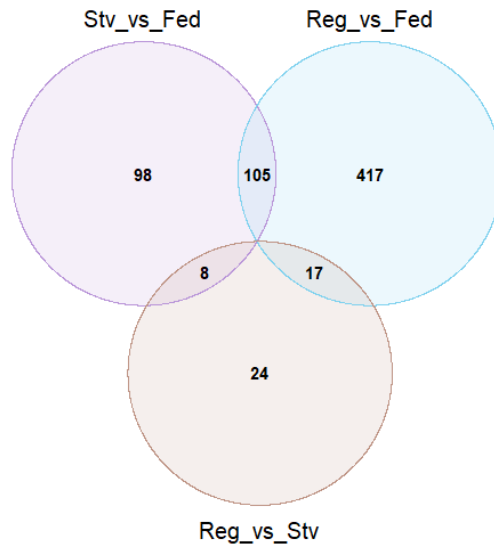


Figura 48. Relacions entre els gens diferencialment expressats.

Diagrama de Venn dels gens diferencialment expressats en les diferents condicions experimentals. Els nombres a l'interior de cada cercle indiquen els gens que són únics de cada condició, mentre que els gens en les zones de solapament indiquen els gens compartits en aquestes condicions.

A l'Apèndix 7 es llisten els diferents gens que pareixen com a intersecció a la Figura 48. En aquesta llista observem que en el cas dels gens específics per la condició de dejú hi ha pocs gens anotats. Destaca la presència de *chac1*, un enzim encarregat del clivatge del Glutatió. Aquest procés està relacionat amb l'inici de l'apoptosi. En la condició de regeneració tenim un major nombre de gens, on hi destaca la presència de la *ciclina-T2 (ccnt2)*, imprescindible per l'inici de la mitosi i gens relacionats amb la sumorilació com *sae1*.

La condició que té un major nombre de gens propis és la relacionada amb l'alimentació, indicant que l'alimentació provoca canvis gènics importants. Algunes de les categories que destaquen en Aquesta condició són els gens relacionats amb el procés de biosíntesis, transcripció i traducció, resposta al plegament de proteïnes, citoesquelet i regulació de la MEC. En els processos biosintètics trobem diversos gens relacionats amb la síntesis de totes les molècules metabòliques bàsiques com lípids (*agps, ddhd2, lpcat1, ets2, elov13*),

glúcids (*gbe1, pck2*) o proteïnes (*bhmt, mat2a, qpct, aldh18a1, odc1*). Respecte els processos de transcripció i traducció destaca la presència de gens relacionats amb la maquinària de transcripció i traducció com helicases (*ddx1, ddx21*), ribosomes tant citoplasmàtics com mitocondrials (*rpl18, mrpl24*), a més d'altres elements activadors de la transcripció i traducció (*eef2, hnf4g, farsb, eef1a1*). Respecta a la resposta al plegament de proteïnes veiem l'activació de diverses xaperones i coxaperones d'acció al citoplasma (*dnaja1, sgtb, hspa8, phb2, p4hb*) i a la mitocondria (*phb2, hspd1*). El citoesquelet és un element cabdal de la cèl·lula que també sembla veure's àmpliament afectat després de la ingesta, ja que observem canvis en gens encarregats de la regulació de l'actina i la tubulina (*tuba3d, actb, tuba1a, cnn2, cnn3, ttn, tuba1a*), a més de la regulació de l'activitat muscular (*cnn2, cnn3, ttn*). Finalment, trobem canvis en gens relacionats en la remodelació de la MEC (*cela1, ctsb*) i de l'adhesió cel·lular (*postn, sec61a2*). Podem observar que hi ha una gran quantitat de gens relacionats amb la ingesta d'aliment i que afecten a diferents nivells cel·lulars.

L'anàlisi d'expressió diferencial utilitzant dades de Nanopore permet identificar gens diferencialment expressats en diferents condicions experimentals. En aquesta anàlisi hem pogut identificar conjunts de gens necessaris per l'adaptació de les planàries a diverses condicions fisiològiques com la falta de nutrients, l'alimentació o la regeneració.

Discussió

1. Gens diana de la via Hippo

L'estudi dels gens diana d'una via pot donar molta informació sobre el mecanisme d'acció d'aquesta. Per tal de poder analitzar la funció de la via Hippo es va decidir comparar els gens desregulats després de la inhibició de dos elements clau de la via: *hpo* i *yki*. En el cas de *hpo* es disposava d'un transcriptoma a una i a tres setmanes d'inhibició. Després d'una sola setmana els animals *hpo* RNAi no presentaven fenotip visible tot i que s'ha demostrat que ja hi ha canvis en el balanç cel·lular i la coexpressió errònia de marcadors cel·lulars (de Sousa *et al.*, 2018). En el cas del factor de transcripció *yki* només tenim informació dels gens inhibits després d'una setmana ja que els animals no sobreviuen més temps de tractament. L'alta mortalitat dels animals *yki* RNAi ve donada a causa de l'aparició d'edemes (Lin i Pearson, 2014).

Aquesta aproximació ens va donar un conjunt de gens molt petit quan vam comparar els desregulats en la primera ronda, però que augmentava al comparar els de la tercera ronda d'inhibició. Els resultats a temps primerencs, tot i ser reduïts, són els que poden resultar més interessants per entendre el funcionament la via. Són gens que es veuen modificats de forma molt ràpida quan hi ha canvis en el funcionament de la via indicant que poden ser els gens que guien els esdeveniments posteriors. En aquest estudi no es pot afirmar que siguin gens directament regulats per Yki, però si que podem dir que la seva regulació és ràpida. Les anàlisis d'ontologia gènica indiquen una relació amb la mitocondria, especialment en el metabolisme, indicant que la regulació mitocondrial podria tenir una relació amb la via Hippo. En altres organismes s'ha demostrat que la via Hippo regula el metabolisme de la glutamina per tal d'activar la biosíntesis de nucleòtids per permetre l'augment de proliferació (Cox *et al.*, 2016) així com la gluconeogènesis (Hu *et al.*, 2017), la síntesis de colesterol (Aylon i Oren, 2016) i la de lípids (Geng *et al.*, 2016).

La comparació dels transcriptomes de *hpo* i *yki* permeten obtenir un conjunt de gens candidats. Per tal de realitzar anàlisis funcionals i validar si aquests gens poden explicar algunes de les funcions de la via, es van seleccionar tres gens: *tdh*, *cecr5* i *bck*. Els dos primers es troben desregulats a primera ronda. *bck* no es troba desregulat a la primera setmana d'inhibició, però si que ho fa a

la tercera. Els tres gens tenen funcions descrites en la mitocondria. Els tres gens seleccionats es troben regulats a la baixa després de la inhibició de *hpo* i sobreexpressats després de la inhibició de *yki*; per tant esperem que després de la inhibició d'aquests gens el fenotip resultant sigui similar a l'observat després de la inhibició de *hpo*.

Després de la inhibició dels candidats, el fenotip observat tant *in vivo* com a nivell de sistema nerviós coincideix amb el descrit en *hpo* RNAi. La pèrdua de les estructures diferenciades, com el cervell o el cordó nerviós, i l'aparició de zones despigmentades ha estat relacionada en els animals *hpo* RNAi amb la desdiferenciació cel·lular (de Sousa *et al.*, 2018). Tot i que en aquests experiments concrets no s'ha pogut establir el nexa entre aquestes zones i la pèrdua de la identitat cel·lular, la similitud del fenotip amb *hpo* RNAi podria indicar que ens trobem en una situació similar.

En relació al balanç cel·lular es pot observar que hi ha dos escenaris diferents. En el cas dels animals *bck* RNAi i *cecr5* RNAi podem observar que hi ha un increment en les cèl·lules en fase M (H_3P^+) i una disminució en l'apoptosi. Aquest escenari és similar al que s'observa després de la inhibició de *hpo*. S'ha demostrat que l'augment de cèl·lules H_3P^+ en *hpo* no està associat a un increment de la proliferació sinó que és a causa de l'aturada en fase M del cicle cel·lular (de Sousa *et al.*, 2018). En els dos gens candidats podria estar ocorrent el mateix fenomen ja que l'augment de cèl·lules H_3P^+ i la disminució de l'apoptosi no donen lloc a animals més grans.

En el cas de *cecr5* no es coneix amb exactitud la seva funció (Footz *et al.*, 2001) per tant es difícil poder discutir el paper concret d'aquest gen en el fenotip dels animals *hpo* RNAi més enllà de la seva implicació en la mitocondria. Per altre banda, s'ha establert que la deficiència de *bck* provoca greus afeccions en humans. La inhibició de la funció de BCK provoca l'acumulació d'aminoàcids ramificats que no poden ser metabolitzats donant lloc a desajustos metabòlics, defectes neurològics i, en cas de no ser tractat, la mort en les primeres setmanes de vida (Strauss i Morton, 2003). En contraposició, a *C. elegans* l'acumulació d'aminoàcids ramificats ha estat associat a mutants amb alta longevitat (Falk *et al.*, 2008; Fuchs *et al.*, 2010). Estudis de conservació de rutes metabòliques en platihelminths han demostrat que la ruta de degradació d'aminoàcids ramificats només es troba conservada en triclàdides, concretament en *S. mediterranea* (Swapna *et al.*, 2018). Donat el fenotip tan sever demostrat després de la inhibició de *bck*, la pèrdua d'aquest gen podria estar relacionada amb la pèrdua de l'equilibri metabòlic de la planària provocant els defectes observats.

En el cas de *tdh* no hi ha canvis a nivell de proliferació o mort després de la seva inhibició. Això indica que tot i que aquest gen podria estar tenint un efecte en la desdiferenciació no hi ha acumulacions de cèl·lules degudes a un desajust de la mort. *tdh* és un gen amb una funció molt concreta, el catabolisme de l'aminoàcid L-treonina. Per tant la inhibició del gen podria donar lloc a

l'acumulació d'aquest aminoàcid que podria interferir en el metabolisme general.

Tant en el cas de *bck* com en el cas de *tdh* ambdós són gens que podrien estar alterant el metabolisme quan es troben inhibits. En altres organismes s'ha descrit que el metabolisme és un regulador de l'estat diferenciat de la cèl·lula; canvis en les condicions metabòliques poden provocar la desdiferenciació cel·lular (Ito i Ito, 2016). Altres estudis també han establert la via Hippo com un transductor de senyals extracel·lulars que pot afectar al metabolisme cel·lular (Romani *et al.*, 2021).

Gràcies a les anàlisis transcriptòmiques d'alt rendiment hem pogut identificar que la regulació de les reaccions metabòliques que ocorren a la mitocòndria podrien ser diana de la via Hippo. La caracterització funcional de tres d'aquests gens diana ens ha permès validar que efectivament hi ha un nexa entre la mitocòndria i el fenotip observat després de la inhibició de *hpo*.

2. El paper de les mitocòndries en la via Hippo

L'estructura de la mitocòndria és un element regulador de la seva funció i té implicacions en la homeòstasi cel·lular (Westermann, 2010). Per tal de poder entendre el rol de les mitocòndries en el fenotip de *hpo* RNAi es va decidir estudiar l'estructura mitocondrial utilitzant microscòpia electrònica. La utilització d'aquestes tècniques permet estudiar en detall la morfologia de la mitocòndria però presenta una limitació essencial; estan orientades a zones concretes de l'animal. Anteriorment s'havia descrit que els animals *hpo* RNAi presentaven defectes en diferents òrgans (de Sousa *et al.*, 2018). Aquestes deficiències poden ser observades en microscòpia electrònica i a més poden suposar una dificultat afegida a l'hora d'identificar òrgans o tipus cel·lulars concrets en animals *hpo* RNAi. Per aquest motiu aquest estudi es va centrar en la zona subepidèrmica ja que és una zona de l'animal fàcil d'identificar. Concretament aquest estudi està centrat en l'anàlisi de les mitocòndries associades a la musculatura circular. Els músculs són òrgans amb una gran demanda energètica i per tant són òrgans rics en mitocòndries.

La unió dels resultats de TEM i SBFSEM permeten tenir una clara visió de l'estructura de la mitocòndria. La TEM permet l'observació amb més precisió de la mitocòndria podent observar fàcilment la doble membrana i les crestes. Aquest nivell de detall permet no només estudiar els canvis morfològics externs sinó també les possibles perturbacions de la membrana interna. La SBFSEM perd el nivell de detall observat amb les imatges de TEM però ens permet afegir una nova dimensió. Al tenir imatges consecutives aquestes es poden superposar i reconstruir imatges en tres dimensions. A l'afegir volum a la mitocòndria adquirim una nova capa d'informació. En conclusió, les dues tècniques tenen un conjunt d'avantatges i limitacions però la combinació de la informació aportada per aquestes dues aproximacions ens permet tenir una visió clara de l'estructura mitocondrial.

La determinació de la mida de les mitocòndries, tant per TEM com per SBFSEM, ens indica que les mitocòndries són més grans en els animals *hpo* RNAi. Aquest resultat podria donar lloc a dos escenaris. En primer lloc podria ser a causa de que les mitocòndries estiguessin inflades. Aquest fenomen va ser descrit per primer cop a final dels anys 70 i és a causa d'un augment de la permeabilitat de la MIM desencadenada per calci (Hunter, Haworth i Southard, 1976). La conseqüència principal d'aquesta dilatació de la mitocòndria és la desregulació de les funcions bioenergètiques i finalment la ruptura de les membranes provocant l'inici del procés d'apoptosi (Halestrap *et al.*, 1998; Petronilli *et al.*, 2001; Rasola i Bernardi, 2011). La segona possible explicació seria l'augment de la fusió mitocondrial. En aquest cas les mitocòndries canviarien la seva estructura i es fusionarien donant lloc a mitocòndries més grans però amb una estructura més filamentosa. Els posteriors estudis de l'estructura de la mitocòndria confirmen que ens trobem en la segona hipòtesis; després de la inhibició de *hpo* les mitocòndries es troben més fusionades.

Una de les conseqüències més estudiades dels canvis en la dinàmica mitocondrial és la regulació de l'apoptosi. Estudis anteriors de *hpo* en planàries van assenyalar que la inhibició d'aquest gen reduïa l'apoptosi (de Sousa *et al.*, 2018). En el cas de la fissió mitocondrial s'ha demostrat que un augment de la proporció de mitocòndries fusionades està relacionat amb la inhibició de l'apoptosi (Frank *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Sugioka, Shimizu i Tsujimoto, 2004). Tenint en compte aquestes dues observacions es posa de manifest que la inhibició de l'apoptosi observada en planàries *hpo* RNAi podria estar relacionada amb l'augment de la fusió mitocondrial que s'ha apuntat en aquest estudi. Els estudis de l'estructura mitocondrial estan realitzats a tres setmanes després de la inhibició de *hpo* però la disminució de l'apoptosi s'ha detectat en planàries amb només dos setmanes de inhibició (de Sousa *et al.*, 2018). Seria interessant poder determinar si en aquests estadis més primerencs ja hi ha una major fissió de les mitocòndries i si hi ha variació en altres zones de l'animal.

En planàries també es va concloure que *hpo* exercia un paper fonamental en el control del cicle cel·lular. El cicle cel·lular té diferents mecanismes de control per tal d'evitar desajusts en aquest procés i l'estructura de la mitocòndria n'és un d'ells. Concretament en la transició G2/M, s'ha demostrat que l'elongació forçada de les mitocòndries provoca un parada del cicle cel·lular en aquesta fase (Lee *et al.*, 2014) o bé l'arrest en fase M a causa de deficiències en el procés de mitosi (Peña-Blanco *et al.*, 2020). Aquests estudis de la relació de la dinàmica mitocondrial amb el cicle cel·lular es poden relacionar amb els resultats en planàries on s'ha observat que tot i que no hi ha un augment en el nombre de cèl·lules que superen la fase S si que hi ha un major nombre de cèl·lules en fase M, indicant errors en el progrés d'aquesta fase (de Sousa *et al.*, 2018). Aquest augment de cèl·lules en fase M es detecta després de tres setmanes d'inhibició que és el mateix moment en el que estudiem l'estructura de les mitocòndries.

En aquest estudi també hem pogut comprovar que aquestes mitocòndries més fusionades tenen una major capacitat bioenergètica. Aquests resultats coincideixen amb estudis fets en altres animals on s'ha relacionat l'elongació mitocondrial amb un augment de la capacitat oxidativa (Bo, Zhang i Ji, 2010). Aquest augment de capacitat metabòlica s'ha inferit a partir de la densitat de crestes mitocondrials. Aquesta assumpció s'ha fet a partir d'estudis que relacionen la morfologia i abundància de la crestes amb l'eficiència de la cadena respiratòria (Cogliati *et al.*, 2013). El que no es té en compte en aquest estudi és si aquests enzims respiratoris són funcionals. Per tal de poder comprovar la veritable capacitat respiratòria d'aquestes mitocòndries es podria fer utilitzant SeaHorse i inhibir seqüencialment amb diferents drogues els diferents elements de la cadena respiratòria. Tot i que s'han realitzat estudis amb SeaHorse en planàries, aquests no han tingut èxit en la inhibició del elements de la cadena respiratòria (Osuma *et al.*, 2018). A més a més durant el transcurs d'aquesta tesi s'han intentat replicar aquests resultats però no s'han aconseguit els resultats esperats.

En relació al metabolisme també s'ha pogut demostrar que després de la inhibició de *hpo* hi ha un augment dels nivells proteics de Citrat sintasa. La Citrat sintasa és l'enzim que transforma l'Acetil-CoA donant lloc al inici del cicle de Krebs. Aquest cicle és l'encarregat de produir energia a través de diferents substrats metabòlics. Els productes principals del cicle són NADH i FADH que seran posteriorment utilitzats per la cadena transportadora d'electrons per formar ATP. L'augment del flux del cicle de Krebs, inferida per l'augment de CS, juntament amb la major capacitat de fosforilació oxidativa, mesurada per la densitat de crestes, indica que els animals *hpo* RNAi produeixen una major quantitat d'energia.

L'increment d'aquesta capacitat bioenergètica podria estar relacionada amb un canvi metabòlic. Els canvis en el metabolisme poden donar lloc a canvis en el destí cel·lular (Ghosh-Choudhary, Liu i Finkel, 2020) o fins i tot ser determinants en l'aparició del cèl·lules canceroses (Sun *et al.*, 2019). En el cas de *hpo* RNAi si és produït aquest canvi metabòlic podria explicar perquè les planàries coexpressen marcadors de diferents estats diferenciats. Per tal de poder demostrar aquest canvi s'hauria de comprovar l'activitat enzimàtica de diferents enzims claus i els productes metabòlics produïts quan *hpo* ha estat atenuat.

Tot i demostrar canvis en la fusió mitocondrial després de la inhibició de *hpo* no podem observar canvis en els nivells gènics dels elements reguladors de la dinàmica mitocondrial (*opa1*, *drp1* i *fis1*) en les dades de transcriptòmica (de Sousa *et al.*, 2018). Aquest fet podria ser causat perquè els processos de fusió i fissió no es regulen directament per la transcripció dels elements implicats sinó que es fa mitjançant modificacions post-transcripcionals. S'ha demostrat que el conjunt de proteïnes implicades en la dinàmica mitocondrial poden ser degradades per diferents senyals, però tot i això la seva regulació encara és un tema d'estudi (Yu *et al.*, 2020).

La relació entre la via Hippo i les mitocòndries no està molt clara en altres models, però tot i això hi ha alguns articles on s'ha pogut establir aquesta connexió. A *D. melanogaster* i en cultius de cèl·lules de mamífers s'ha pogut establir que la inactivació de la via Hippo provoca un increment de la fusió mitocondrial (Nagaraj *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2018). Aquests resultats concorden amb els resultats obtinguts en planàries. A més a més, estudis posteriors han pogut determinar que aquesta relació és bidireccional (Deng *et al.*, 2016). Tot i ser un tema molt interessant encara no es té molta informació de com es produeix aquesta dependència entre la via Hippo i les mitocòndries.

Aquest treball permet afegir coneixement, en un nou organisme model, sobre els efectes de la via Hippo en la mitocòndria. S'ha pogut demostrar que les mitocòndries experimenten canvis en la seva estructura després de la inhibició de *hpo* i que aquests canvis podrien ser els responsables de la regulació de la mort cel·lular, el cicle cel·lular i fins i tot la determinació del destí cel·lular.

3. Limitacions tècniques de l'estudi de les mitocondries en planàries

Les planàries són un gran organisme model per a estudis de regeneració i creixement però presenten certes limitacions. La principal limitació és la impossibilitat de realitzar transgènics. Tot i que els estudis funcionals per RNAi són molt útils per a l'estudi de la funció de gens concrets la falta de transgènics dificulta fer estudis de guany de funció o obtenir expressió de proteïnes exògenes com GFP o altres fluoròfors.

L'estudi de l'organització mitocondrial ha estat un dels punts principals en aquest treball. Haver disposat d'un transgènic amb el qual observar la dinàmica mitocondrial hagués proporcionat major informació sobre el seu funcionament. Tots els estudis d'estructura mitocondrial d'aquesta tesis s'han hagut de realitzar utilitzant imatges de microscòpia electrònica que tenen les seves evidents limitacions. La principal limitació és la pèrdua de context en un fenotip tan sever com és el que es produeix després de la inhibició de *hpo*. Ens hem hagut de centrar en una estructura fàcilment identificable en els RNAi com ha estat la capa subepidèrmica fet que ens ha fet perdre informació de què passa en altres estructures de la planària.

A més dels transgènics, l'estudi de la xarxa mitocondrial també es pot realitzar amb diferents fluoròfors que depenen del potencial de membrana. Aquestes molècules tenen una gran permeabilitat, permetent la seva utilització en cultius cel·lulars però també en teixits. L'exemple més conegut és el MitoTracker (ThermoFisher). Aquest colorant s'adhereix a les membranes mitocondrials vives permetent l'observació de les mitocondries funcionals. Per a aquest treball s'ha intentat aplicar aquest marcatge en animals vius i es va aconseguir observar una xarxa tubular en les zones més externes de la planària, però el marcatge no penetrava a capes més internes de l'animal (Figura 49). A més, a l'haver de treballar amb planàries sense fixar l'observació del marcatge és complicava a causa del moviment de l'animal. Recentment s'ha publicat un treball en el que s'utilitza el MitoTracker en FACS per a determinar l'estat mitocondrial (Mohamed Haroon *et al.*, 2021). Aquesta tècnica podria ser interessant per poder observar diferències entre cèl·lules que expressen diferents marcadors de diferenciació després de la inhibició de *hpo*. Hi ha altres colorants al mercat disponibles que poden ser útils per marcar l'estructura mitocondrial. El marcador IraZolve-Mito és capaç de mantenir el marcatge de les mitocondries viables després de fixació amb diferents tipus cel·lulars i teixits (Sorvina *et al.*, 2018). Tot i ser un marcatge prometedor en planàries no es va poder observar senyal.

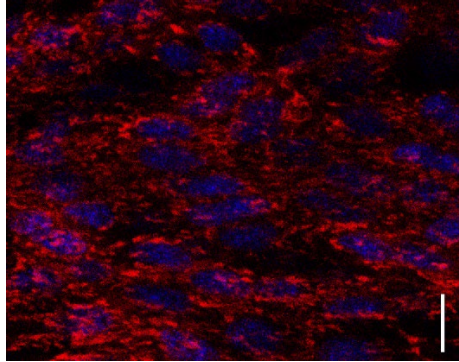


Figura 49. Marcatge de mitocondries per MitoTracker en planàries.

Marcatge de la epidermis de la planària amb MitoTracker i DAPI. La imatge ha estat obtinguda en planàries no fixades. Barra d'error 10 µm.

En aquest treball s'infereix la funció mitocondrial a partir de la seva morfologia. Per tal de poder tenir una idea més detallada del funcionament general de la mitocondria seria interessant poder realitzar estudis funcionals de la mitocondria. L'estudi del consum d'oxigen cel·lular és un indicador dels substrats utilitzats per la planària i de l'eficiència bioenergètica. Hi ha nombroses tècniques per a mesurar aquest paràmetre però la més sensible i completa és l'anàlisi per SeaHorse. Aquest aparell permet determinar el consum d'oxigen cel·lular i l'acidificació del medi en presència de diferents drogues. Aquesta tècnica, per tant podria inferir el funcionament de la cadena respiratòria i determinar si les cèl·lules utilitzen glicòlisis o fosforilació oxidativa com a font d'energia (Divakaruni *et al.*, 2014). L'ús de SeaHorse en planàries ha estat aplicat amb anterioritat i s'han pogut caracteritzar canvis durant la regeneració en la glicòlisis (Osuma *et al.*, 2018). En aquest experiment s'utilitzaven animals sense cap pertorbació gènica i de mida controlada. En els nostres experiments els animals *hpo* han passat per tres rondes d'inhibició donant lloc a un fenotip tan sever que no es veu viable la seva supervivència en aquest experiment. A més, les nostres experiències utilitzant plaques especialitzades en la quantificació del consum d'oxigen ens van indicar que les lectures es saturaven als pocs minuts de la quantificació. La utilització de SeaHorse en cultius de cèl·lules o en petits extractes de teixit és molt útil però per l'ús d'animals sencers amb una alta capacitat metabòlica es necessiten adaptacions de la tecnologia actualment disponible.

Les planàries són un model amb molt potencial a l'hora de poder estudiar el seu metabolisme i la seva relació amb la plasticitat cel·lular. El major desafiament en l'actualitat és posar a punt tècniques per tal d'inferir el funcionament dels diferents mecanismes metabòlics.

4. Estudi de la funció de *foxo* en planàries

La caracterització dels gens Fox en planàries ens va permetre descobrir nous gens importants en la fisiologia de la planària (Pascual-Carreras *et al.*, 2021) (Article 1). En aquest estudi vam poder demostrar que la família FoxO a planàries compta amb un sol gen, coincidint amb altres invertebrats com *C. elegans* o *D. melanogaster*.

En diversos organismes s'ha relacionat l'activació de FoxO amb la disponibilitat de nutrients; l'activació del receptor d'insulina permet la inhibició de l'activitat de FoxO a través de la via PI3K i AKT (Figura 13a i Figura 25a) (Alessi *et al.*, 1997; Matsuzaki *et al.*, 2003; Sarbassov *et al.*, 2005). En aquest treball s'ha demostrat que els nivells de mRNA de *foxo* es troben disminuïts en animals alimentats, indicant que aquesta relació entre l'estat nutricional i la regulació d'aquest factor de transcripció està conservada en planàries. A més a més, altres estudis en planàries, han estudiat el funcionament d'alguns elements de la via PI3K/AKT. Aquests estudis han demostrat que l'activació constitutiva de PIP₃, a partir de la inhibició de *Smed-PTEN-1* i *Smed-PTEN-2*, augmenta els nivells de *akt*. Aquests resultats indiquen que en planàries l'activació de AKT a través de la via PI3K està conservada (Oviedo *et al.*, 2008). Recentment, en el nostre laboratori hem demostrat que a la seqüència de *foxo* es conserven els dominis de fosforilació de AKT (Pascual-Carreras *et al.*, 2021) (Article 1). A més, la regulació d'alguns aspectes relacionats amb l'homeòstasi cel·lular, com és l'apoptosi, és inversa en el cas d'AKT i FoxO; després de la inhibició d'*akt* hi ha un augment de la mort cel·lular (Peiris *et al.*, 2016) però en animals *foxo* RNAi la mort cel·lular disminueix, com s'ha evidenciat en aquest treball. Tot això indica que en planàries es troba conservat el mecanisme de regulació de FoxO a través de la via PIP₃/AKT responent a estímuls nutricionals.

L'estudi en animals intactes ha demostrat el paper que juga *foxo* en la regulació de la mort cel·lular; la inhibició de *foxo* no afecta a la mida de l'animal ni la seva proliferació però sí que disminueix la mort després de dues rondes de inhibició. El resultat d'aquest defecte en el balanç cel·lular són clarament visibles en l'epidermis on hi ha una pèrdua de l'estructura de monocapa i s'acumulen les cèl·lules. El més interessant d'aquestes acumulacions és que hi trobem una acumulació en l'expressió de marcadors que no correspondrien a una cèl·lula diferenciada; hi ha expressió de PIWI, un marcador de neoblasts, present en cèl·lules del marge de l'animal. Aquestes resultats suggereixen que hi ha una pèrdua de la identitat cel·lular. L'observació d'altres estructures com el sistema nerviós o la faringe, en les que veiem pèrdua de cèl·lules diferenciades, suggereixen que les planàries *foxo* RNAi presenten deficiències en el manteniment de la integritat de les seves estructures, potser per la incapacitat de mantenir l'estat diferenciatiu, tal com hem descrit que passa en els animals *hpo* RNAi (de Sousa *et al.*, 2018).

Les espècies reactives de l'oxigen són molècules que, a concentracions fisiològiques, actuen com a senyalitzadors cel·lulars, però la seva acumulació

és deletèria per la cèl·lula. L'acumulació espècies reactives de l'oxigen dona lloc a l'oxidació de diferents elements cel·lulars que han estat relacionats amb malalties neurodegeneratives (Liu *et al.*, 2017), arterioesclerosi (Kattoor *et al.*, 2017) o càncer (Lennicke *et al.*, 2015). En aquest treball hem pogut observar que en animals *foxo* RNAi hi ha una disminució d'alguns dels gens encarregats del manteniment del balanç redox. Després de la inhibició de *foxo* durant dues setmanes podem observar que disminueixen els nivells de RNA de *gpx* i *sod2*, els dos gens on s'ha descrit un motiu d'unió de FoxO. Aquests dos enzims, juntament amb la catalasa són els encarregats de l'eliminació de ROS a la mitocòndria, el major productor de ROS de la cèl·lula. Aquests resultats ens indiquen que FoxO juga un paper important en la regulació de la desintoxicació redox. Tot i aquesta disminució no hem pogut detectar un augment de ROS en animals *foxo* RNAi utilitzant H₂DCFDA. Aquest protocol es va posar a punt per a la realització d'aquest treball i, tot i donar molts bons resultats en animals control, sembla mancar sensibilitat per detectar canvis més subtils en els RNAi de *foxo*. El més probable és que degut a la regulació a la baixa dels gens encarregats d'eliminar ROS, hi hagi un increment en algun moment d'aquestes molècules però les tècniques utilitzades en aquest treball no permeten detectar-ho.

En l'estudi de la inhibició de *foxo* en animals regenerants observem que hi ha defectes en la regeneració, però aquest canvis no estan associats a canvis en la proliferació. En diferents organismes, incloent planàries, s'ha demostrat que les ROS són un element senyalitzador per permetre la correcte regeneració (Gauron *et al.*, 2013; Love *et al.*, 2013; Pirotte *et al.*, 2015; Santabàrbara-Ruiz *et al.*, 2015). Concretament en planàries s'han descrit defectes en el sistema nerviós quan hi ha inhibició d'aquestes espècies reactives de l'oxigen, similars a les observades en *foxo* RNAi (Pirotte *et al.*, 2015). Sabent que FoxO és un factor de transcripció capaç d'unir-se a les regions reguladores encarregades d'eliminar ROS es podria suposar que els defectes en la regeneració observats podrien ser induïts per mancances en la senyalització de ROS. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi seria necessari determinar si hi ha un increment de ROS en diferents punts de regeneració.

En relació a la mort cel·lular, podem veure que després de dues setmanes de inhibició hi ha una disminució de la mort, però a una sola ronda la mort en *foxo* RNAi és major que en controls. Aquests resultats podrien estar indicant que en els primers estadis d'inhibició de *foxo* encara no hi ha implicació dels gens encarregats de regular la mort cel·lular. L'origen d'aquest augment de mort podria estar relacionat amb un pic de ROS. En els primers dies després de la inhibició de *foxo* hi podria haver un augment de ROS a causa de la inhibició dels gens encarregats de la seva eliminació que provocarien un increment de mort cel·lular local. Seguidament aquestes ROS podrien ser atenuades, seguit de l'activació diferents gens anti-apoptòtics o la inhibició de gens pro-apoptòtics, que donarien lloc a la inactivació de la mort cel·lular (Figura 50). Per tal de poder demostrar aquesta hipòtesi s'hauria de determinar els nivells de

ROS amb més precisió i determinar si el pic apoptòtic observat a primera setmana està localment relacionat amb ROS.

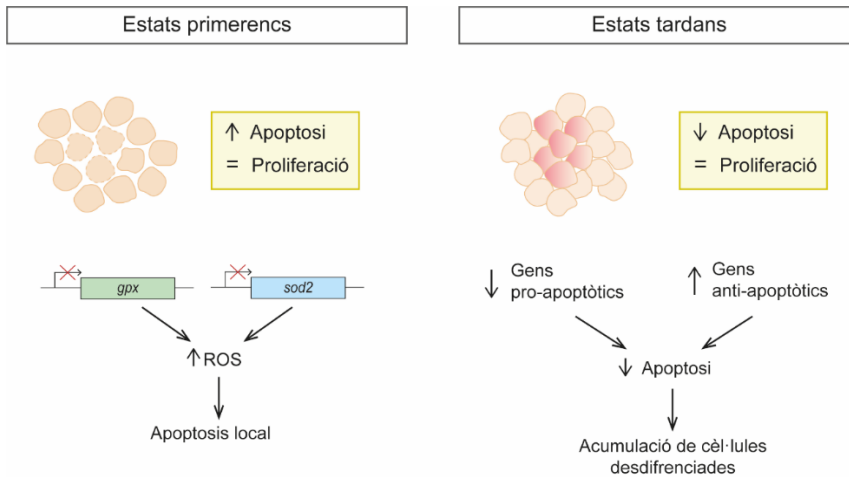


Figura 50. Evolució de la mort cel·lular en animals *foxo* RNAi.

En els estats primerencs, s'ha observat que hi ha un augment de l'apoptosi sense increment de la proliferació. Aquest fenomen podria ser a causa de que al inhibir FoxO no hi ha activació dels gens encarregats de l'eliminació de ROS *gpx* i *sod2*. Això provoca un augment de ROS que acabarà desencarant en un augment local de l'apoptosi.

En estats tardans, es manté la proliferació però disminueix l'apoptosi. Aquestes observacions experimentals es podrien explicar per la inhibició dels gens anti-apoptòtics i/o l'activació dels gens pro-apoptòtics per part de FoxO. Tot junt portaria al increment d'apoptosi observat. La disminució de la mort cel·lular seria el desencadenant de l'acumulació de cèl·lules observada en animals *foxo* RNAi.

5. Relació entre *foxo* i la via Hippo

En aquest treball hem pogut observar que quan hi ha inhibició de *foxo* també hi ha una disminució de l'expressió de *hpo*. A més a més, hem comprovat, utilitzant les dades disponibles de ATAC-seq, que en les regions reguladores del gen de *hpo* hi ha motius d'unió de FoxO. Aquests resultats indiquen que FoxO podria actuar com a regulador directe de *hpo*. La unió de FoxO a les regions reguladores de *hpo* ha estat descrita en altres animals on destaca la seva importància en la regulació de l'homeòstasi (Sun *et al.*, 2018; Birnbaum *et al.*, 2019). Si comparem el fenotip dels animals després de la inhibició de *hpo* i *foxo* podem trobar similituds; en ambdós casos hi ha clars defectes que el manteniment de les estructures diferenciades i aparició de sobrecreixements. A nivell molecular podem observar que en els dos casos hi ha aparició de cèl·lules que expressen marcadors de destí cel·lular aberrants. En la comparació d'aquests dos fenotips també és molt interessant entendre els canvis en el control de la proliferació i la mort cel·lular. En ambdós casos hi ha una clara inhibició de l'apoptosi després d'unes setmanes de inhibició. El que no s'ha detectat en animals *hpo* RNAi és un augment de la mort cel·lular en els primers estadis d'inhibició com passa en els animals *foxo* RNAi (de Sousa *et al.*, 2018). Com s'ha discutit anteriorment aquest pic apoptòtic podria estar relacionat amb la regulació directa dels gens encarregats de l'eliminació de les ROS per part de FoxO i per tant en aquest procés no hi hauria intervenció de Hpo. A més, si mirem els transcriptoma dels animals *hippo* RNAi podem observar que no hi ha canvis en la regulació dels gens relacionats amb l'eliminació de les ROS (de Sousa *et al.*, 2018).

En el cas de la proliferació en els animals *foxo* RNAi no hi ha canvis en els nivells de cèl·lules H₃P+ respecte als controls, però sí que podem observar un augment d'aquest marcador de proliferació en els animals *hpo* RNAi, tot i que aquest no està associat a un augment en la proliferació sinó a una aturada del cicle cel·lular en fase M (de Sousa *et al.*, 2018). El que indiquen els resultats en animals *hippo* RNAi és que no hi ha un augment de la proliferació en aquests animals, tal com passa en els animals *foxo* RNAi. És interessant mencionar que després de la inhibició de *foxo* no s'han detectat defectes en la regulació del cicle cel·lular. Aquest fenomen podria ser explicat a causa de que els animals *foxo* RNAi moren abans de poder desenvolupar aquests defectes. Els animals *hpo* RNAi sobreviuen les tres setmanes d'inhibició però en el cas dels animals *foxo* RNAi només viuen un màxim de dues setmanes.

Tots aquests resultats indiquen que a l'inhibir *foxo* estem afectant diferents factors imprescindibles per la regulació de la homeòstasi, i entre aquest factors hi trobem *hpo*. És a dir, el fenotip observat a l'inhibir *foxo* es pot explicar, com a mínim parcialment, per la inhibició de *hpo*, però *foxo* controla altres factors, com per exemple els reguladors de les ROS.

En aquest treball hem pogut demostrar que després de la inhibició de *hpo* hi ha un augment de la fusió mitocondrial. Després dels arguments exposats en

el paràgraf anterior seria interessant pensar que en *foxo* també hi ha alteracions en l'estructura de les mitocòndries a causa de la inhibició de *hpo* per aquest factor de transcripció. Suposant que aquest increment de la fusió mitocondrial es produís en animals *foxo* RNAi, podria està relacionada en l'atenuació dels efectes de les ROS en aquests animals, ja que en altres estudis s'ha demostrat que l'increment de la fusió de la mitocòndries permet regular i disminuir els nivells de ROS (Yu, Robotham i Yoon, 2006). Per tot això, seria interessant poder estudiar els canvis en la dinàmica mitocondrial en animals *foxo* RNAi i veure quin efecte tenen en la regulació de les ROS.

6. Senescència en planàries regulada per FoxO

El fenotip que observem després de la inhibició de *foxo* podria ser compatible amb un procés de senescència. La senescència cel·lular és el procés en el que una cèl·lula interromp el creixement o divisió per tal d'impedir la proliferació de noves cèl·lules deletèries. L'aparició d'aquests components nocius és causat per diferents factors relacionats amb l'envelliment com dany en el DNA, erosió dels telòmers o la disfunció mitocondrial (Di Micco *et al.*, 2021). En el cas de les planàries, al ser organismes immortals, aquest procés no es produeix de forma fisiològica però és induïda quan s'eliminen els neoblasts per irradiació (Perriguet *et al.*, 2015). Altres estudis han demostrat que aquests neoblast són els responsables de mantenir la mida dels telòmers, i per tant, permeten evitar els processos de senescència (Tan *et al.*, 2012; Iglesias *et al.*, 2019). També s'ha estudiat, en planàries, la relació de la llargada dels telòmers amb mTOR, un dels elements reguladors de *foxo*. S'ha conclòs que l'allargament dels telòmers és dependent de mTOR; quan hi ha inhibició de *tor* hi ha telòmers més llargs i quan es sobreexpressa, la mida dels telòmers disminueix (Iglesias *et al.*, 2019). Aquesta última situació seria similar a la que trobem els animals RNAi de *foxo*. mTOR és un dels encarregats de fosforilar AKT i impedir l'entrada de FoxO en el nucli. Per tant, en situacions on hi ha sobreexpressió de mTOR, FoxO quedarà retintut al citoplasma. Seguint aquesta línia de pensament es podia hipotetitzar que FoxO regula la mida dels telòmers en planàries, i que en animals *foxo* RNAi hi ha una disminució de la mida dels telòmers que està iniciant el procés de senescència. Aquesta hipòtesis podria ser validada quantificant la mida dels telòmers en animals *foxo* RNAi seguint protocols prèviament posats a punt en planàries (Tan *et al.*, 2012; Iglesias *et al.*, 2019).

A més de l'escurçament dels telòmers, un dels desencadenants del procés de senescència és l'acumulació d'estrès cel·lular. Durant aquest treball s'ha discutit la importància de FoxO en la regulació de les ROS i com aquest procés podria ser determinant del fenotip observat en animals *foxo* RNAi. La generació d'estrès oxidatiu ha demostrat ser el desencantant del procés de senescència. Un increment de ROS provoca danys en el DNA, tant en les zones telomèriques com genòmiques, que indueix una resposta al dany al DNA (DDR) (Chen *et al.*, 1995; Lu i Finkel, 2008; Rai *et al.*, 2009). La inducció i manteniment de la DDR és l'encarregada d'iniciar i mantenir el procés de senescència (Passos *et al.*, 2010) (Figura 51). Aquests resultats connectarien amb la hipòtesis de la resposta a estrès (Johnson, Lithgow i Murakami, 1996); l'incapacitat de cèl·lula de regular l'estrès cel·lular és el que provoca l'envelliment.

Com s'ha discutit anteriorment en aquest treball, FoxO permet la regulació de *hpo* i aquest té un paper important en el control de la dinàmica mitocondrial. En els últims anys s'ha descobert que les mitocòndries són un segell distintiu de la senescència; entre d'altres canvis s'ha demostrat que les mitocòndries de les cèl·lules senescent incrementen la seva fusió (Yoon *et al.*, 2006; Mai *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010; Dalle Pezze *et al.*, 2014). Aquests canvis són

compatibles amb els resultats descrits en aquest treball, on s'ha demostrat que la inhibició de *hpo* en planàries provoca canvis en l'estructura mitocondrial. En futurs estudis seria interessant poder estudiar l'estructura i la funció mitocondrial en animals *foxo* RNAi per poder establir si també es presenten canvis en l'estructura mitocondrial i quin impacte tenen en el procés de senescència.

La inhibició de *foxo* en planàries provoca canvis cel·lulars que serien compatibles amb el procés de senescència. En aquest treball no s'ha profunditzat en la relació directa entre *foxo* i *hpo* en la iniciació i el manteniment de la senescència però s'han assentat els coneixements per a futurs estudis en el camp del envelliment.

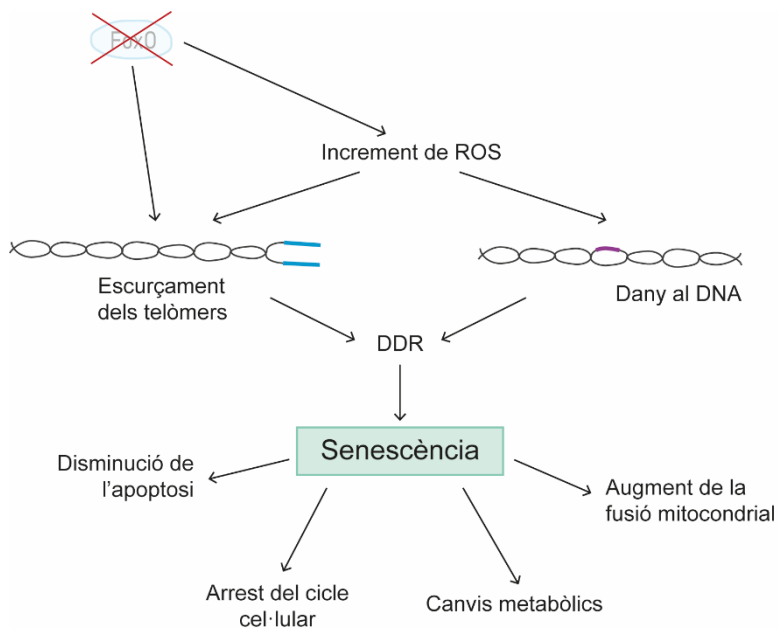


Figura 51. Model de l'inici del procés de senescència després de la inhibició de *foxo*.

A causa de la inhibició de *foxo* s'incrementen els nivells de ROS provoca alhora l'escurçament dels telòmers i danys en el DNA a causa dels seus radicals lliures. La falta de FoxO també podria activar l'escurçament dels telòmers. Tant la reducció de la mida dels telòmers com el dany al DNA activa la DDR que acabarà desembocant en l'inici del procés de senescència. Aquest procés es caracteritza per la disminució de l'apoptosi, arrest del cicle cel·lular, canvis metabòlica i un augment de la fusió mitocondrial.

7. Avaluació de l'obtenció de dades de transcriptòmica utilitzant ONT

El disseny experimental d'aquest treball es basa en seqüenciar planàries en tres condicions fisiològiques diferents: alimentades, desdijunades i regenerats. Les tres condicions seleccionades haurien de permetre obtenir una col·lecció d'ARNs àmplia. A més a més, la determinació de gens diferencialment expressats entre aquestes diferents condicions ens podria ajudar a entendre millor els processos genètics i moleculars implicats en la regeneració i renovació tissular de les planàries. En el disseny i la preparació de les llibreries es va decidir utilitzar quatre rèpliques biològiques per condició, per tal d'evitar perdre robustesa estadística en cas d'haver de descartar alguna rèplica. Aquest disseny experimental ha demostrat ser útil ja que es va haver d'eliminar una rèplica per la condició "Fed" i un altra per la condició "Reg", i tot i això s'han pogut fer les anàlisis posteriors amb suficient robustesa.

Les diferents condicions experimentals es van multiplexar utilitzant els sistema de *barcodes* d'ONT. Al seqüenciar totes les condicions alhora com un sol conjunt de seqüències, evitem possibles biaixos associats a seqüenciar cada mostra en un experiment diferent, minimitzant l'efecte "*batch*" produït per aparells diferents i la manipulació de les mostres per separat. Aquesta aproximació ha demostrat reduir la variància tècnica entre rèpliques. A més, aquesta estratègia és més efectiva a nivell de cost ja que redueix el temps de preparació de les llibreries i la quantitat de reactius utilitzats. En aquest experiment es va observar que la majoria de seqüències varen poder ser demultiplexades correctament i només un petit percentatge va ser assignat com a no classificat.

L'ús de la tecnologia ONT permet obtenir seqüències de llargada completa. Aquesta aproximació el que pretén és poder recuperar transcrits reals; al no passar les mostres per un procés de fragmentació no es corre el risc d'obtenir *contigs* amb artefactes creats per la reconstrucció computacional. La seqüenciació amb ONT es distingeix de la resta de mètodes de seqüenciació disponibles actualment en que no és un sistema bastant en polimerasa. Aquesta innovació permet eliminar biaixos de seqüenciació en presència d'homopolimers i regions de baixa complexitat (Dohm *et al.*, 2008; Harismendy *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2011), suposant un gran avantatge en planàries, on s'ha demostrat que hi ha acumulacions d'homopolimers A-T (Grohme *et al.*, 2018).

El principal inconvenient d'ONT és la relativament elevada taxa d'acumulació d'errors, aproximadament un 14% (Workman *et al.*, 2019), però amb l'avantatge que aquests errors estan repartits de forma estocàstica, és a dir, sense biaix per posició o composició a la seqüència. La distribució aleatòria dels errors permet l'autocorrecció de les seqüències si es té la suficient profunditat de seqüenciació, o bé si es realitza un alineament dels *reads* contra els

transcriptomes o genomes de referència. En aquest treball s'ha utilitzat el mecanisme d'autocorrecció dels *reads* implementat per `RATTLE`. Aquesta estratègia ha donat resultats satisfactoris tot i que podrien ser millorats per una segona ronda de correcció, o bé l'alineament contra el transcriptoma de referència.

En el càlcul dels ORFs vàrem poder comprovar que efectivament hi podria haver alguns errors a nivell de seqüència en els *contigs* del nostre nou assemblatge. Quan es va determinar l'ORF més llarg per a cada *contig* s'obtenien ORFs molt més curts que els transcrits. Aquest resultat estaria indicant la presència de canvis en els nucleòtids que provoquen la finalització prematura de la pauta de lectura. En canvi quan s'utilitza `ESTscan`, programa que permet la correcció de les seqüències tant a nivell de substitucions com d'insercions/deleccions, es veu que millora considerablement el ràtio entre la mida del *contig* i la de l'ORF predit. Aquests resultats reforcen més la hipòtesi que es necessita una nova ronda de correcció dels *contigs*.

La informació aportada per la predicció dels ORFs també ens permet comparar la qualitat del nostre assemblatge amb els transcriptomes de referència actuals (Figura 40). La principal diferència entre els diferents assemblatges és la quantitat en nombre de seqüències; en el nostre cas tenim un nombre de *contigs* molt inferior als altres transcriptomes però, tot i això, mantenim una qualitat de seqüències comparables a aquests assemblatges de referència. La quantitat de *contigs* obtinguts podria ser optimitzada millorant les llibreries en afegir condicions experimentals més extremes per forçar l'expressió de més gens i recuperar d'aquesta forma més transcrits.

Les dades obtingudes han estat afegides al navegador genòmic `JBrowse` de `PlanNet` permetent una visió més clara dels nostres resultats. S'ha pogut observar com molts *contigs* corresponen a altres anteriorment descrits però en alguns casos podem observar l'aparició de isoformes anteriorment no descrites com la que es mostra a la Figura 41a. El gen representat en aquesta figura presenta un homòleg en humà, *afg3l2*, on s'ha demostrat que canvis en seu *splicing* canvien la seva localització cel·lular de la mitocòndria al reticle endoplasmàtic, el que provoca danys neurovegetatius en cervell i retina (Mancuso *et al.*, 2012). Aquest només és un exemple que diferents isoformes poden donar lloc a canvis en la seva funció. Els resultats d'aquest treball ens permeten demostrar que el mètode de seqüenciació és efectiu, a l'obtenir noves isoformes de *splicing* que anteriorment no havien estat descrites i podria suposar una millora en l'estudi funcional de variants gèniques en aquesta espècie.

Les anàlisis d'expressió diferencial s'han fet utilitzant el paquet `limma` dins l'entorn de `R`; aquest paquet permet la normalització de les dades per tal de poder-les ajustar a un model lineal i finalment poder realitzar els contrastos d'hipòtesis desitjats (Ritchie *et al.*, 2015). L'elecció d'aquesta estratègia per sobre d'altres llibreries populars en l'anàlisi d'expressió diferencial, com les

incloses en els paquets `edgeR` o `DESeq2`, és la possibilitat de normalització de dades de RNA-seq amb el model lineal que ofereix el filtre `voom`. Aquest mètode estima la relació mitjana de les variàncies dels comptatges generant pesos precisos per a cada observació, alhora que es consideren menys assumpcions sobre la distribució intrínseca de les observacions en comparació amb la resta de mètodes (Law *et al.*, 2014).

La seqüenciació de ONT ha permès l'obtenció d'un nou transcriptoma de bona qualitat i amb transcrits de llargada completa. A més a més hem demostrat que el mètode és útil, no només per a l'obtenció de nous transcrits de qualitat, sinó que també es poden realitzar anàlisis de DGE de forma eficient. En un futur seria interessant poder seguir utilitzant aquesta tècnica per tal de millorar el catàleg de transcrits en *S. mediterranea*.

8. Adaptació de les planàries a diferents condicions fisiològiques

El resultat de les anàlisis de DGE indiquen que hi ha un nombre considerable de gens que varien en les diferents condicions experimentals del nostre disseny. Aquest resultat indica que la seqüenciació amb ONT no només proporciona dades fiables per a la reconstrucció de nous transcriptomes sinó que també permet realitzar anàlisis d'expressió diferencial. A més a més, hem pogut trobar la presència de *bls*, un gen descrit com a imprescindible per a la transició entre diferents condicions alimentaries (Eudald Pascual-Carreras *et al.*, 2020) reforçant encara més la robustesa del mètode de seqüenciació.

Les diferents comparacions ens han permès identificar processos clau per a la transició entre diferents situacions fisiològiques de la planària. A més a més d'aquestes dades, a partir de les dades representades en el dígrama de Venn de la Figura 48, s'han obtingut una sèrie de gens que són comuns que podríem qualificar com a gens específics per a cada una de les condicions experimentals. Aquesta llista de gens conformen una sèrie de gens candidats interessants a estudiar per poder aprofundir en la genètica que regula els canvis entre els diferents estats fisiològics en la planària.

De l'anàlisi dels gens específics en cada condició fisiològica destaca la gran quantitat de gens de la condició d'alimentats; indicant que aquesta condició necessita un major nombre de adaptacions que en la resta de casos. És interessant entendre que quan la planària s'alimenta hi ha un augment de la seva mida, el que implica un major nombre de cèl·lules (Baguña *et al.*, 1990). En el marc d'aquest procés de creixement és lògic que hi ha hagi una major expressió de gens relacionats amb la transcripció i la traducció, a més a més de gens implicats en la biosíntesis de molècules metabòliques imprescindibles. A més, també veiem que hi ha expressió de gens relacionats amb la regulació del citoesquelet que no només està relacionat amb els canvis en l'estructura cel·lular sinó que també té un paper important en la formació del fus mitòtic. Si ens fixem en les anàlisis de GO realitzades en les dues comparacions on hi ha animals alimentats (Figura 45 i Figura 46) veiem que tenen en comú les GO de la regulació de la mitosi i del citoesquelet. A més a més del citoesquelet, a la llista de gens candidats importants en animals alimentats, també hi trobem la presència de gens importants per a la formació i desenvolupament de múscul. Quan els animals augmenten de mida, a causa de l'alimentació, hi ha un augment de la mida de totes les estructures però la regulació i formació de múscul és especialment important ja que envolta tot l'animal i és l'encarregat de l'expressió dels gens d'informació posicional (PCG) (Witchley *et al.*, 2013; Scimone *et al.*, 2016; Lucila Scimone, Cote i Reddien, 2017; Fincher *et al.*, 2018).

A més dels canvis directament relacionats amb el canvi de mida, en les planàries alimentades també destaca de forma important l'aparició de gens

encarregats de corregir proteïnes plegades incorrectament com les xaperones i les coxaperones. Un dels gens obtinguts en aquest treball, *dnaja1*, ha estat estudiat amb anterioritat i s'ha vist que té un rol en el manteniment de la homeòstasi de la planària. En aquest estudi es descriu la interacció de DNAJA1 amb PIWI, que permet l'estabilitat d'aquest últim, implicant-lo en el manteniment de la integritat dels neoblasts (Wang *et al.*, 2019). Aquest resultat valida la importància de *dnaja1* en animals alimentats, ja que sense l'acció d'aquesta coxaperona no és possible la divisió dels neoblasts per permetre el creixement de la planària. Estudis més recents han demostrat que l'activació de la resposta a proteïnes mal plegades (UPR) en animals alimentats preserva la fiabilitat mitòtica. En aquest mateix estudi observen que la inhibició de la xaperona TRiC/CCT causa defectes en animals regenerats i desdejunats però que a l'alimentar aquests animals l'activació de la UPR permet revertir aquests defectes (Gutiérrez-Gutiérrez *et al.*, 2021).

En aquest treball s'ha estudiat el paper de *foxo*, un gen regulat per modificacions post-transcripcionals en animals alimentats. Seria interessant poder estudiar la relació que podria tenir *foxo* amb la UPR ja que en altres models animals s'ha relacionat la funció d'aquest factor de transcripció amb la regulació de xaperones i coxaperones (González-Quiroz *et al.*, 2018). A més a més, l'activació de la UPR no només s'ha estudiat en el context de canvis alimentaris sinó que també s'ha determinat que està relacionada amb la disminució de l'esperança de vida en *S. cerevisiae* (Chadwick *et al.*, 2020). Com s'ha discutit en aquest treball, és possible que en les planàries, com en altres organismes, *foxo* siguin un dels reguladors de l'entrada en senescència de les cèl·lules, fent encara més interessant estudiar la UPR i la seva relació amb *foxo*.

A més del seu rol en envelliment la UPR també ha estat relacionada amb càncer (Madden *et al.*, 2019). Concretament alguns estudis relacionen l'aparició de sobrecreixements a la activació de la UPR a través de la via Hippo (Wu *et al.*, 2015). En les planàries, si busquem les xaperones i coxaperones que apareixen com a gens específics en el creixement, trobem que aquestes es troben diferencialment expressades en animals *hpo* RNAi, a excepció del gen que codifica per la xaperona mitocondrial *hspd1*. La xaperona *hspa8* i la coxaperona associada *dnaja1* es troben regulades a la baixa en animals *hpo* RNAi, mentre que la resta de xaperones estan regulades a l'alta. L'explicació més plausible és que en aquests animals *hpo* RNAi hi ha una major activació de la UPR que permet l'aparició de sobrecreixements, però aquests sobrecreixements no són a causa d'una major proliferació cel·lular, ja que hi ha una regulació a la baixa de *dnaja1* que impedeix la correcta divisió dels neoblasts. L'arrest en fase M en animals *hpo* RNAi ha estat demostrat en treballs anteriors del nostre laboratori (de Sousa *et al.*, 2018).

Entre els gens implicats en l'alimentació destaquen diversos gens relacionats amb l'acció de la mitocondria, com pugui ser els gens metabòlics. En aquest treball s'ha estat estudiant com l'estructura mitocondrial canvia amb la inhibició de *hpo* formant mitocòndries més fusionades. S'ha demostrat també que

aquestes mitocondries són més bioenergètiques. Aquests canvis estructurals i funcionals de la mitocondria podrien estar relacionats amb l'augment de gens biosintètics que apareixen com a importants per al procés d'alimentació. És més, alguns dels gens relacionats amb l'anabolisme que són importants en animals regenerats apareixen també regulats a l'alta en animals *hpo* RNAi com és el cas de *bhmt*, *agps*, *mat2a*, *qpct*, *aldh18a1*, *gbe1*, *odc1*, *pck2*, *ddhd2*, *ets2* i *lpcat1*.

En conclusió es podria hipotetitzar que després de la inhibició de *hpo* s'activa el "programa definit per animals alimentats" que seria el responsable de l'aparició de sobrecreixements. Per tal de poder comprovar aquesta hipòtesis es podria plantejar inhibir conjuntament gens regulats a l'alta en animals *hpo* RNAi, i importants pel creixement de la planària, juntament amb *hpo* i comprovar si hi ha un rescat del fenotip.

Trobem un nombre molt petit de gens que podrien ser classificats com importants en la condició d'animals dejunats. Destaca *chac1*, un gen que ha estat relacionat amb l'apoptosi (Mungrue *et al.*, 2009). Seria interessant estudiar el seu rol durant el decreixement de la planària, quan no hi ha presència de nutrients.

En la llista de gens específics per la regeneració tenim un nombre major de gens que serien interessants estudiar. Entre aquest gens destaca *ccnt2* una ciclina que ha estat identificada anteriorment en planàries però de la que no s'han fet estudis funcionals (Zhu i Pearson, 2013). Podria ser interessant determinar si aquest gen compleix un rol específic com una ciclina relacionada amb el procés de regeneració en planàries. En animals regenerats també destaca *sae1* un gen relacionat amb el procés de SUMOrilació. Estudis previs han establert la importància d'altres gens relacionats amb aquest procés en la regeneració de planàries (Thiruvalluvan *et al.*, 2018). En aquest estudi es va determinar la conversació de la SUMOrilació en planàries i es van identificar diferents gens importants de la via entre els que podem trobar *sae1* encarregat d'activar SUMO, l'enzim encarregat de la modificació post-traducciona. També es demostra en aquest estudi que la SUMOrilació és necessària per la regeneració en planàries. Els animals regenerants estudiats han estat amputats 18 hores abans de l'extracció del seu mRNA. En aquest punt de regeneració el que podríem estar observant són canvis locals deguts a la presència de la ferida. Si s'analitzessin animals a uns quants dies de regeneració podríem observar efectes en la remodelació global de la planària. A més a més, cal recordar que aquests animals han estat desdejuns durant dues setmanes abans del inici del procés experimental.

Aquesta anàlisi d'expressió diferencial ha permès obtenir un conjunt de gens molt interessants per tal de poder estudiar els canvis entre les diferents condicions fisiològiques de la planària. Tot i això en aquest experiment no s'han pogut analitzar canvis a nivells de isoformes. Hem pogut observar que la seqüenciació per ONT obté diferents isoformes d'un sol gen però tot i així no

hem observat canvis en l'expressió gènica a aquest nivell. Seria interessant poder repetir aquesta seqüenciació per tal d'obtenir un major nombre de *contigs* que ens permetessin arribar a discernir canvis a nivell de isoforma.

Conclusions

Les conclusions d'aquesta tesis són:

1. La inhibició de gens amb funció mitocondrial, regulats a la baixa després d'inhibir *hpo*, fenocòpien *hpo*, indicant que la regulació de la funció de la mitocòndria podria ser una diana de la via Hippo.
2. Després de la inhibició de *hpo* les mitocòndries canvien la seva mida i la seva forma donant lloc a mitocòndries més fusionades.
3. Les mitocòndries més fusionades presents en animals *hpo* RNAi són més eficients energèticament.
4. La inhibició de *foxo* dona lloc a animals amb defectes en la regeneració i en el manteniment de la homeòstasi molt semblants als animals *hpo* RNAi.
5. La inhibició de *foxo* en animals intactes no afecta a la proliferació però sí que inhibeix l'apoptosi, donant lloc a acumulacions de cèl·lules.
6. Gens encarregats de l'eliminació de ROS tenen motius d'unió a FoxO a la seva regió reguladora, i la inhibició de *foxO* provoca la disminució d'aquests gens diana. Per tant, FoxO regula l'eliminació de ROS.
7. *hpo* presenta motius d'unió a FoxO a la seva regió reguladora i la inhibició de *foxO* provoca la disminució de *hpo*. Per aquest motiu, part del fenotip observat en animals *foxo* RNAi podria ser explicat perquè *hpo* és un gen diana de FoxO.
8. El mètode posat a punt per a la preparació de les llibreries, etiquetatge per *barcodes* i seqüenciació ens proporciona bons resultats per obtenir transcrits de llargada completa amb ONT.
9. L'autocorrecció aplicada per RATTLE permet l'obtenció de *contigs* de bona qualitat, però és recomanable realitzar una segona ronda de correcció.
10. L'anàlisi de DGE, realitzat amb els transcrits obtinguts de la seqüenciació amb ONT, ha demostrat que hi ha gens diferencialment expressats entre les diferents condicions experimentals, validant el mètode de seqüenciació.

11. Els resultats de DGE proporcionen una llista de gens claus responsables dels canvis fisiològics a les planàries tot i no obtenir resolució a nivell de isoformes.

Materials i mètodes

Manteniment de les planàries

L'espècie utilitzada per a aquest treball és la soca clonal BCN10 de *Schmidtea mediterranea* asexual. Les planàries es mantenen a 20°C en medi artificial de planària (PAM) (0.016 mM NaCl, 0.01 mM MgSO₄·7H₂O, 0.012 mM NaHCO₃, 0.001 mM KCl, 0.001 mM MgCl₂·6H₂O, 0.01 mM CaCl₂·2H₂O) (Cebrià i Newmark, 2005). Els animals s'alimenten cada setmana dos cops amb fetge de vedella ecològic. Abans de cada experiment els animals no són alimentats com a mínim durant una setmana.

Determinació de la mida de les planàries

Per tal de poder garantir la homogeneïtat de les mides de les planàries, en experiments on la mida és un factor rellevant, les planàries són mesurades abans de començar els experiments. A més, aquest sistema permet identificar canvis en la mida dels animals al llarg dels experiments. En primer lloc es seleccionen a ull les planàries que presenten la mida d'interès. Cada planària es va depositant en un pouet d'una placa amb aigua per a planàries (PAM). Aquestes planàries són després fotografiades amb una càmera Scmex 3.0 de la lupa binocular Zeiss Stemi SV 6 i les seves àrees són calculades manualment utilitzant Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). A partir d'aquestes mesures es crea una taula en la qual s'inclou l'àrea de la planària i la seva posició a la placa. Aquesta matriu de dades és processada amb R (R Core Team, 2020), on es divideixen els animals en diferents grups mantenint la mateixa variància. En un primer filtratge s'eliminen aquells individus que presenten valors aberrants. La funció utilitzada per l'assignació aleatòria de les planàries en els diferents grups és `create_groups` del paquet `minDiff` (Papenberg, 2018). Si es vol seguir mesurant la mida de les planàries durant diferents moments del experiment es tornen a fotografiar les planàries i a mesurar la seva àrea seguint el procediment anteriorment descrit.

Clonatge de gens candidats

Els gens candidats estudiats en aquest treball es van clonar a partir del cDNA total de la planària utilitzant encebadors específics de cada gen. Es dissenyen un parell d'encebadors externs i un encebador intern per a cada gen per tal de

poder portar a terme una PCR niada (Taula 1). El fragment d'interès amplificat es clona al vector pCRII (Sigma), amb el que es transforma la soca competent de *E. Coli* DH5 α (Fisher Scientific). D'aquest cultiu de bacteris es purifica el vector amb el fragment del gen d'interès utilitzant el kit Plasmid DNA mini kit I (Omega).

Taula 1. Encebadors utilitzats pel clonatge dels gens candidats.

| Gen | Encebador directe | Encebador indirecte |
|--------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>bck</i> | tgccaatgaactgcaacaa | cccggcattctttgtggaaa |
| <i>cecr5</i> | agaaaggaaactagatcccgtagaag | ctgaactcttaacttctgcctttctt |
| <i>tdh</i> | caatgctcaaagaccctga | gcatctaaagtcaagcgcaaa |

| Gen | Encebador intern |
|--------------|-------------------------|
| <i>bck</i> | ggattagctgctcgagggtg |
| <i>cecr5</i> | ggctgaagcagttttaccaag |
| <i>tdh</i> | gcatctaaagtcaagcgcaaa |

Inhibició per RNAi

La inhibició dels gens es realitza a través de RNA d'interferència (RNAi) (Alvarado i Newmark, 1999). Aquesta tècnica es basa en la injecció de RNA de doble cadena (dsRNA) a la zona prefaríngea dels animals. El dsRNA es sintetitza *in vitro* seguint el protocol publicat per Sánchez-Alvarado i Newmark (Alvarado i Newmark, 1999). Les injeccions (3 injeccions x 32,2 nl cada una) es realitzen durant tres dies consecutius al sistema digestiu de l'animal utilitzant el nanoinjector Nanoject II injector (Drummond Scientific Company). Si cal repetir la inhibició per potenciar el fenotip, el dsRNA s'injecte 3 dies més, la següent setmana. Cada setmana constitueix una ronda. Depenent de l'experiment varia el nombre de rondes d'injecció. Els experiments es porten a terme amb animals desdejunats durant com a mínim una setmana. En el cas que es vulgui observar la regeneració, els animals són amputats un dia després de l'última injecció (Figura 1). S'utilitza *gfp* (*green fluorescent protein*) com a control en tots els experiments ja que aquest és un gen que no es troba present en el genoma de la planària però permet l'activació de la maquinària de silenciament gènic.

Marcatges per immunohistoquímica en animals sencers

El marcatge per immunohistoquímica en animals sencers consisteix en marcar proteïnes concretes de la planària utilitzant anticossos específics. Quan ens referim a animals sencers significa que s'utilitza tota la planària sense seccionar-la per realitzar el protocol. Els marcatges utilitzant immunohistoquímica en animals sencers es realitzen segons ha estat descrit anteriorment (Ross *et al.*, 2015). En resum, els animals són matats amb 2% HCl a 4°C i fixats amb 4% formamida (FA) durant 15 minuts. La clarificació dels animals es fa utilitzant H₂O₂ durant tota la nit. El dia següent es bloqueja amb 1% BSA i finalment els animals són incubats amb l'anticòs primari tota la nit a

4°C. Un cop el primer anticòs ha reaccionat es renten les restes d'anticòs primari i es realitza la incubació amb l'anticòs secundari, conjugat amb un fluorofor, també tota la nit a 4°C. Finalment, es procedeix a rentar les planàries de les restes d'anticossos i a la tinció de nuclis amb DAPI (1:5000, Sigma).

Els anticossos primaris utilitzats són: ratolí anti-synapsin (anti-SYNORF1, 1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA), conill anti-phospho-histone H3 (anti-PH3-Ser10, 1:500; Cell Signaling Technology), ratolí anti-VC1 (anti-arrestin, 1:15,000, cedit pel prof. K. Watanabe) i β -cateinina (anti-Bcat2; 1:2000; anticòs propi). Els anticossos secundaris emprats són: Alexa 488-conjugated cabra anti-ratolí (1:400; Molecular Probes, Waltham, MA, USA) i Alexa 568-conjugated cabra anti-conill (1:1000; Molecular Probes, Waltham, MA, USA).

Marcatges per immunohistoquímica en talls

Les immunohistoquímiques sobre talls es basen en incloure les planàries en parafina per després tallar mircoseccions de l'animal. Les immunohistoquímiques d'aquest treball s'han realitzat seguint els protocols prèviament descrits (Adell *et al.*, 2018). En resum, els animals són matats amb 2% HCl i fixats amb 4% PFA durant 2h. Un cop es tenen els animals fixats s'inclouen en parafina realitzant rentats progressius de PBS, PBS-etanol, etanol, etanol-xilè, xilè, xilè-parafina i finalment parafina. Els animals inclosos en parafina es seccionen utilitzant un micròtom. Els talls de parafina són seguidament sotmesos a una immunohistoquímica: bloqueig, incubació de l'anticòs primari i finalment incubació de l'anticòs secundari i marcatge dels nuclis amb DAPI (1:5000, Sigma).

En aquest treball s'ha utilitzat l'anticòs primari de conill anti-PIWI (anti-SMEDWI; 1:1000; cedit pel laboratori de la Dra. Bartscherer) i el secundari Alexa 568-conjugated cabra anti-conill (1:1000; Molecular Probes, Waltham, MA, USA).

Marcatges per hibridació *in situ* en animals sencers

El marcatge per hibridació *in situ* permet marcar RNA de la planària a partir de la hibridació de sondes complementàries. Les hibridacions *in situ*, així com la síntesis de sondes, d'aquest treball han estat realitzades seguint el protocol descrit anteriorment (Currie *et al.*, 2016). En resum, els animals són matats amb 5% de N-acetil cisteïna (NAC) i fixats amb 4% FA durant 15 minuts. Un cop els animals estan fixats són tractats amb una solució reductora (DTT, NP-40 i SDS) i metanol per tal de disminuir el soroll de fons. La clarificació dels animals es fa utilitzant H₂O₂ durant 2 hores. Els animals blanquejats són incubats amb la sonda específica durant aproximadament 16h a 56°C. Les sondes estan marcades amb nucleòtids modificats amb desoxigenin (DIG). Un cop hibridada, la sonda es renta a concentracions decreixents de SSCTx. El següent pas és incubar en solució de bloqueig i incubar amb anticòs anti-DIG conjugat amb fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP; 1:4000; Roche). Un cop el l'anticòs ha hibridat

es renten les restes i es revela la *in situ* utilitzat una solució comercial de NBT/BCIP (Roche) a una concertació final de 20 µl/ml.

Assaig d'activitat de Caspasa 3

Després de les rondes d'inhibició pertinents segons cada RNAi, s'extreu la proteïna dels animals. La homogeneïtzació es realitza tallant les planàries amb una fulla esmolada en tampó de lisis (5 mM Tris-HCl a pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.5% Triton X-100). Els lisats es sotmeten a 10 minuts de centrifugació a 13000g a 4°C. Es recupera el sobrenedant i es quantifica la concentració de proteïna per Bradford. El procés d'extracció de proteïna i de quantificació de l'activitat Caspasa 3 es descriu a González-Estévez *et al.*, 2007. Aquest protocol es basa en l'avaluació de l'activitat Caspasa a partir de la transformació d'un substrat fluorescent. Per a fer l'assaig de Caspasa 3 s'utilitzen 20 mg d'extracte de proteïna. El reactiu utilitzat per avaluar l'activitat Caspasa 3 és Ac-DEVD-AMC Caspase-3 Fluorogenic Substrat (BD Pharmingen) i com a control s'utilitza l'inhibidor de l'activitat Caspasa 3 Z-DEVD-FMK, Caspase-3 Inhibitor (BD Pharmingen). Per mesurar la fluorescència s'utilitza l'espectrofotòmetre de placa Fluostar Optima microplate fluorescence reader (BMG Labtech) amb la configuració: excitació 380 nm; emissió, 440nm.

Assaig de TUNEL sobre talls

El marcat de final de tall de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL) és basa en marcar els extrems -OH terminals lliures creats a causa del procés d'apoptosi. El protocol per TUNEL en animals sencers ja ha estat descrit anteriorment (Pellettieri *et al.*, 2010), però l'adaptació d'aquesta tècnica a talls de parafina encara no es troba publicat (Rosselló i Adell 2021, under review). El protocol complet de com realitzar l'assaig de TUNEL sobre talls es pot trobar l'Article 2. En resum, els animals es maten amb 2% HCl i fixats amb 4% PFA durant 2h a 4°C. Un cop es tenen els animals fixats s'inclouen en parafina realitzant rentats progressius de PSB, PBS-etanol, etanol, etanol-xilè, xilè, xilè-parafina i finalment parafina. Els animals inclosos en parafina es seccionen utilitzant un micròtom. Els talls de parafina són seguidament sotmesos a tractament de TUNEL utilitzant el kit ApopTag Red In situ Apoptosis Detection Kit (CHEMICON) i seguint les indicacions del fabricant. Un cop finalitzat el marcatge de les cèl·lules apoptòtiques els nuclis es marquen amb DAPI (1:5000, Sigma).

Western blot

Les planàries es dissocien amb lisi buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% SDS) per ser seguidament sotmeses a cicles de congelació ebullició. L'últim pas d'ebullició es realitza a 95°C durant 15 minuts per assegurar la desnaturalització de les proteïnes. Els extractes de proteïna obtinguts són quantificats per Bradford. 40 ng/ml d'aquesta proteïna s'utilitzen per córrer en gels de poliacrilamida SDS-PAGE del 12% i, finalment, es transfereixen a membranes de Western blot de nitrocel·lulosa (GE Healthcare Life Science). La

membrana s'incuba amb els anticossos ratolí anti-Citrat sintetasa (anti-CS; 1:2500; SCBT) i conill anti-Histona 3 (anti-H3; 1:30000; Milipore). Després de la incubació amb els anticossos primaris aquests són detectats amb els corresponents anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa (POD); cabra anti-ratolí-POD (1:2000; Fisher Scientific) cabra anti-conill-POD (1:4000; Fisher Scientific). El senyal és finalment revelat utilitzant el Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent i la quimioluminescència resultant es detecta utilitzant el detector LAS 4000 (Fujifilm). Les quantificacions es realitzen amb el programa MultiGauge i es varen normalitzar respecte el senyal d'anti-H3.

Detecció dels nivells de ROS

L'experiment es fa amb 3 rèpliques biològiques per condició; en cada una de les mostres hi ha un mínim de 5 planàries. La homogeneïtzació es realitza tallant les planàries amb una fulla esmolada en tampó de lisis (5 mM Tris-HCl a pH 8,0, 20 mM EDTA, 0,5% Triton X-100). Els lisats es sotmeten a 10 minuts de centrifugació a 13000g a 4°C. Es recupera el sobrenedant i es quantifica la concentració de proteïna per Bradford. En plaques de 98 pouets opaques (Costar) es pipeteja la barreja de reacció que consisteix en 20 µg de proteïna 0,5 mg/ml de DCFDA (Sigma) i tampó de lisis. La barreja de reacció s'incuba a 37°C durant 30 minuts. La fluorescència resultant de la interacció de la DCFDA amb les ROS es mesura amb l'espectrofotòmetre de placa Fluostar Optima microplate fluorescence reader (BMG Labtech) amb la configuració: excitació 495 nm; emissió, 520nm.

Captura i quantificació de imatges de fluorescència

Les imatges de les immunohistoquímiques i TUNEL han estat adquirides utilitzant el microscopi confocal Zeiss LSM 880 (Zeiss, Oberkochen, Alemanya). Les imatges d'hibridacions *in situ* han estat adquirides amb la lupa binocular MZ16F (Leica) equipada amb la càmera ProRes C3 (Jenopik). Les imatges d'aquest treball mostren les seccions representatives.

La quantificació del nombre de cèl·lules H3P+ i TUNEL+ en tot el animal es fa manualment. En el comptatge de cèl·lules H3P+ el nombre total de cèl·lules positives es divideix per l'àrea de l'animal. En les seccions de TUNEL es contenen un mínim de 30 seccions transversals representatives per animal. El nombre de cèl·lules positives per TUNEL es divideix per la àrea mitjana de les seccions de l'animal. Les àrees són calculades utilitzant Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). En la quantificació de les cèl·lules epidèrmiques el nombre de nuclis es conta manualment i es divideix per l'àrea total de la imatge. Totes les imatges són analitzades cegament i després s'agrupen depenent de les condicions. Com a mínim es varen analitzar dos animals per condició.

Tractament dels animals per l'obtenció de les imatges d'ultraestructura

En aquest treball s'utilitzen dues tècniques per a l'observació de la ultraestructura: la microscòpia electrònica de transmissió (TEM) i la microscòpia electrònica de rastreig de cara en sèrie (SBFSEM). Per a ambdues tècniques la fixació i tinció de les planàries és comú.

Es fixen planàries utilitzant la solució de fixació (2% PFA, 2.5% glutaraldehyd, dissolt en tampó EM). Tampó EM (0.07mM CaCo, 0.01mMcaCl₂ dissolt en aigua). La tinció de les mostres es realitza amb una solució d'osmi (1% tetraòxid d'osmi en tampó EM). Finalment els animals són inclosos en resina EPOXI.

Obtenció d'imatges per TEM i estudi de l'estructura mitocondrial

A partir de les mostres tenyides i incloses en EPOXI s'obtenen ultrafins seguint el procediment estàndard del servei de ultramicrotomia de CCiTUB. Aquests talls són observats al TEM Tecnai Spirit 120kV. S'observen un mínim de tres animals per condició on es realitzen imatges de com a mínim tres animals per condició, dels quals es van realitzar imatges de com a mínim tres ultrafins diferents.

Les imatges resultants són tractades amb el programa Fiji on es calcula l'àrea i el perímetre de les mitocondries i la longitud de les crestes utilitzant les mesures de la eina Measure. El càlcul de la circularitat (circ.) i la relació d'aspecte (AR) es fa utilitzant les següents formules:

Circ. = $4\pi \frac{a}{p^2}$ on a representa àrea i p perímetre

AR = $\frac{A_M}{A_m}$ on A_M simbolitza l'eix major de la mitocondria i A_m l'eix menor de la mitocondria

Per al càlcul de l'eficiència bioenergètica s'utilitza el coeficient d'eficiència energètica a la mitocondria (CEEM) descrit anteriorment (Paukov, Kazanskaya i Frolov, 1971). L'expressió d'aquest coeficient és:

CEEM = $a \cdot n$ on a representa àrea i n el nombre de crestes

Obtenció d'imatges per SBFSEM i estudi de l'estructura mitocondrial

Les imatges de SBFSEM s'obtenen amb el microscopi Zeiss Merlin VP compact amb Gatan 3View2XP seguint el procés estàndard de la unitat de Bioimaging a Oxford Brookes University. S'obtenen imatges d'un animal per condició i es van seleccionar dues zones diferenciades per animal.

El tractament de les imatges es fa utilitzant el programa IMOD amb la seva extensió 3Dmod (Kremer, Mastronarde i McIntosh, 1996; Mastronarde i Held,

2017). El càlcul de les superfícies i el volum de les reconstruccions 3D es realitza amb la funció `imodinfo` inclosa a `3dmod`.

Extracció d'RNA i síntesis de cDNA

Per l'extracció de RNA, els animals són homogeneïtzats amb Trizol (Invitrogen) seguit per dues extraccions de cloroform i precipitació amb isopropanol. El protocol es desenvolupa seguint les instruccions del fabricant. Per a la síntesis de cDNA es va utilitzar el protocol anteriorment descrit per Almuedo *et al.* (Almuedo-Castillo *et al.*, 2014) emprant 1000 ng/ul de RNA total de partida.

Quantificació per PCR quantitativa

Les qPCR es porten a terme utilitzant 7500 Fast PCR System (Applied Biosystems). Tots els experiments compten amb tres rèpliques biològiques i tres rèpliques tècniques per condició. Els nivells d'expressió es normalitzen utilitzant el gen constitutiu *ura4*. Els encebadors utilitzats es troben a la Taula 2.

Taula 2. Encebadors utilitzats per a la realització de les qPCR

| Gen | Encebador directe | Encebador indirecte |
|-------------|--------------------------|----------------------------|
| <i>bak</i> | gtcggaccagatgacactagg | aaacaaggctcgctacattttcc |
| <i>cat</i> | agctgtttatcgagaggagca | cgaggccaattgtaacgagc |
| <i>foxo</i> | tcatctccaccaaacccttc | cccgatggaatcaagacac |
| <i>gpx</i> | cggatggccaactacatctcc | ggcatggctttcgtgaaga |
| <i>piwi</i> | gatggggctaataccaatcc | aattcgtaggagatgctgtacc |
| <i>sod2</i> | ccgttgctaggatttgacgt | ttaactactcgccacaaagctt |
| <i>ura4</i> | ttcacgttgctgatctagcc | cgaatacctctgccagctgc |
| <i>vim</i> | agaaatgtttcccggtgtcg | tcaggagttggaggatcag |

Anàlisi d'ontologies gèniques

Per fer l'anàlisi d'ontologies gèniques (GO) es crea una base de dades personalitzada per els identificadors de `dd_Smed_v6` amb les dades d' anotació extretes de PlanNET (Castillo-Lara i Abril, 2018). L'anàlisi d'enriquiment de GO es porta a terme amb el paquet `topGO` de R (Alexa i Rahnenfuhrer, 2021). Per la representació gràfica de les dades s'utilitza la llibreria `ggplot2` (Wickham, 2016).

Preparació de les llibreries

En aquest experiment s'han considerat utilitzar tres condicions experimentals.

1. **Fed:** Planàries alimentades dos cops per setmana durant com a mínim dos setmanes. El darrer cop que se'ls hi va donar de menjar va ser dos dies abans de l'inici de l'experiment.
2. **Strv.:** Planàries desdejunades durant dues setmanes

3. **Reg.:** Planàries amputades 18 hores abans de l'extracció de l'ARN. Aquests animals no havien estat alimentats les dues setmanes prèvies a l'amputació.

Per tal de poder garantir l'homogeneïtat en la mida de les planàries, els animals de totes les condicions són mesurats abans de començar els experiments. Per l'extracció de l'ARN es segueix el protocol d'extracció i síntesis de cDNA descrit anteriorment amb la peculiaritat de què l'encebador utilitzat per la síntesi de cDNA és:

5' -atggagcagagtgcagaggactcgagctcaagcttttttttttttttttt-3'

La preparació de la llibreria es realitza seguint el protocol de ONT per la seqüenciació directa de cDNA (SQK-DCS109). Les diferents condicions experimentals són etiquetades amb el kit ONT de *barcoding* (EXP-NBD104), seguint les instruccions del mateix fabricant.

Experiment de seqüenciació

Per a la seqüenciació s'utilitza el dispositiu MinION d'ONT equipat amb el Flowcell R9.4 de la mateixa casa comercial. La llibreria es carrega al dispositiu utilitzant el protocol d'inicialització del tampó de seqüenciació i de càrrega de la mostra indicat pel fabricant. L'adquisició de les dades es fa amb el software del fabricant, MinKNOW, i l'experiment de seqüenciació es deixa corrent durant 72 hores. Utilitzant el mateix programa es realitza el pas de senyal a seqüència (*basecalling*) en temps real. Aquest programari també s'encarrega de l'eliminació dels *barcodes* i les seqüències adaptadores. En les anàlisis posteriors només s'utilitzen les seqüències amb un valor Q major o igual a 7.

Assemblatge i correcció del transcriptoma de novo

Al no tenir un encebador oligo-dT només compost per T s'ha d'eliminar la seqüència flanquejant dels *reads* pre-processats. Aquesta tasca es va dur a terme amb l'eina *bbduk* ($ktrim=l$ $rcomp=f$ $k=25$ $hdist=3$, <http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bb-tools/>).

A partir de les seqüències dels *reads* netejades s'assembla el transcriptoma utilitzant *RATTLE* (de la Rubia *et al.*, 2020). Aquest programa permet fer un primer pas d'agrupació, a partir del qual es pot continuar amb l'autocorrecció dels errors i finalment una última etapa de polit dels *contigs* assemblats.

Per a determinar la regió codificant (CDS), que conté la seqüència de nucleòtids que es tradueix a proteïna, es fa una cerca sobre tots els transcrits de l'assemblatge de les pautes de lectura més llargues (ORF) amb un script de *Perl*. Donat que hi podia haver errors de seqüenciació (substitucions i insercions/delecions) s'obté de nou les ORF amb el programa *ESTscan* (Iseli, Jongeneel i Bucher, 1999; Lottaz *et al.*, 2003), el qual, a partir d'una sèrie de paràmetres i un model basat en la composició d'hexàmers (entrenats amb

seqüències de planàries completes validades experimentalment i anotades a GenBank), permet corregir errors en els CDS predits evitant, per exemple, els codons d'aturada prematurs.

Els *contigs* obtinguts han estat anotats amb NCBI-BLAST (Altschul *et al.*, 1990, 1997; Johnson *et al.*, 2008) utilitzant les dades disponibles per planàries. Concretament s'ha considerat les anotacions del transcriptoma SmesGene versió v2 (Grohme *et al.*, 2018) i Dresden versió v6 (Rozanski *et al.*, 2019), que es van obtenir amb AUGUSTUS i Trinity respectivament. Finalment, els *contigs* han estat projectats també sobre el genoma de referència emprant l'eina GMAP (Wu i Watanabe, 2005), per poder visualitzar els transcrits assemblats amb un navegador genòmic basat en JBrowse (Buels *et al.*, 2016).

Anàlisi d'expressió diferencial

La quantificació dels *contigs* sobre el transcriptoma es fa utilitzant Salmon (Patro *et al.*, 2017). Les anàlisis d'expressió diferencial es duen a terme amb les funcions específiques del paquet limma (Ritchie *et al.*, 2015). Per normalitzar les dades s'utilitza el filtre voom, inclòs en el paquet anteriorment esmentat (Law *et al.*, 2014). Per a la representació gràfica de les dades s'utilitzen les llibreries ggplot2 (Wickham, 2016), EnhancedVolcano (Blighe, Rana i Lewis, 2020), pheatmap (Kolde, 2019) i venn.diagram (Chen, 2018).

Bibliografia

Abeloos, M. (1929) *Recherches expérimentales sur la croissance et la régénération chez les planaires*, *Bull. Biol. Paris*.

Abril, J. F. *et al.* (2010) «Smed454 dataset: Unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea*», *BMC Genomics*, 11(1), p. 731. doi: 10.1186/1471-2164-11-731.

Accili, D. i Arden, K. C. (2004) «FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation», *Cell*. Elsevier B.V., p. 421-426. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00452-0.

Adamidi, C. *et al.* (2011) «De novo assembly and validation of planaria transcriptome by massive parallel sequencing and shotgun proteomics», *Genome Research*, 21(7), p. 1193-1200. doi: 10.1101/gr.113779.110.

Adell, T. *et al.* (2018) «Immunohistochemistry on paraffin-embedded planarian tissue sections», en *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., p. 367-378. doi: 10.1007/978-1-4939-7802-1_11.

Albert, P. S., Brown, S. J. i Riddle, D. L. (1981) «Sensory control of dauer larva formation in *Caenorhabditis elegans*», *Journal of Comparative Neurology*, 198(3), p. 435-451. doi: 10.1002/cne.901980305.

Alessi, D. R. *et al.* (1997) «Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α », *Current Biology*, 7(4), p. 261-269. doi: 10.1016/s0960-9822(06)00122-9.

Alexa, A. i Rahnenfuhrer, J. (2021) «topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology».

Alexander, C. *et al.* (2000) «OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28», *Nature Genetics*, 26(2), p. 211-215. doi: 10.1038/79944.

Allen, G. D. (1919) «Quantitative studies on the rate of respiratory metabolism in planaria», *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 49(3), p. 420-473. doi: 10.1152/ajplegacy.1919.49.3.420.

Almuedo-Castillo, M. *et al.* (2014) «JNK Controls the Onset of Mitosis in Planarian Stem Cells and Triggers Apoptotic Cell Death Required for

- Regeneration and Remodeling», *PLoS Genetics*, 10(6). doi: 10.1371/journal.pgen.1004400.
- Altschul, S. F. *et al.* (1990) «Basic local alignment search tool», *Journal of Molecular Biology*, 215(3), p. 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Altschul, S. F. *et al.* (1997) «Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs», *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, p. 3389-3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
- Alvarado, A. S. i Newmark, P. A. (1999) «Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), p. 5049-5054. doi: 10.1073/pnas.96.9.5049.
- Anderson, M. J. *et al.* (1998) «Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily», *Genomics*, 47(2), p. 187-199. doi: 10.1006/geno.1997.5122.
- Aoyama, Y. i Motokawa, Y. (1981) «L-Threonine dehydrogenase of chicken liver. Purification, characterization, and physiological significance.», *The Journal of biological chemistry*, 256(23), p. 12367-12373.
- Aragona, M. *et al.* (2013) «A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors», *Cell*, 154(5), p. 1047-1059. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.042.
- Ashkenazi, A. i Dixit, V. M. (1998) «Death receptors: Signaling and modulation», *Science*. American Association for the Advancement of Science, p. 1305-1308. doi: 10.1126/science.281.5381.1305.
- Auladell, C., Garcia-Valero, J. i Baguñà, J. (1993) «Ultrastructural localization of RNA in the chromatoid bodies of undifferentiated cells (neoblasts) in planarians by the RNase-gold complex technique», *Journal of Morphology*, 216(3), p. 319-326. doi: 10.1002/jmor.1052160307.
- Auten, R. L., Whorton, M. H. i Mason, S. N. (2002) «Blocking neutrophil influx reduces DNA damage in hyperoxia-exposed newborn rat lung», *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(4), p. 391-397. doi: 10.1165/ajrcmb.26.4.4708.
- Aylon, Y. i Oren, M. (2016) «The Hippo pathway, p53 and cholesterol», *Cell Cycle*, 15(17), p. 2248-2255. doi: 10.1080/15384101.2016.1207840.
- Baguna, J. *et al.* (1988) «Cellular, molecular and genetic approaches to regeneration and pattern formation in planarians», *Fortschr. Zool.*, 36, p. 65-78.
- Baguñà, J. (1976) «Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. I. Mitotic studies during growth, feeding and starvation», *Journal of Experimental Zoology*, 195(1), p. 53-64. doi: 10.1002/jez.1401950106.

- Baguñà, J. *et al.* (1990) «Growth, Degrowth and Regeneration as Developmental Phenomena in Adult Freshwater Planarians», en *Experimental Embryology in Aquatic Plants and Animals*. Springer, Boston, MA, p. 129-162. doi: 10.1007/978-1-4615-3830-1_7.
- Baguñà, J. i Riutort, M. (2004) «Molecular phylogeny of the Platyhelminthes», *Canadian Journal of Zoology*, 82(2), p. 168-193. doi: 10.1139/z03-214.
- Baguñà, J., Saló, E. i 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(1), p. 77-86.
- Benda, C. (1898) «Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertbraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien», *Archiv für Anatomie und Physiologie*, 73, p. 393-398.
- Birnbaum, A. *et al.* (2019) «Age-dependent changes in transcription factor FoxO targeting in female *Drosophila*», *Frontiers in Genetics*, 10(MAY), p. 312. doi: 10.3389/fgene.2019.00312.
- Bleazard, W. *et al.* (1999) «The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast», *Nature Cell Biology*, 1(5), p. 298-304. doi: 10.1038/13014.
- Blighe, K., Rana, S. i Lewis, M. (2020) «EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling».
- Blythe, M. J. *et al.* (2010) «A dual platform approach to transcript discovery for the planarian *Schmidtea mediterranea* to establish RNAseq for stem cell and regeneration biology», *PLoS ONE*, 5(12), p. 15617. doi: 10.1371/journal.pone.0015617.
- Bo, H., Zhang, Y. i Ji, L. L. (2010) «Redefining the role of mitochondria in exercise: A dynamic remodeling», en *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc., p. 121-128. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05618.x.
- Bocitto, M. i G. Kalb, R. (2011) «Regulation of Foxo-Dependent Transcription by Post-Translational Modifications», *Current Drug Targets*, 12(9), p. 1303-1310. doi: 10.2174/138945011796150316.
- Borkhardt, A. *et al.* (1997) «Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;1)(q13;q23)», *Oncogene*, 14(2), p. 195-202. doi: 10.1038/sj.onc.1200814.
- Boveris, A. (1977) «Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide.», *Advances in experimental medicine and biology*. Springer, Boston, MA, p. 67-82. doi: 10.1007/978-1-4615-9035-4_5.
- Brandl, H. *et al.* (2016) «PlanMine - A mineable resource of planarian biology and biodiversity», *Nucleic Acids Research*, 44(D1), p. D764-D773. doi: 10.1093/nar/gkv1148.

- Brøndsted, A. i Brøndsted, H. V. (1961) «Influence of Temperature on Rate of Regeneration in the Time-graded Regeneration Field in Planarians», *Development*, 9(1), p. 159-166. doi: 10.1242/dev.9.1.159.
- Buels, R. *et al.* (2016) «JBrowse: A dynamic web platform for genome visualization and analysis», *Genome Biology*, 17(1), p. 1-12. doi: 10.1186/s13059-016-0924-1.
- Burgering, B. M. T. i Medema, R. H. (2003) «Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty», *Journal of Leukocyte Biology*, 73(6), p. 689-701. doi: 10.1189/jlb.1202629.
- Cao, X. *et al.* (2021) «Regulation and functions of the Hippo pathway in stemness and differentiation», *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. Oxford Academic, p. 736-748. doi: 10.1093/ABBS/GMAA048.
- Castillo-Lara, S. i Abril, J. F. (2018) «PlanNET: homology-based predicted interactome for multiple planarian transcriptomes», *Bioinformatics*. Editat per J. Kelso, 34(6), p. 1016-1023. doi: 10.1093/bioinformatics/btx738.
- Castillo-Lara, S., Pascual-Carreras, E. i Abril, J. F. (2019) «PlanExp: intuitive integration of complex RNA-seq datasets with planarian omics resources», *Bioinformatics*. Editat per J. Wren, 36(6), p. 1889-1895. doi: 10.1093/bioinformatics/btz802.
- Cebrià, F. *et al.* (1997) «Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian *Girardia tigrina*», *Development Genes and Evolution* 1997 207:5, 207(5), p. 306-316. doi: 10.1007/S004270050118.
- Cebrià, F. *et al.* (2002) «The expression of neural-specific genes reveals the structural and molecular complexity of the planarian central nervous system», *Mechanisms of Development*, 116(1-2), p. 199-204. doi: 10.1016/S0925-4773(02)00134-X.
- Cebrià, F. (2016) «Planarian Body-Wall Muscle: Regeneration and Function beyond a Simple Skeletal Support», *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(FEB), p. 8. doi: 10.3389/fcell.2016.00008.
- Cebrià, F. i 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(16), p. 3691-3703. doi: 10.1242/dev.01941.
- Cervený, K. L. i Jensen, R. E. (2003) «The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria», *Molecular Biology of the Cell*, 14(10), p. 4126-4139. doi: 10.1091/mbc.E03-02-0092.
- Chaanine, A. H. *et al.* (2012) «JNK modulates FOXO3a for the expression of the mitochondrial death and mitophagy marker BNIP3 in pathological hypertrophy and in heart failure», *Cell Death and Disease*, 3(2), p. 265. doi: 10.1038/cddis.2012.5.

- Chadwick, S. R. *et al.* (2020) «A functional unfolded protein response is required for chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*», *Current Genetics*, 66(1), p. 263-277. doi: 10.1007/s00294-019-01019-0.
- Chen, H. (2018) «VennDiagram: Generate High-Resolution Venn and Euler Plots».
- Chen, Q. *et al.* (1995) «Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), p. 4337-4341. doi: 10.1073/pnas.92.10.4337.
- Cheng, L. C. *et al.* (2018) «Cellular, ultrastructural and molecular analyses of epidermal cell development in the planarian *Schmidtea mediterranea*», *Developmental Biology*, 433(2), p. 357-373. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.08.030.
- Child, C. M. (1911) «A study of senescence and rejuvenescence based on experiments with *Planaria dorotocephala*», *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 31(4), p. 537-616. doi: 10.1007/BF02162177.
- Clark, K. *et al.* (2016) «GenBank», *Nucleic Acids Research*, 44(D1), p. D67-D72. doi: 10.1093/nar/gkv1276.
- Clark, K. L. *et al.* (1993) «Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5», *Nature*, 364(6436), p. 412-420. doi: 10.1038/364412a0.
- Cogliati, S. *et al.* (2013) «Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency», *Cell*, 155(1), p. 160-171. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.032.
- Collins, T. J. *et al.* (2002) «Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells», *EMBO Journal*, 21(7), p. 1616-1627. doi: 10.1093/emboj/21.7.1616.
- Cox, A. G. *et al.* (2016) «Yap reprograms glutamine metabolism to increase nucleotide biosynthesis and enable liver growth», *Nature Cell Biology*, 18(8), p. 886-896. doi: 10.1038/ncb3389.
- Currie, K. W. *et al.* (2016) «HOX gene complement and expression in the planarian *Schmidtea mediterranea*», *EvoDevo*, 7(1), p. 7. doi: 10.1186/s13227-016-0044-8.
- Dalle Pezze, P. *et al.* (2014) «Dynamic Modelling of Pathways to Cellular Senescence Reveals Strategies for Targeted Interventions», *PLoS Computational Biology*, 10(8). doi: 10.1371/journal.pcbi.1003728.
- Dalyell, J. G. (1814) *Observations on some interesting phenomena in animal physiology, exhibited by several species of Planariae: illustrated by coloured figures of living animals / by John Graham Dalyell*. Edinburgh: Archibald Constable,. doi: 10.5962/bhl.title.10135.

- Deng, H. *et al.* (2015) «Spectrin regulates Hippo signaling by modulating cortical actomyosin activity», *eLife*, 2015(4). doi: 10.7554/eLife.06567.
- Deng, Q. *et al.* (2016) «Cross-talk between mitochondrial fusion and the Hippo pathway in controlling cell proliferation during *Drosophila* development», *Genetics*, 203(4), p. 1777-1788. doi: 10.1534/genetics.115.186445.
- deRan, M. *et al.* (2014) «Energy stress regulates Hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiotensin-like 1 protein», *Cell Reports*, 9(2), p. 495-503. doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.036.
- Divakaruni, A. S. *et al.* (2014) «Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data», en *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., p. 309-354. doi: 10.1016/B978-0-12-801415-8.00016-3.
- Dohm, J. C. *et al.* (2008) «Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing», *Nucleic Acids Research*, 36(16). doi: 10.1093/nar/gkn425.
- Eisenhoffer, G. T., Kang, H. i Alvarado, A. S. (2008) «Molecular Analysis of Stem Cells and Their Descendants during Cell Turnover and Regeneration in the Planarian *Schmidtea mediterranea*», *Cell Stem Cell*, 3(3), p. 327-339. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.002.
- Elliott, S. A. i Sánchez Alvarado, A. (2013) «The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration», *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, p. 301-326. doi: 10.1002/wdev.82.
- Eura, Y. *et al.* (2003) «Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion», *Journal of Biochemistry*, 134(3), p. 333-344. doi: 10.1093/jb/mvg150.
- Falk, M. J. *et al.* (2008) «Metabolic pathway profiling of mitochondrial respiratory chain mutants in *C. elegans*», *Molecular Genetics and Metabolism*, 93(4), p. 388-397. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.11.007.
- Fan, X., Hussien, R. i Brooks, G. A. (2010) «H₂O₂-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes», *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), p. 1646-1654. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.024.
- Fedurco, M. *et al.* (2006) «BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies», *Nucleic Acids Research*, 34(3), p. e22-e22. doi: 10.1093/nar/gnj023.
- Fincher, C. T. *et al.* (2018) «Cell type transcriptome atlas for the planarian *Schmidtea mediterranea*», *Science*, 360(6391). doi: 10.1126/science.aaq1736.
- Fletcher, G. C. *et al.* (2015) «The Spectrin cytoskeleton regulates the Hippo signalling pathway», *The EMBO Journal*, 34(7), p. 940-954. doi: 10.15252/embj.201489642.

- Folmes, C. D. L. *et al.* (2011) «Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming», *Cell Metabolism*, 14(2), p. 264-271. doi: 10.1016/j.cmet.2011.06.011.
- Footz, T. K. *et al.* (2001) «Analysis of the cat eye syndrome critical region in humans and the region of conserved synteny in mice: A search for candidate genes at or near the human chromosome 22 pericentromere», *Genome Research*, 11(6), p. 1053-1070. doi: 10.1101/gr.154901.
- Forsthoefel, D. J. *et al.* (2018) «Fixation, processing, and immunofluorescent labeling of whole mount planarians», en *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., p. 353-366. doi: 10.1007/978-1-4939-7802-1_10.
- Frank, S. *et al.* (2001) «The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis», *Developmental Cell*, 1(4), p. 515-525. doi: 10.1016/S1534-5807(01)00055-7.
- Fuchs, S. *et al.* (2010) «A metabolic signature of long life in *Caenorhabditis elegans*», *BMC Biology*, 8(1), p. 14. doi: 10.1186/1741-7007-8-14.
- Galli, G. G. *et al.* (2015) «YAP Drives Growth by Controlling Transcriptional Pause Release from Dynamic Enhancers», *Molecular Cell*, 60(2), p. 328-337. doi: 10.1016/j.molcel.2015.09.001.
- Gauron, C. *et al.* (2013) «Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed», *Scientific Reports*, 3. doi: 10.1038/srep02084.
- Geng, C. *et al.* (2016) «Mst1 regulates hepatic lipid metabolism by inhibiting Sirt1 ubiquitination in mice», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 471(4), p. 444-449. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.02.059.
- Geng, J. *et al.* (2015) «Kinases Mst1 and Mst2 positively regulate phagocytic induction of reactive oxygen species and bactericidal activity», *Nature Immunology*, 16(11), p. 1142-1152. doi: 10.1038/ni.3268.
- Ghosh-Choudhary, S., Liu, J. i Finkel, T. (2020) «Metabolic Regulation of Cell Fate and Function», *Trends in Cell Biology*. Elsevier, p. 201-212. doi: 10.1016/j.tcb.2019.12.005.
- Gilley, J., Coffer, P. J. i Ham, J. (2003) «FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons», *Journal of Cell Biology*, 162(4), p. 613-622. doi: 10.1083/jcb.200303026.
- González-Estévez, C. *et al.* (2007) «Gtdap-1 promotes autophagy and is required for planarian remodeling during regeneration and starvation.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), p. 13373-13378. doi: 10.1073/pnas.0703588104.
- González-Estévez, C. *et al.* (2012) «Decreased neoblast progeny and increased cell death during starvation-induced planarian degrowth», *International Journal of Developmental Biology*, 56(1-3), p. 83-91. doi: 10.1387/ijdb.113452cg.

- González-Quiroz, M. *et al.* (2018) «Homeostatic interplay between FoxO proteins and ER proteostasis in cancer and other diseases», *Seminars in Cancer Biology*. Semin Cancer Biol, p. 42-52. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.01.011.
- Greer, E. L. i Brunet, A. (2005) «FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression», *Oncogene*. Oncogene, p. 7410-7425. doi: 10.1038/sj.onc.1209086.
- Grohme, M. A. *et al.* (2018) «The genome of *Schmidtea mediterranea* and the evolution of core cellular mechanisms», *Nature*, 554(7690), p. 56-61. doi: 10.1038/nature25473.
- Guarente, L. i Kenyon, C. (2000) «Genetic pathways that regulate ageing in model organisms», *Nature*. Nature Publishing Group, p. 255-262. doi: 10.1038/35041700.
- Gutiérrez-Gutiérrez, Ó. *et al.* (2021) «Regeneration in starved planarians depends on TRiC/CCT subunits modulating the unfolded protein response», *EMBO reports*, 22(8), p. e52905. doi: 10.15252/embr.202152905.
- Halder, G. i Johnson, R. L. (2011) «Hippo signaling: Growth control and beyond», *Development*. The Company of Biologists, p. 9-22. doi: 10.1242/dev.045500.
- Hales, K. G. i Fuller, M. T. (1997) «Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase», *Cell*, 90(1), p. 121-129. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80319-0.
- Halestrap, A. P. *et al.* (1998) «Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart», *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1366(1-2), p. 79-94. doi: 10.1016/S0005-2728(98)00122-4.
- Harismendy, O. *et al.* (2009) «Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies», *Genome Biology*, 10(3), p. 32. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r32.
- Helston, O. i Amaya, E. (2021) «Reactive oxygen species during heart regeneration in zebrafish: Lessons for future clinical therapies», *Wound Repair and Regeneration*, 29(2), p. 211-224. doi: 10.1111/wrr.12892.
- Henderson, S. T. i Johnson, T. E. (2001) «daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*», *Current Biology*, 11(24), p. 1975-1980. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00594-2.
- Honda, Y. i Honda, S. (1999) «The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*.», *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(11), p. 1385-1393.

- Hoppins, S., Lackner, L. i Nunnari, J. (2007) «The machines that divide and fuse mitochondria», *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews, p. 751-780. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.071905.090048.
- Hu, Y. *et al.* (2017) «YAP suppresses gluconeogenic gene expression through PGC1 α », *Hepatology*, 66(6), p. 2029-2041. doi: 10.1002/hep.29373.
- Huang, J. *et al.* (2005) «The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila homolog of YAP», *Cell*, 122(3), p. 421-434. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.007.
- Huang, S. *et al.* (2018) «Yap regulates mitochondrial structural remodeling during myoblast differentiation», *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 315(4), p. C474-C484. doi: 10.1152/ajpcell.00112.2018.
- Hunter, D. R., Haworth, R. A. i Southard, A. H. (1976) *Relationship between Configuration, Function, and Permeability in Calcium-treated Mitochondria*"" , *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*.
- Hyman, L. H. (1919) «Physiological studies on planaria», *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 49(3), p. 377-402. doi: 10.1152/ajplegacy.1919.49.3.377.
- Hyman, L. H. (1951) «North American Triclad Turbellaria. XII. Synopsis of the Known Species of Fresh-Water Planarians of North America», *Transactions of the American Microscopical Society*, 70(2), p. 154. doi: 10.2307/3223427.
- Ichim, G. i Tait, S. W. G. (2016) «A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process», *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, p. 539-548. doi: 10.1038/nrc.2016.58.
- Iglesias, M. *et al.* (2019) «Downregulation of mTOR Signaling Increases Stem Cell Population Telomere Length during Starvation of Immortal Planarians», *Stem Cell Reports*, 13(2), p. 405-418. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.06.005.
- Igney, F. H. i Krammer, P. H. (2002) «Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis», *Nature Reviews Cancer*. European Association for Cardio-Thoracic Surgery, p. 277-288. doi: 10.1038/nrc776.
- Iseli, C., Jongeneel, C. V i Bucher, P. (1999) «ESTScan: a program for detecting, evaluating, and reconstructing potential coding regions in EST sequences.», *Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, p. 138-148.
- Ito, Kyoko i Ito, Keisuke (2016) «Metabolism and the Control of Cell Fate Decisions and Stem Cell Renewal», *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32(1), p. annurev-cellbio-111315-125134. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125134.
- Jacobs, F. M. J. *et al.* (2003) «FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics», *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), p. 35959-35967. doi: 10.1074/jbc.M302804200.

- Jaenen, V. *et al.* (2021) «Reactive oxygen species rescue regeneration after silencing the MAPK–ERK signaling pathway in *Schmidtea mediterranea*», *Scientific Reports*, 11(1), p. 881. doi: 10.1038/s41598-020-79588-1.
- Jagani, Z., Singh, A. i Khosravi-Far, R. (2008) «FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: A matter of evasion of apoptosis», *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier, p. 63-84. doi: 10.1016/j.bbcan.2007.10.003.
- Jia, K., Chen, D. i Riddle, D. L. (2004) «The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span», *Development*, 131(16), p. 3897-3906. doi: 10.1242/dev.01255.
- Johnson, M. *et al.* (2008) «NCBI BLAST: a better web interface.», *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue). doi: 10.1093/nar/gkn201.
- Johnson, T. E., Lithgow, G. J. i Murakami, S. (1996) «Interventions that increase the response to stress offer the potential for effective life prolongation and increased health», *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 51(6), p. 392-395. doi: 10.1093/gerona/51A.6.B392.
- Joven, A., Elewa, A. i Simon, A. (2019) «Model systems for regeneration: Salamanders», *Development (Cambridge)*, 146(14). doi: 10.1242/dev.167700.
- Jünger, M. A. *et al.* (2003) «The *Drosophila* Forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling», *Journal of Biology*, 2(3), p. 20. doi: 10.1186/1475-4924-2-20.
- Kaestner, K. H., Knöchel, W. i Martínez, D. E. (2000) «Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors», *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 142-146. doi: 10.1101/gad.14.2.142.
- Kao, D., Felix, D. i Aboobaker, A. (2013) «The planarian regeneration transcriptome reveals a shared but temporally shifted regulatory program between opposing head and tail scenarios», *BMC Genomics*, 14(1), p. 1-17. doi: 10.1186/1471-2164-14-797.
- Karbowski, M. *et al.* (2002) «Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis», *Journal of Cell Biology*, 159(6), p. 931-938. doi: 10.1083/jcb.200209124.
- Kattoor, A. J. *et al.* (2017) «Oxidative Stress in Atherosclerosis», *Current Atherosclerosis Reports*. Current Medicine Group LLC 1. doi: 10.1007/s11883-017-0678-6.
- Kelleher, P. *et al.* (2018) «Identification of DNA base modifications by means of pacific biosciences RS sequencing technology», en *Methods in Molecular Biology*. Methods Mol Biol, p. 127-137. doi: 10.1007/978-1-4939-7343-9_10.
- Kikuno, N. *et al.* (2007) «Knockdown of astrocyte-elevated gene-1 inhibits prostate cancer progression through upregulation of FOXO3a activity», *Oncogene*, 26(55), p. 7647-7655. doi: 10.1038/sj.onc.1210572.

- Kim, N. G. i Gumbiner, B. M. (2015) «Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway», *Journal of Cell Biology*, 210(3), p. 503-515. doi: 10.1083/jcb.201501025.
- King, R. S. i Newmark, P. A. (2012) «The cell biology of regeneration», *Journal of Cell Biology*, 196(5), p. 553-562. doi: 10.1083/jcb.201105099.
- Kirkwood, T. B. L. i Austad, S. N. (2000) «Why do we age?», *Nature*. *Nature*, p. 233-238. doi: 10.1038/35041682.
- Kolde, R. (2019) «Pheatmap: pretty heatmaps».
- Koontz, L. M. *et al.* (2013) «The Hippo Effector Yorkie Controls Normal Tissue Growth by Antagonizing Scalloped-Mediated Default Repression», *Developmental Cell*, 25(4), p. 388-401. doi: 10.1016/j.devcel.2013.04.021.
- Kops, G. J. P. L. *et al.* (2002) «Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress», *Nature*, 419(6904), p. 316-321. doi: 10.1038/nature01036.
- Kremer, J. R., Mastronarde, D. N. i McIntosh, J. R. (1996) «Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD», *Journal of Structural Biology*, 116(1), p. 71-76. doi: 10.1006/jsbi.1996.0013.
- Kurreck, J. (2009) «RNA interference: From basic research to therapeutic applications», *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(8), p. 1378-1398. doi: 10.1002/anie.200802092.
- de la Rubia, I. *et al.* (2020) «Reference-free reconstruction and quantification of transcriptomes from Nanopore long-read sequencing», *bioRxiv*. doi: 10.1101/2020.02.08.939942.
- Labbé, R. M. *et al.* (2012) «A Comparative transcriptomic analysis reveals conserved features of stem cell pluripotency in planarians and mammals», *Stem Cells*, 30(8), p. 1734-1745. doi: 10.1002/stem.1144.
- Labrousse, A. M. *et al.* (1999) «C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane», *Molecular Cell*, 4(5), p. 815-826. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80391-3.
- Lander, E. S. *et al.* (2001) «Initial sequencing and analysis of the human genome», *Nature*, 409(6822), p. 860-921. doi: 10.1038/35057062.
- Lang, D. *et al.* (2021) «Comparison of the two up-to-date sequencing technologies for genome assembly: HiFi reads of Pacific Biosciences Sequel II system and ultralong reads of Oxford Nanopore», *GigaScience*, 9(12), p. 1-7. doi: 10.1093/gigascience/giaa123.
- Lapan, S. W. i Reddien, P. W. (2011) «Dlx and sp6-9 control optic cup regeneration in a prototypic eye», *PLoS Genetics*, 7(8), p. e1002226. doi: 10.1371/journal.pgen.1002226.
- Lapan, S. W. i Reddien, P. W. (2012) «Transcriptome Analysis of the Planarian

Eye Identifies ovo as a Specific Regulator of Eye Regeneration», *Cell Reports*, 2(2), p. 294-307. doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.018.

Law, C. W. *et al.* (2014) «Voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts», *Genome Biology*, 15(2), p. 29. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r29.

Lee, S. *et al.* (2014) «Human mitochondrial Fis1 links to cell cycle regulators at G2/M transition», *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer, p. 711-725. doi: 10.1007/s00018-013-1428-8.

Lee, Y. J. *et al.* (2004) «Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, Opa1 in apoptosis», *Molecular Biology of the Cell*, 15(11), p. 5001-5011. doi: 10.1091/mbc.E04-04-0294.

Lehtinen, M. K. *et al.* (2006) «A Conserved MST-FOXO Signaling Pathway Mediates Oxidative-Stress Responses and Extends Life Span», *Cell*, 125(5), p. 987-1001. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.046.

Lennicke, C. *et al.* (2015) «Hydrogen peroxide - Production, fate and role in redox signaling of tumor cells», *Cell Communication and Signaling*. BioMed Central Ltd. doi: 10.1186/s12964-015-0118-6.

Lentz, T. L. (1967) «Rhabdite formation in planaria: The role of microtubules», *Journal of Ultrastructure Research*, 17(1-2), p. 114-126. doi: 10.1016/S0022-5320(67)80024-8.

Li, S. T. *et al.* (2019) «DAF-16 stabilizes the aging transcriptome and is activated in mid-aged *Caenorhabditis elegans* to cope with internal stress», *Aging Cell*, 18(3). doi: 10.1111/accel.12896.

Lin, A. Y. T. i Pearson, B. J. (2014) «Planarian yorkie/YAP functions to integrate adult stem cell proliferation, organ homeostasis and maintenance of axial patterning», *Development*, 141(6), p. 1197-1208. doi: 10.1242/dev.101915.

Lin, K. *et al.* (1997) «daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*», *Science*, 278(5341), p. 1319-1322. doi: 10.1126/science.278.5341.1319.

Liu, C. Y. *et al.* (2010) «The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF β -TrCP E3 ligase», *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), p. 37159-37169. doi: 10.1074/jbc.M110.152942.

Liu, Q. *et al.* (2019) «Detection of DNA base modifications by deep recurrent neural network on Oxford Nanopore sequencing data», *Nature Communications*, 10(1), p. 1-11. doi: 10.1038/s41467-019-10168-2.

Liu, Y. i Shi, Y. (2020) «Mitochondria as a target in cancer treatment», *MedComm*, 1(2), p. 129-139. doi: 10.1002/mco2.16.

Liu, Z. *et al.* (2017) «Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From

Molecular Mechanisms to Clinical Applications», *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited. doi: 10.1155/2017/2525967.

Lopez-Mejia, I. C. i Fajas, L. (2015) «Cell cycle regulation of mitochondrial function», *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, p. 19-25. doi: 10.1016/j.ceb.2014.10.006.

Lottaz, C. *et al.* (2003) «Modeling sequencing errors by combining Hidden Markov models», en *Bioinformatics*. Bioinformatics. doi: 10.1093/bioinformatics/btg1067.

Love, M. I., Huber, W. i Anders, S. (2014) «Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2», *Genome Biology*, 15(12), p. 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

Love, N. R. *et al.* (2013) «Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration», *Nature Cell Biology*, 15(2), p. 222-228. doi: 10.1038/ncb2659.

Lovell, M. A., D'Cruz, C. M. i Barr, F. G. (1994) «Fusion of PAX7 to FKHR by the Variant t(1;13)(p36;q14) Translocation in Alveolar Rhabdomyosarcoma», *Cancer Research*, 54(11), p. 2869-2872.

Lu, T. i Finkel, T. (2008) «Free radicals and senescence», *Experimental Cell Research*. Exp Cell Res, p. 1918-1922. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.01.011.

Lucila Scimone, M., Cote, L. E. i Reddien, P. W. (2017) «Orthogonal muscle fibres have different instructive roles in planarian regeneration», *Nature*, 551(7682), p. 623-628. doi: 10.1038/nature24660.

Madden, E. *et al.* (2019) «The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance», *Biology of the Cell*. Biol Cell, p. 1-17. doi: 10.1111/boc.201800050.

Mai, S. *et al.* (2010) «Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1», *Journal of Cell Science*, 123(6), p. 917-926. doi: 10.1242/jcs.059246.

Mancuso, G. *et al.* (2012) «Alternative splicing of Spg7, a gene involved in hereditary spastic paraplegia, encodes a variant of paraplegin targeted to the endoplasmic reticulum», *PLoS ONE*, 7(5), p. e36337. doi: 10.1371/journal.pone.0036337.

Margulies, M. *et al.* (2005) «Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors», *Nature*, 437(7057), p. 376-380. doi: 10.1038/nature03959.

Marques, I. J., Lupi, E. i Mercader, N. (2019) «Model systems for regeneration: Zebrafish», *Development (Cambridge)*, 146(18). doi: 10.1242/dev.167692.

Mastrorarde, D. N. i Held, S. R. (2017) «Automated tilt series alignment and

tomographic reconstruction in IMOD», *Journal of Structural Biology*, 197(2), p. 102-113. doi: 10.1016/j.jsb.2016.07.011.

Matsuzaki, H. *et al.* (2003) «Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), p. 11285-11290. doi: 10.1073/pnas.1934283100.

McCue, M. D. (2013) *Comparative physiology of fasting, starvation, and food limitation, Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-29056-5.

McKanna, J. A. (1968) «Fine structure of the protonephridial system in planaria - I. Flame cells», *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 92(4), p. 509-523. doi: 10.1007/BF00336662.

Di Micco, R. *et al.* (2021) «Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, p. 75-95. doi: 10.1038/s41580-020-00314-w.

Mitra, K. *et al.* (2009) «A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(29), p. 11960-5. doi: 10.1073/pnas.0904875106.

Mo, J. S. *et al.* (2015) «Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway», *Nature Cell Biology*, 17(4), p. 500-510. doi: 10.1038/ncb3111.

Modur, V. *et al.* (2002) «FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression: Implications for PTEN mutation in prostate cancer», *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), p. 47928-47937. doi: 10.1074/jbc.M207509200.

Mohamed Haroon, M. *et al.* (2021) «Mitochondrial state determines functionally divergent stem cell population in planaria», *Stem Cell Reports*. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.03.022.

Molinaro, A. M. i Pearson, B. J. (2016) «In silico lineage tracing through single cell transcriptomics identifies a neural stem cell population in planarians», *Genome Biology*, 17(1), p. 87. doi: 10.1186/s13059-016-0937-9.

Morgan, T. H. (1898) «Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*», *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 7(2-3), p. 364-397. doi: 10.1007/BF02161491.

Mozdy, A. D., McCaffery, J. M. i Shaw, J. M. (2000) «Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p», *Journal of Cell Biology*, 151(2), p. 367-379. doi: 10.1083/jcb.151.2.367.

Mungrue, I. N. *et al.* (2009) «CHAC1/MGC4504 Is a Novel Proapoptotic

Component of the Unfolded Protein Response, Downstream of the ATF4-ATF3-CHOP Cascade», *The Journal of Immunology*, 182(1), p. 466-476. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.466.

Nagaraj, R. *et al.* (2012) «Control of mitochondrial structure and function by the Yorkie/YAP oncogenic pathway», *Genes and Development*, 26(18), p. 2027-2037. doi: 10.1101/gad.183061.111.

Nakamura, K. *et al.* (2011) «Sequence-specific error profile of Illumina sequencers», *Nucleic Acids Research*, 39(13), p. e90-e90. doi: 10.1093/nar/gkr344.

Ni, L. *et al.* (2013) «Structural basis for autoactivation of human Mst2 kinase and its regulation by RASSF5», *Structure*, 21(10), p. 1757-1768. doi: 10.1016/j.str.2013.07.008.

Ni, L. *et al.* (2015) «Structural basis for Mob1-dependent activation of the core Mst-Lats kinase cascade in Hippo signaling», *Genes and Development*, 29(13), p. 1416-1431. doi: 10.1101/gad.264929.115.

Nyrén, P. i Lundin, A. (1985) «Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis», *Analytical Biochemistry*, 151(2), p. 504-509. doi: 10.1016/0003-2697(85)90211-8.

Oh, H. *et al.* (2013) «Genome-wide Association of Yorkie with Chromatin and Chromatin-Remodeling Complexes», *Cell Reports*, 3(2), p. 309-318. doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.008.

Osuma, E. A. *et al.* (2018) «High throughput measurement of metabolism in planarians reveals activation of glycolysis during regeneration», *Regeneration*, 5(1), p. 78-86. doi: 10.1002/reg2.95.

Oviedo, N. J. *et al.* (2008) «Planarian PTEN homologs regulate stem cells and regeneration through TOR signaling», *DMM Disease Models and Mechanisms*, 1(2-3), p. 131-143. doi: 10.1242/dmm.000117.

Owlarn, S. *et al.* (2017) «Generic wound signals initiate regeneration in missing-tissue contexts», *Nature Communications*, 8(1), p. 1-13. doi: 10.1038/s41467-017-02338-x.

Palladini, G. *et al.* (1979) «The pigmentary system of planaria - I. Morphology», *Cell and Tissue Research*, 199(2), p. 197-202. doi: 10.1007/BF00236131.

Pan, Y. *et al.* (2016) «Differential growth triggers mechanical feedback that elevates Hippo signaling», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(45), p. E6974-E6983. doi: 10.1073/pnas.1615012113.

Papenberg, M. (2018) «minDiff: Minimize differences between groups».

Park, Y. Y. *et al.* (2010) «Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin

- 1», *Journal of Cell Science*, 123(4), p. 619-626. doi: 10.1242/jcs.061481.
- Pascual-Carreras, E. *et al.* (2020) «Genomic analyses reveal FoxG as an upstream regulator of wnt1 required for posterior identity specification in planarians», *bioRxiv*, p. 2020.12.08.416008. doi: 10.1101/2020.12.08.416008.
- Pascual-Carreras, Eudald *et al.* (2020) «Planarian cell number depends on blitzschnell, a novel gene family that balances cell proliferation and cell death», *Development (Cambridge)*, 147(7). doi: 10.1242/dev.184044.
- Pascual-Carreras, E. *et al.* (2021) «Analysis of Fox genes in *Schmidtea mediterranea* reveals new families and a conserved role of Smed-foxO in controlling cell death», *Scientific Reports*, 11(1), p. 2947. doi: 10.1038/s41598-020-80627-0.
- Passos, J. F. *et al.* (2010) «Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence», *Molecular Systems Biology*, 6(1), p. 347. doi: 10.1038/msb.2010.5.
- Patro, R. *et al.* (2017) «Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression», *Nature Methods*, 14(4), p. 417-419. doi: 10.1038/nmeth.4197.
- Paukov, V. S., Kazanskaya, T. A. i Frolov, V. A. (1971) «Quantitative analysis of some components of myocardial electron micrographs», *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 71(4), p. 469-472. doi: 10.1007/BF00808503.
- Pearson, B. J. *et al.* (2009) «Formaldehyde-based whole-mount in situ hybridization method for planarians», *Developmental Dynamics*, 238(2), p. 443-450. doi: 10.1002/dvdy.21849.
- Pedersen, K. J. (1956) «On the oxygen consumption of *Planaria vitta* during starvation, the early phase of regeneration and asexual reproduction», *Journal of Experimental Zoology*, 131(1), p. 123-135. doi: 10.1002/jez.1401310106.
- Peiris, T. H. *et al.* (2016) «The Akt signaling pathway is required for tissue maintenance and regeneration in planarians», *BMC Developmental Biology*, 16(1), p. 1-15. doi: 10.1186/s12861-016-0107-z.
- Pellettieri, J. *et al.* (2010) «Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration», *Developmental Biology*, 338(1), p. 76-85. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.09.015.
- Pelloquin, L. *et al.* (1998) «Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(3), p. 720-726. doi: 10.1006/bbrc.1998.9539.
- Peña-Blanco, A. *et al.* (2020) «Drp1 modulates mitochondrial stress responses to mitotic arrest», *Cell Death and Differentiation*, 27(9), p. 2620-2634. doi: 10.1038/s41418-020-0527-y.

- Perrigue, P. M. *et al.* (2015) «Planarians as a model of aging to study the interaction between stem cells and senescent cells in vivo», *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases*, 5(1), p. 30052. doi: 10.3402/pba.v5.30052.
- Petronilli, V. *et al.* (2001) «The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ», *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), p. 12030-12034. doi: 10.1074/jbc.M010604200.
- Pierson, T. M. *et al.* (2013) «Correction: Whole-Exome Sequencing Identifies Homozygous AFG3L2 Mutations in a Spastic Ataxia-Neuropathy Syndrome Linked to Mitochondrial m-AAA Proteases», *PLoS Genetics*, 9(2), p. 1002325. doi: 10.1371/annotation/273d7d98-3a1b-494b-839e-de31a0f33d28.
- Pirotte, N. *et al.* (2015) «Reactive oxygen species in planarian regeneration: An upstream necessity for correct patterning and brain formation», *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. doi: 10.1155/2015/392476.
- Plass, M. *et al.* (2018) «Cell type atlas and lineage tree of a whole complex animal by single-cell transcriptomics», *Science*, 360(6391). doi: 10.1126/science.aag1723.
- Praskova, M., Xia, F. i Avruch, J. (2008) «MOBK1A/MOBK1B Phosphorylation by MST1 and MST2 Inhibits Cell Proliferation», *Current Biology*, 18(5), p. 311-321. doi: 10.1016/j.cub.2008.02.006.
- Prieto, J. *et al.* (2016) «Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming», *Nature Communications*, 7. doi: 10.1038/ncomms11124.
- Puig, O. *et al.* (2003) «Control of cell number by Drosophila FOXO: Downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway», *Genes and Development*, 17(16), p. 2006-2020. doi: 10.1101/gad.1098703.
- Quental, S. *et al.* (2008) «Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community», *Molecular Genetics and Metabolism*, 94(2), p. 148-156. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.02.008.
- R Core Team (2020) «R: A language and environment for statistical computing.»
- Rai, P. *et al.* (2009) «Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(1), p. 169-174. doi: 10.1073/pnas.0809834106.
- Randolph, H. (1892) «The regeneration of the tail in lumbriculus», *Journal of Morphology*, 7(3), p. 317-344. doi: 10.1002/jmor.1050070304.
- Randolph, H. (1897) «Observations and experiments on regeneration in Planarians», *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 5(2), p. 352-372. doi: 10.1007/BF02162271.

- Rapaport, D. *et al.* (1998) «Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*», *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), p. 20150-20155. doi: 10.1074/jbc.273.32.20150.
- Rasola, A. i Bernardi, P. (2011) «Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis», *Cell Calcium*. Elsevier Ltd, p. 222-233. doi: 10.1016/j.ceca.2011.04.007.
- Reddien, P. W. *et al.* (2005) «Developmental biology: SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells», *Science*, 310(5752), p. 1327-1330. doi: 10.1126/science.1116110.
- Resch, A. M. *et al.* (2012) «Transcriptome analysis reveals strain-specific and conserved stemness genes in *Schmidtea mediterranea*», *PLoS ONE*, 7(4), p. 34447. doi: 10.1371/journal.pone.0034447.
- Reynoldson, T. B. (1966) «Preliminary Laboratory Experiments on Recruitment and Mortality in Triclad Populations», *SIL Proceedings, 1922-2010*, 16(3), p. 1621-1631. doi: 10.1080/03680770.1965.11899485.
- Rink, J. C., Vu, H. T. K. i Alvarado, A. S. (2011) «The maintenance and regeneration of the planarian excretory system are regulated by EGFR signaling», *Development*, 138(17), p. 3769-3780. doi: 10.1242/dev.066852.
- Ritchie, M. E. *et al.* (2015) «Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies», *Nucleic Acids Research*, 43(7), p. e47. doi: 10.1093/nar/gkv007.
- Robb, S. M. C. *et al.* (2015) «SmedGD 2.0: The *Schmidtea mediterranea* genome database», *Genesis*, 53(8), p. 535-546. doi: 10.1002/dvg.22872.
- Rokudai, S. *et al.* (2002) «Involvement of FKHR-Dependent TRADD Expression in Chemotherapeutic Drug-Induced Apoptosis», *Molecular and Cellular Biology*, 22(24), p. 8695-8708. doi: 10.1128/mcb.22.24.8695-8708.2002.
- Romani, P. *et al.* (2021) «Crosstalk between mechanotransduction and metabolism», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, p. 22-38. doi: 10.1038/s41580-020-00306-w.
- Ross, K. G. *et al.* (2015) «Novel monoclonal antibodies to study tissue regeneration in planarians», *BMC Developmental Biology*, 15(1), p. 2. doi: 10.1186/s12861-014-0050-9.
- Ross, M. G. *et al.* (2013) «Characterizing and measuring bias in sequence data», *Genome Biology*, 14(5), p. 1-20. doi: 10.1186/gb-2013-14-5-r51.
- Rosselló, M. i Adell, T. (2021) «TUNEL staining in sections of paraffin-enabled planarians», *En revisió*.
- Rozanski, A. *et al.* (2019) «PlanMine 3.0 - improvements to a mineable resource of flatworm biology and biodiversity», *Nucleic Acids Research*, 47(D1), p. D812-

D820. doi: 10.1093/nar/gky1070.

Saelens, X. *et al.* (2004) «Toxic proteins released from mitochondria in cell death», *Oncogene*. *Oncogene*, p. 2861-2874. doi: 10.1038/sj.onc.1207523.

Sagan, L. (1967) «On the origin of mitosing cells», *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), p. 225-IN6. doi: 10.1016/0022-5193(67)90079-3.

Saló, E. i 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.», *Journal of embryology and experimental morphology*, 83, p. 63-80.

Sandmann, T. *et al.* (2011) «The head-regeneration transcriptome of the planarian *Schmidtea mediterranea*», *Genome Biology*, 12(8), p. 1-19. doi: 10.1186/gb-2011-12-8-r76.

Sanger, F. i Coulson, A. R. (1975) «A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase», *Journal of Molecular Biology*, 94(3). doi: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.

Sanger, F., Nicklen, S. i Coulson, A. R. (1977) «DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), p. 5463-5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.

Santabàrbara-Ruiz, P. *et al.* (2015) «ROS-Induced JNK and p38 Signaling Is Required for Unpaired Cytokine Activation during *Drosophila* Regeneration», *PLoS Genetics*, 11(10). doi: 10.1371/journal.pgen.1005595.

Sarbassov, D. D. *et al.* (2005) «Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex», *Science*, 307(5712), p. 1098-1101. doi: 10.1126/science.1106148.

Schindelin, J. *et al.* (2012) «Fiji: An open-source platform for biological-image analysis», *Nature Methods*. Nature Publishing Group, p. 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019.

Scimone, M. L. *et al.* (2016) «Two FGFR1-Wnt circuits organize the planarian anteroposterior axis», *eLife*, 5(April 2016). doi: 10.7554/eLife.12845.

Sebe-Pedrs, A. *et al.* (2012) «Premetazoan Origin of the Hippo Signaling Pathway», *Cell Reports*, 1(1), p. 13-20. doi: 10.1016/j.celrep.2011.11.004.

Seifert, A. W. i Muneoka, K. (2018) «The blastema and epimorphic regeneration in mammals», *Developmental Biology*. Academic Press, p. 190-199. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.08.007.

Seoane, J. *et al.* (2004) «Integration of smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation», *Cell*, 117(2), p. 211-223. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00298-3.

Shaw, J. M. i Nunnari, J. (2002) «Mitochondrial dynamics and division in

budding yeast», *Trends in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, p. 178-184. doi: 10.1016/S0962-8924(01)02246-2.

Silvis, M. R. *et al.* (2011) « α -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator yap1», *Science Signaling*, 4(174). doi: 10.1126/scisignal.2001823.

Smirnova, E. *et al.* (2001) «Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells», *Molecular Biology of the Cell*, 12(8), p. 2245-2256. doi: 10.1091/mbc.12.8.2245.

Solana, J. *et al.* (2016) «Conserved functional antagonism of CELF and MBNL proteins controls stem cell-specific alternative splicing in planarians», *eLife*, 5(AUGUST). doi: 10.7554/eLife.16797.001.

Sorvina, A. *et al.* (2018) «Mitochondrial imaging in live or fixed tissues using a luminescent iridium complex», *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-24672-w.

de Sousa, N. *et al.* (2018) «Hippo signaling controls cell cycle and restricts cell plasticity in planarians», *PLoS Biology*, 16(1). doi: 10.1371/journal.pbio.2002399.

Stadtman, E. R. i Levine, R. L. (2000) «Protein oxidation», en *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, p. 191-208. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x.

Stein, C. *et al.* (2015) «YAP1 Exerts Its Transcriptional Control via TEAD-Mediated Activation of Enhancers», *PLoS Genetics*, 11(8). doi: 10.1371/journal.pgen.1005465.

Strauss, K. A. i Morton, D. H. (2003) «Branched-chain ketoacyl dehydrogenase deficiency: Maple syrup disease», *Current Treatment Options in Neurology*, 5(4), p. 329-341. doi: 10.1007/s11940-003-0039-3.

Stubenhaus, B. M. *et al.* (2016) «Light-induced depigmentation in planarians models the pathophysiology of acute porphyrias», *eLife*, 5(MAY2016). doi: 10.7554/eLife.14175.

Sudol, M. (1994) «Yes-Associated Protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product», *Oncogene*, 9(8), p. 2145-2152.

Sudol, M. *et al.* (1995) «Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain», *Journal of Biological Chemistry*, 270(24), p. 14733-14741. doi: 10.1074/jbc.270.24.14733.

Sugioka, R., Shimizu, S. i Tsujimoto, Y. (2004) «Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis», *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), p. 52726-52734. doi: 10.1074/jbc.M408910200.

- Sun, H. *et al.* (2019) «Warburg Effects in Cancer and Normal Proliferating Cells: Two Tales of the Same Name», *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 17(3), p. 273-286. doi: 10.1016/j.gpb.2018.12.006.
- Sun, S., Reddy, B. V. V. G. i Irvine, K. D. (2015) «Localization of Hippo signalling complexes and Warts activation in vivo», *Nature Communications*, 6. doi: 10.1038/ncomms9402.
- Sun, Z. *et al.* (2018) «FoxO6 regulates Hippo signaling and growth of the craniofacial complex», *PLoS Genetics*, 14(10), p. e1007675. doi: 10.1371/journal.pgen.1007675.
- Sureda-Gomez, M. i Adell, T. (2019) «Planarian organizers», *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press, p. 95-104. doi: 10.1016/j.semcd.2018.05.021.
- Susin, S. A. *et al.* (2000) «Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis», *Journal of Experimental Medicine*, 192(4), p. 571-579. doi: 10.1084/jem.192.4.571.
- Swapna, L. S. *et al.* (2018) «Comparative transcriptomic analyses and single-cell RNA sequencing of the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea* identify major cell types and pathway conservation», *Genome Biology*, 19(1), p. 1-22. doi: 10.1186/s13059-018-1498-x.
- Taguchi, N. *et al.* (2007) «Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission», *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), p. 11521-11529. doi: 10.1074/jbc.M607279200.
- Takeda, H., Nishimura, K. i Agata, K. (2009) «Planarians maintain a constant ratio of different cell types during changes in body size by using the stem cell system», *Zoological Science*, 26(12), p. 805-813. doi: 10.2108/zsj.26.805.
- Tan, T. C. J. *et al.* (2012) «Telomere maintenance and telomerase activity are differentially regulated in asexual and sexual worms», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), p. 4209-4214. doi: 10.1073/pnas.1118885109.
- Tang, T. T. L. *et al.* (2002) «The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor», *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), p. 14255-14265. doi: 10.1074/jbc.M110901200.
- Thiruvalluvan, M. *et al.* (2018) «SUMOylation controls stem cell proliferation and regional cell death through Hedgehog signaling in planarians», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(7), p. 1285-1301. doi: 10.1007/s00018-017-2697-4.
- Thommen, A. *et al.* (2019) «Body size-dependent energy storage causes Kleiber's law scaling of the metabolic rate in planarians», *eLife*, 8. doi: 10.7554/eLife.38187.
- Tran, H. *et al.* (2002) «DNA repair pathway stimulated by the forkhead

transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein», *Science*, 296(5567), p. 530-534. doi: 10.1126/science.1068712.

Tyler, S. (1984) «Turbellarian Platyhelminths», en *Biology of the Integument*. Springer Berlin Heidelberg, p. 112-131. doi: 10.1007/978-3-642-51593-4_10.

Van Der Vos, K. E. i Coffey, P. J. (2011) «The extending network of FOXO transcriptional target genes», *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, p. 579-592. doi: 10.1089/ars.2010.3419.

Wagner, D. E., Wang, I. E. i Reddien, P. W. (2011) «Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration», *Science*, 332(6031), p. 811-816. doi: 10.1126/science.1203983.

Wang, C. *et al.* (2019) «Heat shock protein DNAJA1 stabilizes PIWI proteins to support regeneration and homeostasis of planarian *Schmidtea mediterranea*», *Journal of Biological Chemistry*, 294(25), p. 9873-9887. doi: 10.1074/jbc.RA118.004445.

Wang, W. *et al.* (2015) «AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis», *Nature Cell Biology*, 17(4), p. 490-499. doi: 10.1038/ncb3113.

Wang, Y. *et al.* (2018) «Comprehensive Molecular Characterization of the Hippo Signaling Pathway in Cancer», *Cell Reports*, 25(5), p. 1304-1317.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.001.

Warburg, O. (1956) «On the origin of cancer cells», *Science*, 123(3191), p. 309-314. doi: 10.1126/science.123.3191.309.

Webb, A. E., Kundaje, A. i Brunet, A. (2016) «Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution», *Aging Cell*, 15(4), p. 673-685. doi: 10.1111/accel.12479.

Wei, X., Shimizu, T. i Lai, Z. C. (2007) «Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*», *EMBO Journal*, 26(7), p. 1772-1781. doi: 10.1038/sj.emboj.7601630.

Weigel, D. *et al.* (1989) «The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo», *Cell*, 57(4), p. 645-658. doi: 10.1016/0092-8674(89)90133-5.

Weigel, D. i Jäckle, H. (1990) «The fork head domain: A novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors?», *Cell*, p. 455-456. doi: 10.1016/0092-8674(90)90439-L.

Wenemoser, D. i Reddien, P. W. (2010) «Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence», *Developmental Biology*, 344(2), p. 979-991. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.06.017.

Westermann, B. (2010) «Mitochondrial fusion and fission in cell life and death»,

Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nature Publishing Group, p. 872-884. doi: 10.1038/nrm3013.

Westphal, D., Kluck, R. M. i Dewson, G. (2014) «Building blocks of the apoptotic pore: How Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis», *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, p. 196-205. doi: 10.1038/cdd.2013.139.

Wickham, H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

Wiegand, G. i Remington, S. J. (1986) «Citrate synthase: structure, control, and mechanism.», *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*. Annu Rev Biophys Biophys Chem, p. 97-117. doi: 10.1146/annurev.bb.15.060186.000525.

Witchley, J. N. *et al.* (2013) «Muscle cells provide instructions for planarian regeneration», *Cell Reports*, 4(4), p. 633-641. doi: 10.1016/j.celrep.2013.07.022.

Wolff, E. i Dubois, F. (1948) «Sur la migration des cellules de régénération chez les Planaires», *Revue suisse de zoologie.*, 55, p. 218-227. doi: 10.5962/bhl.part.117877.

Van Wolfswinkel, J. C., Wagner, D. E. i Reddien, P. W. (2014) «Single-cell analysis reveals functionally distinct classes within the planarian stem cell compartment», *Cell Stem Cell*, 15(3), p. 326-339. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.007.

Workman, R. E. *et al.* (2019) «Nanopore native RNA sequencing of a human poly(A) transcriptome», *Nature Methods*, 16(12), p. 1297-1305. doi: 10.1038/s41592-019-0617-2.

Wotton, K. R. i Shimeld, S. M. (2006) «Comparative genomics of vertebrate Fox cluster loci», *BMC Genomics*, 7(1), p. 1-9. doi: 10.1186/1471-2164-7-271.

Wu, H. *et al.* (2015) «Integration of Hippo signalling and the unfolded protein response to restrain liver overgrowth and tumorigenesis», *Nature Communications*, 6(1), p. 1-15. doi: 10.1038/ncomms7239.

Wu, S. *et al.* (2008) «The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway.», *Developmental cell*, 14(3), p. 388-398. doi: 10.1016/j.devcel.2008.01.007.

Wu, S. *et al.* (2011) «Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins», *FEBS Journal*, 278(6), p. 941-954. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08010.x.

Wu, T. D. i Watanabe, C. K. (2005) «GMAP: A genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences», *Bioinformatics*, 21(9), p. 1859-1875. doi: 10.1093/bioinformatics/bti310.

- Xiao, T. i Zhou, W. (2020) «The third generation sequencing: The advanced approach to genetic diseases», *Translational Pediatrics*. AME Publications, p. 163-173. doi: 10.21037/TP.2020.03.06.
- Xu, T. *et al.* (1995) «Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase.», *Development*, 121(4), p. 1053-63. doi: 10.1101/gad.3.9.1273.
- Yin, F. *et al.* (2013) «Spatial organization of hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor merlin/NF2», *Cell*, 154(6), p. 1342. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.025.
- Yoon, Y. S. *et al.* (2006) «Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: Involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1», *Journal of Cellular Physiology*, 209(2), p. 468-480. doi: 10.1002/jcp.20753.
- Yu, R. *et al.* (2020) «Regulation of Mammalian Mitochondrial Dynamics: Opportunities and Challenges», *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A., p. 374. doi: 10.3389/fendo.2020.00374.
- Yu, T. *et al.* (2008) «Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species», *Cardiovascular Research*, 79(2), p. 341-351. doi: 10.1093/cvr/cvn104.
- Yu, T., Robotham, J. L. i Yoon, Y. (2006) «Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), p. 2653-2658. doi: 10.1073/pnas.0511154103.
- Zhang, H., Pasolli, H. A. i Fuchs, E. (2011) «Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), p. 2270-2275. doi: 10.1073/pnas.1019603108.
- Zhao, B. *et al.* (2007) «Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control», *Genes and Development*, 21(21), p. 2747-2761. doi: 10.1101/gad.1602907.
- Zhao, B. *et al.* (2010) «A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF β -TRCP», *Genes and Development*, 24(1), p. 72-85. doi: 10.1101/gad.1843810.
- Zhao, B. *et al.* (2012) «Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis», *Genes and Development*, 26(1), p. 54-68. doi: 10.1101/gad.173435.111.
- Zhao, Y., Wang, Y. i Zhu, W. G. (2011) «Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions», *Journal of Molecular Cell Biology*. J Mol Cell Biol, p. 276-282. doi: 10.1093/jmcb/mjr013.

Zheng, Y. i Pan, D. (2019) «The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease», *Developmental Cell*. Cell Press, p. 264-282. doi: 10.1016/j.devcel.2019.06.003.

Zhu, S. *et al.* (2010) «Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds», *Cell Stem Cell*. Cell Press, p. 651-655. doi: 10.1016/j.stem.2010.11.015.

Zhu, S. J. i Pearson, B. J. (2013) «The Retinoblastoma pathway regulates stem cell proliferation in freshwater planarians», *Developmental Biology*, 373(2), p. 442-452. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.10.025.

Índex de figures

| | |
|--|----|
| Figura 1. Funcionament de la inhibició de gens diana per RNAi. | 2 |
| Figura 2. Òrgans i estructures principals de les planàries. | 4 |
| Figura 3. Sistemes de la planària. | 5 |
| Figura 4. Neoblast de les planàries. | 6 |
| Figura 5. Procés de regeneració de les planàries. | 8 |
| Figura 6. Estructures de la mitocondria. | 12 |
| Figura 7. Mecanisme de fusió i fissió mitocondrial. | 14 |
| Figura 8. Vies d'apoptosi. | 16 |
| Figura 9. Regulació del cicle cel·lular a través de la dinàmica mitocondrial. .. | 18 |
| Figura 10. Funcionament de la via Hippo en <i>Drosòfila</i> i mamífers. | 21 |
| Figura 11. Fenotip dels animals <i>hpo</i> RNAi. | 23 |
| Figura 12. Model del funcionament de <i>hpo</i> en planàries. | 24 |
| Figura 13. Regulació de FoxO en diferents estats nutricionals. | 26 |
| Figura 14. Regulació de l'apoptosi a través de FoxO. | 28 |
| Figura 15. Evolució dels mètodes de seqüenciació al llarg del temps. | 31 |
| Figura 16. Anàlisis dels gens diana de la via Hippo. | 36 |
| Figura 17. Anàlisis dels gens diana de la via Hippo. | 37 |
| Figura 18. Fenotip dels gens candidats després de la seva inhibició. | 39 |
| Figura 19. Canvis en el balanç cel·lular després de la inhibició dels gens candidats. | 40 |
| Figura 20. Mida de les mitocondries en imatges de TEM. | 42 |
| Figura 21. Mida de les mitocondries en les reconstruccions 3D. | 43 |
| Figura 22. Estructura de les mitocondries observades per TEM. | 44 |
| Figura 23. Forma de les mitocondries reconstruïdes a partir de les imatges de SBFSEM. | 45 |
| Figura 24. Capacitat energètica de les mitocondries després de la inhibició de <i>hpo</i> | 46 |
| Figura 25. Regulació de FoxO a través de l'estat nutricional. | 47 |
| Figura 26. Fenotip dels animals <i>foxo</i> RNAi en regeneració. | 48 |
| Figura 27. Fenotip dels animals intactes després de la inhibició de <i>foxo</i> | 49 |
| Figura 28. Canvis en la mort cel·lular després de la inhibició de <i>foxo</i> | 50 |
| Figura 29. Canvis en proliferació i mida cel·lular després de la inhibició de <i>foxo</i> | 51 |
| Figura 30. Densitat cel·lular de l'epidermis. | 52 |
| Figura 31. Estudi de l'estructura de l'epidermis. | 53 |

| | |
|---|----|
| Figura 32. Mecanismes d'eliminació de ROS. | 54 |
| Figura 33. Nivells dels gens encarregats de l'eliminació de ROS a la mitocòndria. | 55 |
| Figura 34. Determinació dels nivells de ROS. | 56 |
| Figura 35. Relació de FoxO amb la via Hippo. | 57 |
| Figura 36. Distribució dels <i>reads</i> en els diferents codis d'etiquetatge. | 59 |
| Figura 37. Mida dels <i>reads</i> després de l'eliminació de les seqüències flanquejants. | 60 |
| Figura 38. Distribució dels <i>contigs</i> per mida i %GC. | 61 |
| Figura 39. Comparació dels ORFs obtinguts sense correcció i amb ESTscan. | 62 |
| Figura 40. Comparació dels ORFs sobre diferents conjunts de dades de referència. | 63 |
| Figura 41. Visualització dels <i>contigs</i> al navegador genòmic JBrowser de PlanNet. | 65 |
| Figura 42. Expressió a cada rèplica amb diferents transformacions. | 66 |
| Figura 43. Anàlisi de components principals. | 67 |
| Figura 44. <i>Volcano plot</i> dels gens identificats al DGE. | 68 |
| Figura 45. Termes de GO enriquits al comprar animals desdejunats contra els alimentats. | 70 |
| Figura 46. Termes de GO enriquits al comprar animals regenerants i alimentats. | 71 |
| Figura 47. Termes de GO enriquits al comprar animals regenerants i desdejunats. | 72 |
| Figura 48. Relacions entre els gens diferencialment expressats. | 73 |
| Figura 49. Marcatge de mitocòndries per MitoTracker en planàries. | 82 |
| Figura 50. Evolució de la mort cel·lular en animals <i>foxo</i> RNAi. | 85 |
| Figura 51. Model de l'inici del procés de senescència després de la inhibició de <i>foxo</i> | 89 |

Abreviatures

%GC – Percentatge de guanina-citocina.

Akt – Serina/treonina proteïna-cinasa

AMPK – proteïna cinasa activada por AMP; en anglès *AMP-activated protein kinase*

AP – Fosfatasa alcalina; en anglès *alkaline phosphatase*

AR – Relació d'aspecte; en anglès *aspect ratio*.

ATAC-seq – Assaig d'accessibilitat de la transposasa a la cromatina utilitzant seqüenciació; en anglès *Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing*

bck – Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase

Cat – Catalasa

CDKs – Cinases dependents de ciclins

cDNA – DNA complementari

cecr5 – Cat Eye Syndrome Chromosome Region, Candidate 5

CEEM – Coeficient d'eficiència energètica a la mitocondria; en anglès *coefficient of energy efficiency in mitochondria*

ChIP-seq – Immunoprecipitació de la cromatina utilitzant la seqüenciació; en anglès *chromatin immunoprecipitation using sequencing*

Circ. – Circularitat

cNeoblast – Neoblast clonogènic

CPM – Comptatges per milió.

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCF – Dichlorofluoresceïna

- DDR** – Reacció de dany al DNA; en anglès DNA damage response
- DGE** – Anàlisi d'expressió diferencial; en anglès Differential Gene Expression Analysis.
- DIG** – Desoxigenina
- DNA** – Àcid desoxiribonucleic
- Drp1** – *Dynammin-related Protein*
- dsRNA** – RNA de doble cadena
- EIM** – Espai intermembrana
- FA** – Formamida
- FACS** – Classificador de cèl·lules activat per fluorescència en anglès *Fluorescent Activated Cell Sorter*
- FC** – Canvi relatiu; en anglès fold change
- Fis1** – *Mitochondrial fission 1 protein*
- Fox** – *Forkhead box*
- Fzo** – *Fuzzy onions*
- GO** – Ontologia gènica; en anglès *gene ontology*
- GPx** – Glutatió peroxidasa
- H₂DCFDA** – Diacetat 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina
- H3P** – Histona 3 fosforilada
- hpo** – *hippo*
- iPSC** – cèl·lules mare pluripotents induïdes
- JNK** – Cinasa c-Jun N-terminal
- Lats 1/2** – *Large tumor suppressor kinase 1/2*
- Mats** – *Mob as tumor suppressor*
- Mdv1** – *Mitochondrial division protein 1*
- MEC** – Matriu extracel·lular.
- MEM** – Membrana externa mitocondrial
- Mfn** – Mitofusina
- MIM** – Membrana interna mitocondrial

MM – Matriu mitocondrial

Mob1 – *MOB Kinase Activator 1A*

Mst 1/2 – *Mammalian Ste20-like kinases*

mtDNA – DNA mitocondrial

mTOR – Diana de rapamicina en cèl·lules de mamífer; en anglès *mammalian target of rapamycin* o *mechanistic target of rapamycin*

NAC – N-acetil cisteïna

NGS – Seqüenciació de següent generació; en anglès *next-generation sequencing*.

ONT – Oxford Nanopore Technologies.

OPA1 – *Optic atrophy protein 1*

ORF – Pauta de lectura oberta.

OXPHOS – fosforilació oxidativa, en anglès *oxidative phosphorylation*

PacBio – Pacific Biosciences.

PAM – Medi artificial de planària; en anglès *planarians artificial medium*

PCA – Anàlisi de components principals; en anglès *Principal Component Analysis*.

PCG – Gens d'informació posicional; del anglès *position-control genes*.

PKD1 – Cinasa dependent de fosfoinositida 1; en anglès *phosphoinositide-dependent kinase-1*

PI3K – Fosfoinositol 3 cinasa

POD – Peroxidasa

qPCR – PCR quantitativa

RNA – Àcid ribonucleic

RNAi – RNA d'interferència.

RNA-seq – Seqüenciació de RNA

ROS – Espècies reactives del oxigen; del anglès *reactive oxygen species*.

S. mediterranea – *Schmidtea mediterranea*.

SARAH – Salvador/Ras-association domain family /Hippo

Sav – Salvador

Sd – Scalloped

SDS-PAGE – electroforesi en gel de poliacrilamida de dodecilsulfat de sodi; en anglès *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SFBSEM – Microscòpia electrònica de rastreig de cara en sèrie; en anglès *serial block-face scanning electron microscopy*.

SOD2 – Superòxid dismutasa 2

SSCTx – Tampó de salí de soli di citrat amb tritó ; en anglès *Saline-Sodium Citrate buffer with TritonX*

TAZ: – *Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*

tdh – L-Treonina Deshidrogenasa

TEAD: – TEA domain family members

TEM – Microscòpia electrònica de transmissió; en anglès *transmission electron microscopy*.

TUNEL – Marcat de final de tall de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa; en anglès *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

UPR – resposta a proteïnes mal plegades; en anglès *unfolded protein response*

YAP – *Yes-associated protein*

Yki – Yorkie

Apèndix

1. Gens desregulats després de la inhibició de la via Hippo

Gens diana de la via Hippo seleccionats després de passar els filtres de selecció.

Taula 3. Gens diferencialment expressats que passen el filtre de selecció.

| ID Dresden | ID SmedGenes | Homòleg humans | b yki | b hpo | Ronda |
|----------------------|------------------|----------------|---------|---------|-------|
| dd_Smed_v6_1170_0_1 | SMESG000006859.1 | CECR5 | 1,1E14 | -1,2E14 | 1R |
| dd_Smed_v6_12075_0_1 | SMESG000029023.1 | TDH | 3,5E14 | -3,7E14 | 1R |
| dd_Smed_v6_6589_0_1 | SMESG000042545.1 | B3GALT5 | 1,2E14 | -1,6E14 | 1R |
| dd_Smed_v6_1738_0_3 | SMESG000033021.1 | SLC12A9 | -1,3E14 | 1,3E14 | 1R |
| dd_Smed_v6_5256_0_1 | SMESG000069765.1 | ECE2 | -2,6E13 | 1,4E14 | 1R |
| dd_Smed_v6_10188_0_1 | NA | THNSL2 | 3,4E14 | -4,9E13 | 3R |
| dd_Smed_v6_10374_0_1 | SMESG000047829.1 | SBNO1 | 4,4E14 | -1,2E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_1054_0_1 | SMESG000012051.1 | HSPG2 | 3,8E14 | -2,4E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_1068_0_1 | SMESG000020955.1 | NA | 2,1E14 | -1,7E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_10732_0_1 | SMESG000021412.1 | BCKDHA | 1,8E14 | -1,8E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_10903_0_1 | SMESG000064528.1 | SLC22A5 | 4,6E14 | -3,0E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_10990_0_1 | SMESG000071519.1 | MPEG1 | 3,1E14 | -6,6E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_1170_0_1 | SMESG000006859.1 | CECR5 | 1,1E14 | -4,2E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_1189_0_1 | SMESG000080424.1 | OXCT1 | 3,6E14 | -4,0E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_12075_0_1 | SMESG000029023.1 | TDH | 3,5E14 | -1,3E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_12821_0_1 | SMESG000008338.1 | SEC14L4 | 3,6E14 | -3,5E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_13065_0_1 | SMESG000029156.1 | NA | 2,5E14 | -1,6E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_1327_0_1 | SMESG000005298.1 | HNRNPL | 1,1E13 | -7,2E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_13700_0_1 | NA | NA | 1,8E14 | -3,5E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_1414_0_1 | SMESG000021236.1 | NDRG2 | 1,5E14 | -9,2E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_142_0_1 | SMESG000046560.1 | NA | 1,1E14 | -1,1E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_1626_0_3 | SMESG000037565.1 | TOP2B | 1,6E14 | -1,2E13 | 3R |
| dd_Smed_v6_1651_0_1 | SMESG000029273.1 | RRM1 | 9,4E14 | -6,6E14 | 3R |
| dd_Smed_v6_17259_1_2 | SMESG000001180.1 | NA | 4,7E14 | -4,6E13 | 3R |
| dd_Smed_v6_195_0_1 | SMESG000037102.1 | RPS17 | 8,5E14 | -6,7E14 | 3R |

Les dades completes es poden trobar escanejant el codi QR o bé utilitzant l'enllaç.



<https://tinyurl.com/gensviahippo>

2. Anàlisi d'ontologies gèniques del gens diana de la via Hippo

| GO.ID | Term | Annot. | Sig. | Exp. | Fisher | FC |
|------------|--|--------|------|------|--------|------|
| GO:0005739 | mitochondrion | 1 | 1 | 0,25 | 0,25 | 2,00 |
| GO:0005622 | intracellular | 3 | 1 | 0,75 | 1,00 | 0,42 |
| GO:0043231 | intracellular membrane-bounded organelle | 3 | 1 | 0,75 | 1,00 | 0,42 |
| GO:0005737 | cytoplasm | 3 | 1 | 0,75 | 1,00 | 0,42 |
| GO:0043229 | intracellular organelle | 3 | 1 | 0,75 | 1,00 | 0,42 |
| GO:0110165 | cellular anatomical entity | 4 | 1 | 1,00 | 1,00 | 0,00 |
| GO:0005575 | cellular_component | 4 | 1 | 1,00 | 1,00 | 0,00 |
| GO:0043226 | organelle | 4 | 1 | 1,00 | 1,00 | 0,00 |
| GO:0043227 | membrane-bounded organelle | 4 | 1 | 1,00 | 1,00 | 0,00 |
| GO:0046474 | glycerophospholipid biosynthetic process | 1 | 1 | 0,25 | 0,25 | 2,00 |
| GO:0045017 | glycerolipid biosynthetic process | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0006796 | phosphate-containing compound metabolic | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0090407 | organophosphate biosynthetic process | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0008654 | phospholipid biosynthetic process | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0008610 | lipid biosynthetic process | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0044255 | cellular lipid metabolic process | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0006644 | phospholipid metabolic process | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0006629 | lipid metabolic process | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0006650 | glycerophospholipid metabolic process | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0019637 | organophosphate metabolic process | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0046486 | glycerolipid metabolic process | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0006793 | phosphorus metabolic process | 1 | 1 | 0,25 | 1,00 | 2,00 |
| GO:0044249 | cellular biosynthetic process | 2 | 1 | 0,50 | 1,00 | 1,00 |
| GO:0009058 | biosynthetic process | 2 | 1 | 0,50 | 1,00 | 1,00 |
| GO:1901576 | organic substance biosynthetic process | 2 | 1 | 0,50 | 1,00 | 1,00 |
| GO:0044237 | cellular metabolic process | 3 | 1 | 0,75 | 1,00 | 0,42 |
| GO:0044238 | primary metabolic process | 3 | 1 | 0,75 | 1,00 | 0,42 |
| GO:0071704 | organic substance metabolic process | 3 | 1 | 0,75 | 1,00 | 0,42 |
| GO:0008152 | metabolic process | 3 | 1 | 0,75 | 1,00 | 0,42 |
| GO:0009987 | cellular process | 4 | 1 | 1,00 | 1,00 | 0,00 |
| GO:0008150 | biological_process | 4 | 1 | 1,00 | 1,00 | 0,00 |

3. Reconstrucció de les imatges de SBFSEM

Exemple del procés de obtenció dels orgànuls en tres dimensions a partir de les imatges de SBFSEM. Es pot consultar el vídeo al enllaç següent. També és possible observar-lo utilitzant el codi QR.



<https://tinyurl.com/proces3d>

Les reconstruccions obtingudes a partir de les imatges de SBFSEM es poden trobar en els enllaços següents. També és possible observar les reconstruccions utilitzant els codis QR.

gfp rèplica 1 – Reconstrucció total



<https://tinyurl.com/SBFSEMgfp1>

gfp rèplica 2 – Reconstrucció total



<https://tinyurl.com/SBFSEMgfp2>

hpo rèplica 1 – Reconstrucció total



<https://tinyurl.com/SBFSEMhpo1>

hpo rèplica 2 – Reconstrucció total



<https://tinyurl.com/SBFSEMhpo2>

***gfp* rèplica 1 – Reconstrucció
mitocòndries**



<https://tinyurl.com/SBFSEMGfp1mito>

***gfp* rèplica 2 – Reconstrucció
mitocòndries**



<https://tinyurl.com/SBFSEMGfp2>

***hpo* rèplica 1 – Reconstrucció
mitocòndries**



[https://tinyurl.com/SBFSEMHpo1mi
to](https://tinyurl.com/SBFSEMHpo1mito)

***hpo* rèplica 2 – Reconstrucció
mitocòndries**



[https://tinyurl.com/SBFSEMHpo2mi
to](https://tinyurl.com/SBFSEMHpo2mito)

4. Gens amb motius d'unió a FoxO

A la taula següent hi ha una selecció dels gens amb motius d'unió de FoxO. A la taula surt representat el gen on hi ha el motiu d'unió, l'homòleg humà d'aquest gen, la seqüència del motiu d'unió, el motiu de referència de l'homòleg humà utilitzat i finalment la puntuació. Com major és la puntuació major és la fiabilitat del predicció del motiu d'unió. Al final de la taula hi ha l'enllaç a les dades completes.

Taula 4. Taula dels gens amb motiu d'unió de foxo al seu promotor

| Gen | Homòleg humà | Seq | Motiu | Cadena | Puntuació |
|------------------|--------------|----------|-------|--------|-----------|
| SMESG000052308.1 | KLHDC8A | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000052306.1 | AHNAK | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000043211.1 | | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000043019.1 | TUBA4A | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000040665.1 | ANKRD28 | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000039526.1 | MXN1 | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000037132.1 | DAB2IP | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000033176.1 | EIF1B | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000029399.1 | | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000028122.1 | PGLYRP2 | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000023764.1 | GSK3B | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000022101.1 | CYP2B6 | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000017935.1 | | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000017572.1 | | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000016362.1 | TRAF4 | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000010789.1 | | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000010241.1 | NPR1 | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000010381.1 | COPB2 | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000009899.1 | | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000009946.1 | SPON1 | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000007128.1 | | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000007128.1 | | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000004884.1 | | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000004509.1 | SLTM | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000000812.1 | | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |

Taula 5. Taula dels gens amb motiu d'unió de foxo al seu estimulador

| Gen | Homòleg humà | Seq | Motiu | Cadena | Puntuació |
|------------------|--------------|----------|-------|--------|-----------|
| SMESG000056398.1 | HMGB1 | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000054157.1 | | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000053584.1 | | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000053522.1 | KDEL2 | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000052308.1 | KLHDC8A | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000052306.1 | AHNAK | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000049276.1 | LTA4H | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000047161.1 | ZBED5 | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000047165.1 | CRISPLD2 | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000045686.1 | | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000045673.1 | | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000044697.1 | SLC25A6 | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000043975.1 | | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000043211.1 | | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000043119.1 | ASIC4 | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000043019.1 | TUBA4A | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000040665.1 | ANKRD28 | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000040665.1 | ANKRD28 | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000040582.1 | POGK | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000039526.1 | MNX1 | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000039423.1 | | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |
| SMESG000038586.1 | | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000038461.1 | ATP2B3 | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000038292.1 | PRKACB | TGTAAACA | Foxo3 | + | 9.964.331 |
| SMESG000038155.1 | FARP1 | TGTTTACA | Foxo3 | - | 9.964.331 |

Les dades completes es poden trobar escanejant el codi QR o bé utilitzant l'enllaç.



<https://tinyurl.com/FoxOATAC>

5. Gens diferencialment expressats

Taula amb els 25 primers gens diferencialment expressats de les diferents condicions experimentals. Al final de les taules hi ha l'enllaç a les dades completes.

Taula 6. Gens diferencialment expressats entre animals dejunats i alimentats

| Contig ID | SMESG ID | dd_Smed_v6 ID | Homòleg humà | Log FC | P-val adj |
|--------------|------------------|---------------------|--------------|--------|-----------|
| cluster_1192 | SMESG000019342.1 | dd_Smed_v6_873_0_1 | BHMT | 3,82 | 3,7E-05 |
| cluster_6096 | SMESG000035334.1 | dd_Smed_v6_8_0_1 | | 3,92 | 1,5E-04 |
| cluster_1203 | SMESG000051672.1 | dd_Smed_v6_3_0_1 | ACTB | 2,89 | 1,7E-04 |
| cluster_273 | SMESG000040632.1 | dd_Smed_v6_15_0_1 | HSPA8 | 1,98 | 1,7E-04 |
| cluster_8414 | SMESG000044180.1 | dd_Smed_v6_7783_0_1 | SAMD15 | -2,97 | 5,1E-04 |
| cluster_1037 | SMESG000005505.1 | dd_Smed_v6_38_0_2 | TUBA3D | 3,36 | 6,2E-04 |
| cluster_3920 | | | | -1,53 | 6,2E-04 |
| cluster_579 | | | | -1,63 | 8,9E-04 |
| cluster_3215 | | | | -2,00 | 1,0E-03 |
| cluster_7938 | SMESG000030583.1 | | | -1,98 | 1,0E-03 |
| cluster_6266 | SMESG000016693.1 | | | -2,91 | 1,0E-03 |
| cluster_2317 | SMESG000020957.1 | dd_Smed_v6_1462_0_1 | SGTB | 3,15 | 1,0E-03 |
| cluster_495 | SMESG000004848.1 | dd_Smed_v6_280_0_1 | ODC1 | 2,65 | 1,1E-03 |
| cluster_853 | SMESG000065612.1 | dd_Smed_v6_2092_0_1 | ETS2 | 3,06 | 1,4E-03 |
| cluster_6407 | SMESG000066355.1 | dd_Smed_v6_31_0_1 | | -1,84 | 1,5E-03 |
| cluster_6945 | SMESG000046586.1 | dd_Smed_v6_2725_0_1 | | -2,92 | 1,5E-03 |
| cluster_6623 | | | | -1,53 | 1,5E-03 |
| cluster_761 | SMESG000010495.1 | dd_Smed_v6_2020_0_1 | FARSB | 3,07 | 2,0E-03 |
| cluster_419 | SMESG000072159.1 | dd_Smed_v6_2330_0_1 | | 3,12 | 2,0E-03 |
| cluster_1995 | SMESG000035843.1 | dd_Smed_v6_1073_0_1 | TAT | 3,11 | 2,0E-03 |
| cluster_6536 | SMESG000002673.1 | dd_Smed_v6_123_0_1 | RPS20 | -1,50 | 2,0E-03 |
| cluster_5485 | SMESG000072804.1 | dd_Smed_v6_345_0_1 | ASTL | 3,07 | 2,1E-03 |
| cluster_923 | SMESG000061099.1 | dd_Smed_v6_30_0_1 | EEF1A1 | 1,75 | 2,2E-03 |
| cluster_754 | SMESG000055572.1 | dd_Smed_v6_859_0_1 | CAT | 2,70 | 2,2E-03 |
| cluster_6870 | SMESG000004851.1 | dd_Smed_v6_5595_0_1 | | -2,71 | 2,2E-03 |

Taula 7. Gens diferencialment expressats entre animals regenerats i alimentats

| Contig ID | SMESG ID | dd_Smed_v6 ID | Homòleg humà | Log FC | P-val adj |
|--------------|------------------|---------------------|--------------|--------|-----------|
| cluster_6414 | | | | -2,53 | 1,7E-10 |
| cluster_3719 | | | | -1,76 | 1,6E-10 |
| cluster_647 | | dd_Smed_v6_344_0_1 | MT-CYB | -2,02 | 7,3E-10 |
| cluster_595 | | | | -2,08 | 7,3E-10 |
| cluster_1617 | | dd_Smed_v6_297_0_1 | MT-CO2 | -1,52 | 7,3E-10 |
| cluster_6754 | | | | -1,97 | 1,4E-08 |
| cluster_305 | | | | -2,35 | 1,8E-08 |
| cluster_803 | SMESG000065325.1 | dd_Smed_v6_141_0_1 | HSPD1 | 4,34 | 1,3E-07 |
| cluster_923 | SMESG000061099.1 | dd_Smed_v6_30_0_1 | EEF1A1 | 2,61 | 1,8E-07 |
| cluster_1282 | | | | -2,31 | 1,8E-07 |
| cluster_273 | SMESG000040632.1 | dd_Smed_v6_15_0_1 | HSPA8 | 2,39 | 2,5E-07 |
| cluster_1106 | SMESG000014221.1 | dd_Smed_v6_728_0_1 | IPO7 | 3,97 | 3,7E-07 |
| cluster_579 | | | | -2,38 | 5,8E-07 |
| cluster_1767 | | | | -2,23 | 8,8E-07 |
| cluster_160 | | | | 3,32 | 1,2E-06 |
| cluster_4302 | | | | -2,82 | 1,5E-06 |
| cluster_827 | SMESG000049015.1 | dd_Smed_v6_527_0_1 | CCT6A | 4,06 | 1,5E-06 |
| cluster_1203 | SMESG000051672.1 | dd_Smed_v6_3_0_1 | ACTB | 3,18 | 2,6E-06 |
| cluster_1037 | SMESG000005505.1 | dd_Smed_v6_38_0_2 | TUBA3D | 3,95 | 3,7E-06 |
| cluster_275 | | dd_Smed_v6_56_0_2 | HSP90AA1 | 2,43 | 6,7E-06 |
| cluster_2845 | SMESG000012000.1 | dd_Smed_v6_6985_0_1 | CAPN5 | -1,66 | 8,6E-06 |
| cluster_235 | SMESG000042430.1 | dd_Smed_v6_186_0_1 | EEF2 | 2,74 | 1,2E-05 |
| cluster_2736 | | | | -2,10 | 2,0E-05 |
| cluster_1364 | SMESG000016832.1 | dd_Smed_v6_2115_0_1 | AGPS | 3,50 | 1,9E-05 |
| cluster_495 | SMESG000004848.1 | dd_Smed_v6_280_0_1 | ODC1 | 3,04 | 2,2E-05 |

Taula 8. Gens diferencialment expressats entre animals regenerats i dejunats

| Contig ID | SMESG ID | dd_Smed_v6 ID | Homòleg humana | Log FC | P-val adj |
|--------------|------------------|---------------------|----------------|--------|-----------|
| cluster_160 | | | | 3,63 | 1,8E-06 |
| cluster_3321 | | | | 1,66 | 5,1E-04 |
| cluster_5925 | SMESG000059698.1 | dd_Smed_v6_188_0_1 | | 2,25 | 5,8E-04 |
| cluster_6414 | | | | -1,52 | 1,0E-03 |
| cluster_3588 | SMESG000020046.1 | dd_Smed_v6_1329_0_1 | | 3,00 | 1,0E-03 |
| cluster_2288 | SMESG000044108.1 | dd_Smed_v6_2686_0_1 | PSMC2 | 2,83 | 1,3E-03 |
| cluster_305 | | | | -1,57 | 1,6E-03 |
| cluster_194 | SMESG000012051.1 | dd_Smed_v6_1054_0_1 | HSPG2 | 3,13 | 1,6E-03 |
| cluster_7197 | SMESG000011389.1 | dd_Smed_v6_4356_0_1 | | 2,77 | 1,9E-03 |
| cluster_4390 | SMESG000031033.1 | dd_Smed_v6_204_0_1 | RPS7 | 2,54 | 2,3E-03 |
| cluster_5258 | SMESG000028525.1 | dd_Smed_v6_2439_0_1 | CHAC1 | 2,71 | 2,7E-03 |
| cluster_996 | SMESG000001545.1 | dd_Smed_v6_1118_0_1 | KARS | 2,70 | 3,0E-03 |
| cluster_3121 | | | | 2,49 | 6,8E-03 |
| cluster_5338 | SMESG000081370.1 | dd_Smed_v6_446_0_1 | | 1,85 | 9,4E-03 |
| cluster_817 | | | | 2,53 | 1,1E-02 |
| cluster_2185 | SMESG000066554.1 | dd_Smed_v6_679_0_1 | NOVA2 | 2,59 | 1,4E-02 |
| cluster_7688 | SMESG000063458.1 | dd_Smed_v6_1836_0_1 | ATP6V1G1 | 2,58 | 1,4E-02 |
| cluster_4753 | SMESG000024345.1 | dd_Smed_v6_629_0_1 | | 2,60 | 1,5E-02 |
| cluster_8134 | | | | -2,75 | 1,5E-02 |
| cluster_4277 | SMESG000020535.1 | dd_Smed_v6_296_0_1 | RPL7A | 2,19 | 1,5E-02 |
| cluster_2291 | SMESG000027656.1 | dd_Smed_v6_688_0_1 | | 2,48 | 1,5E-02 |
| cluster_4735 | SMESG000066540.1 | dd_Smed_v6_163_0_1 | RPS3A | 2,46 | 1,5E-02 |
| cluster_4206 | SMESG000000962.1 | dd_Smed_v6_1956_0_1 | COPE | 2,36 | 1,8E-02 |
| cluster_5486 | SMESG000028419.1 | dd_Smed_v6_9777_0_1 | | -2,73 | 1,8E-02 |
| cluster_2701 | | dd_Smed_v6_154_0_1 | | 2,05 | 2,1E-02 |

Les dades completes es poden trobar escanejant el codi QR o bé utilitzant l'enllaç.



<https://tinyurl.com/alldqe>

6. Anàlisi d'ontologies gèniques del DGE obtingut per ONT

Llista d'ontologies gèniques de les diferents comparacions del DGE. Al final de les taules hi ha l'enllaç a les dades completes.

Taula 9. Anotació de GO en la comparació de animals dejunats i alimentats

| GO ID | Term | Anot. | Sig. | Expe. | KS | FC | GO |
|------------|---|-------|------|-------|---------|-------|----|
| GO:0005737 | cytoplasm | 183 | 41 | 40,67 | 12 | 0,01 | CC |
| GO:0031965 | nuclear membrane | 7 | 4 | 1,56 | 13 | 1,36 | CC |
| GO:0005622 | intracellular anatomical structure | 193 | 45 | 42,89 | 57 | 0,07 | CC |
| GO:0005856 | cytoskeleton | 38 | 7 | 8,44 | 77 | -0,27 | CC |
| GO:0005813 | centrosome | 8 | 1 | 1,78 | 10 5 | -0,83 | CC |
| GO:0006414 | translational elongation | 9 | 4 | 1,86 | 17 | 1,10 | BP |
| GO:0002223 | stimulatory C-type lectin receptor signa... | 7 | 4 | 1,45 | 34 | 1,46 | BP |
| GO:0006415 | translational termination | 7 | 4 | 1,45 | 47 | 1,46 | BP |
| GO:0006614 | SRP-dependent cotranslational protein ta... | 6 | 5 | 1,24 | 58 | 2,01 | BP |
| GO:0006511 | ubiquitin-dependent protein catabolic pr... | 11 | 4 | 2,28 | 59 | 0,81 | BP |
| GO:0004602 | glutathione peroxidase activity | 2 | 2 | 0,42 | 46 | 2,25 | MF |
| GO:0008503 | benzodiazepine receptor activity | 2 | 2 | 0,42 | 51 | 2,25 | MF |
| GO:0005497 | androgen binding | 2 | 2 | 0,42 | 51 | 2,25 | MF |
| GO:0015485 | cholesterol binding | 2 | 2 | 0,42 | 51 | 2,25 | MF |
| GO:0003779 | actin binding | 11 | 3 | 2,33 | 55 | 0,36 | MF |

Taula 10. Anotació de GO en la comparació de animals regenerats i alimentats

| GO ID | Term | Anot. | Sig. | Expe. | KS | FC | GO |
|------------|---|-------|------|-------|-----|-------|----|
| GO:0031965 | nuclear membrane | 7 | 5 | 1,25 | 13 | 2,00 | CC |
| GO:0016021 | integral component of membrane | 59 | 16 | 10,55 | 20 | 0,60 | CC |
| GO:0031982 | vesicle | 102 | 15 | 18,23 | 112 | -0,28 | CC |
| GO:0005885 | Arp2/3 protein complex | 3 | 1 | 0,54 | 134 | 0,89 | CC |
| GO:0036064 | ciliary basal body | 1 | 1 | 0,18 | 139 | 2,47 | CC |
| GO:0006415 | translational termination | 7 | 1 | 1,08 | 82 | -0,11 | BP |
| GO:0006414 | translational elongation | 9 | 1 | 1,38 | 84 | -0,46 | BP |
| GO:2000379 | positive regulation of reactive oxygen s... | 3 | 3 | 0,46 | 100 | 2,71 | BP |
| GO:0006626 | protein targeting to mitochondrion | 4 | 3 | 0,61 | 100 | 2,30 | BP |
| GO:0006821 | chloride transport | 7 | 3 | 1,08 | 102 | 1,47 | BP |
| GO:0004045 | aminoacyl-tRNA hydrolase activity | 2 | 2 | 0,34 | 31 | 2,56 | MF |
| GO:0004602 | glutathione peroxidase activity | 2 | 2 | 0,34 | 38 | 2,56 | MF |
| GO:0008503 | benzodiazepine receptor activity | 2 | 2 | 0,34 | 53 | 2,56 | MF |
| GO:0005497 | androgen binding | 2 | 2 | 0,34 | 53 | 2,56 | MF |
| GO:0015485 | cholesterol binding | 2 | 2 | 0,34 | 53 | 2,56 | MF |

Taula 11. Anotació de GO en la comparació de animals regenerats i dejunats

| GO ID | Term | Anot. | Sig. | Expe. | KS | FC | GO |
|------------|---|-------|------|-------|------|-------|----|
| GO:0016021 | integral component of membrane | 59 | 28 | 20,52 | 39 | 0,45 | CC |
| GO:0005576 | extracellular region | 84 | 25 | 29,22 | 558 | -0,23 | CC |
| GO:0005764 | lysosome | 15 | 7 | 5,22 | 586 | 0,42 | CC |
| GO:0030673 | axolemma | 4 | 3 | 1,39 | 999 | 1,11 | CC |
| GO:0031901 | early endosome membrane | 2 | 2 | 0,7 | 1378 | 1,51 | CC |
| GO:2000210 | positive regulation of anoikis | 2 | 2 | 0,66 | 19 | 1,60 | BP |
| GO:2000811 | negative regulation of anoikis | 2 | 2 | 0,66 | 19 | 1,60 | BP |
| GO:0032870 | cellular response to hormone stimulus | 12 | 3 | 3,99 | 29 | -0,41 | BP |
| GO:0034220 | ion transmembrane transport | 26 | 12 | 8,64 | 33 | 0,47 | BP |
| GO:0006488 | dolichol-linked oligosaccharide biosynth... | 3 | 3 | 1 | 35 | 1,58 | BP |
| GO:0004045 | aminoacyl-tRNA hydrolase activity | 2 | 2 | 0,69 | 20 | 1,54 | MF |
| GO:0003735 | structural constituent of ribosome | 3 | 3 | 1,03 | 46 | 1,54 | MF |
| GO:0005200 | structural constituent of cytoskeleton | 4 | 2 | 1,37 | 101 | 0,55 | MF |
| GO:0015075 | ion transmembrane transporter activity | 17 | 9 | 5,84 | 140 | 0,62 | MF |
| GO:0017162 | aryl hydrocarbon receptor binding | 1 | 1 | 0,34 | 145 | 1,56 | MF |

Les dades completes es poden trobar escanejant el codi QR o bé utilitzant l'enllaç.



<https://tinyurl.com/alldgego>

Intersecció de gens entre les diferents condicions experimentals

Gens comuns en diferents condicions experimentals.

Taula 12. Gens comuns en condicions amb animals desdejunats

| ID <i>contig</i> | ID Dresden | ID SmedGenes | Homòleg humà |
|---------------------|------------------|---------------------|--------------|
| cluster_3962 | | | |
| cluster_5258 | SMESG000028525.1 | dd_Smed_v6_2439_0_1 | CHAC1 |
| cluster_5345 | SMESG000030918.1 | dd_Smed_v6_9659_0_1 | BEST3 |
| cluster_5596 | | | |
| cluster_5925 | SMESG000059698.1 | dd_Smed_v6_188_0_1 | |
| cluster_5931 | | | |
| cluster_7688 | SMESG000063458.1 | dd_Smed_v6_1836_0_1 | ATP6V1G1 |
| cluster_8414 | SMESG000044180.1 | dd_Smed_v6_7783_0_1 | SAMD15 |

Taula 13. Gens comuns en condicions amb animals regenerants

| ID <i>contig</i> | ID Dresden | ID SmedGenes | Homòleg humà |
|---------------------|------------------|---------------------|--------------|
| cluster_160 | | | |
| cluster_194 | SMESG000012051.1 | dd_Smed_v6_1054_0_1 | HSPG2 |
| cluster_2083 | SMESG000072172.1 | dd_Smed_v6_4123_0_1 | |
| cluster_2288 | SMESG000044108.1 | dd_Smed_v6_2686_0_1 | PSMC2 |
| cluster_2291 | SMESG000027656.1 | dd_Smed_v6_688_0_1 | |
| cluster_2472 | SMESG000066586.1 | dd_Smed_v6_1288_0_1 | CCNT2 |
| cluster_269 | SMESG000026514.1 | dd_Smed_v6_2604_0_1 | |
| cluster_2701 | | dd_Smed_v6_154_0_1 | |
| cluster_305 | | | |
| cluster_3652 | SMESG000036431.1 | dd_Smed_v6_4443_0_1 | SAE1 |
| cluster_4206 | SMESG000000962.1 | dd_Smed_v6_1956_0_1 | COPE |
| cluster_4277 | SMESG000020535.1 | dd_Smed_v6_296_0_1 | RPL7A |
| cluster_4753 | SMESG000024345.1 | dd_Smed_v6_629_0_1 | |
| cluster_6414 | | | |
| cluster_6555 | | | |
| cluster_817 | | | |
| cluster_996 | SMESG000001545.1 | dd_Smed_v6_1118_0_1 | KARS |

Taula 14. Gens comuns en condicions amb animals alimentats

| config.ID | SMESG.ID | dd_Smed_v6.ID | Human.homolog |
|--------------|------------------|---------------------|---------------|
| cluster_1037 | SMESG000005505.1 | dd_Smed_v6_38_0_2 | TUBA3D |
| cluster_1059 | SMESG000032189.1 | dd_Smed_v6_114_0_1 | YBX3 |
| cluster_1070 | SMESG000012107.1 | dd_Smed_v6_147_0_1 | DNAJA1 |
| cluster_1106 | SMESG000014221.1 | dd_Smed_v6_728_0_1 | IPO7 |
| cluster_1152 | | | |
| cluster_116 | | | |
| cluster_1189 | SMESG000058914.1 | dd_Smed_v6_2951_0_1 | SCARB2 |
| cluster_1192 | SMESG000019342.1 | dd_Smed_v6_873_0_1 | BHMT |
| cluster_1203 | SMESG000051672.1 | dd_Smed_v6_3_0_1 | ACTB |
| cluster_130 | | | |
| cluster_1339 | | | |
| cluster_1364 | SMESG000016832.1 | dd_Smed_v6_2115_0_1 | AGPS |
| cluster_1370 | SMESG000023126.1 | dd_Smed_v6_2560_0_1 | FIP1L1 |
| cluster_1403 | SMESG000048042.1 | dd_Smed_v6_2282_0_1 | CPA4 |
| cluster_1434 | SMESG000006902.1 | dd_Smed_v6_1145_0_1 | NMT2 |
| cluster_1441 | SMESG000035344.1 | dd_Smed_v6_329_0_1 | CTSD |
| cluster_1452 | SMESG000076568.1 | dd_Smed_v6_174_0_1 | GNB2L1 |
| cluster_1462 | SMESG000017700.1 | dd_Smed_v6_648_0_1 | TUBA1A |
| cluster_1501 | SMESG000074136.1 | dd_Smed_v6_1843_0_1 | NDUFV1 |
| cluster_1527 | SMESG000067773.1 | dd_Smed_v6_333_0_1 | CNN2 |
| cluster_1558 | SMESG000058317.1 | dd_Smed_v6_349_0_1 | EIF4A1 |
| cluster_1578 | SMESG000014166.1 | dd_Smed_v6_267_0_1 | CTSV |
| cluster_162 | | dd_Smed_v6_9535_0_1 | |
| cluster_1698 | SMESG000072821.1 | dd_Smed_v6_908_0_1 | PPM1A |
| cluster_1715 | SMESG000025209.1 | dd_Smed_v6_198_0_1 | CELA1 |
| cluster_1850 | SMESG000049103.1 | dd_Smed_v6_397_0_1 | |
| cluster_1927 | SMESG000027587.1 | dd_Smed_v6_1580_0_1 | MAT2A |
| cluster_1980 | SMESG000057599.1 | dd_Smed_v6_273_0_1 | CNN3 |
| cluster_1995 | SMESG000035843.1 | dd_Smed_v6_1073_0_1 | TAT |
| cluster_2154 | SMESG000023010.1 | dd_Smed_v6_1207_0_1 | |
| cluster_2207 | SMESG000072807.1 | | ASTL |
| cluster_2223 | SMESG000070056.1 | dd_Smed_v6_1295_0_1 | SYAP1 |
| cluster_2263 | SMESG000060259.1 | dd_Smed_v6_4861_0_1 | QPCT |
| cluster_2317 | SMESG000020957.1 | dd_Smed_v6_1462_0_1 | SGTB |
| cluster_235 | SMESG000042430.1 | dd_Smed_v6_186_0_1 | EEF2 |
| cluster_2382 | SMESG000041594.1 | dd_Smed_v6_438_0_1 | |
| cluster_240 | SMESG000019345.1 | dd_Smed_v6_2406_0_1 | MOGS |

| | | | |
|---------------------|------------------|---------------------|----------|
| cluster_2445 | SMESG000014949.1 | dd_Smed_v6_580_0_1 | PITPNA |
| cluster_253 | SMESG000042714.1 | dd_Smed_v6_628_0_1 | SSPO |
| cluster_2638 | SMESG000048413.1 | dd_Smed_v6_81_0_1 | CTSB |
| cluster_2671 | SMESG000024741.1 | dd_Smed_v6_626_0_1 | HMBS |
| cluster_273 | SMESG000040632.1 | dd_Smed_v6_15_0_1 | HSPA8 |
| cluster_2954 | SMESG000038232.1 | dd_Smed_v6_759_0_1 | TPM1 |
| cluster_296 | SMESG000029882.1 | dd_Smed_v6_442_0_1 | GRN |
| cluster_320 | SMESG000040274.1 | dd_Smed_v6_1197_0_1 | GLG1 |
| cluster_3215 | | | |
| cluster_3221 | SMESG000012027.1 | dd_Smed_v6_2364_0_1 | |
| cluster_3278 | SMESG000032180.1 | dd_Smed_v6_209_0_1 | YBX3 |
| cluster_332 | SMESG000013115.1 | dd_Smed_v6_1174_0_1 | STT3A |
| cluster_3529 | SMESG000049722.1 | dd_Smed_v6_175_0_1 | CTSV |
| cluster_372 | SMESG000045474.1 | dd_Smed_v6_1060_0_1 | ALDH18A1 |
| cluster_378 | SMESG000060455.1 | dd_Smed_v6_2161_0_1 | GBE1 |
| cluster_381 | SMESG000003855.1 | dd_Smed_v6_2233_0_1 | DDX1 |
| cluster_3867 | SMESG000055605.1 | dd_Smed_v6_1230_0_1 | SCGN |
| cluster_3953 | SMESG000036313.1 | dd_Smed_v6_3536_0_1 | SETDB1 |
| cluster_4085 | SMESG000021272.1 | dd_Smed_v6_1089_0_1 | PHB2 |
| cluster_417 | SMESG000070985.1 | dd_Smed_v6_1505_0_1 | POSTN |
| cluster_4302 | | | |
| cluster_470 | SMESG000022047.1 | dd_Smed_v6_542_0_1 | POR |
| cluster_4867 | SMESG000014001.1 | dd_Smed_v6_1638_0_1 | MRPL24 |
| cluster_4896 | SMESG000081409.1 | dd_Smed_v6_5589_0_1 | PPP3R1 |
| cluster_494 | SMESG000014588.1 | dd_Smed_v6_1694_0_1 | HNF4G |
| cluster_495 | SMESG000004848.1 | dd_Smed_v6_280_0_1 | ODC1 |
| cluster_497 | SMESG000062868.1 | dd_Smed_v6_196_0_1 | PCK2 |
| cluster_5042 | | | |
| cluster_5485 | SMESG000072804.1 | dd_Smed_v6_345_0_1 | ASTL |
| cluster_5531 | | dd_Smed_v6_515_0_1 | |
| cluster_5553 | | | |
| cluster_5581 | SMESG000049183.1 | dd_Smed_v6_2603_0_1 | RAB1B |
| cluster_561 | SMESG000028157.1 | dd_Smed_v6_959_0_1 | ATP6V1A |
| cluster_5781 | | | |
| cluster_5785 | SMESG000019492.1 | dd_Smed_v6_2007_0_1 | PSMB5 |
| cluster_579 | | | |
| cluster_5876 | | dd_Smed_v6_128_0_1 | RPL18 |
| cluster_6096 | SMESG000035334.1 | dd_Smed_v6_8_0_1 | |
| cluster_622 | SMESG000065959.1 | dd_Smed_v6_283_0_1 | DDX21 |

| | | | |
|---------------------|------------------|---------------------|---------|
| cluster_627 | SMESG000061711.1 | dd_Smed_v6_1930_0_1 | ABCE1 |
| cluster_632 | SMESG000023147.1 | dd_Smed_v6_250_0_1 | P4HB |
| cluster_6631 | | dd_Smed_v6_328_0_1 | |
| cluster_668 | SMESG000026537.1 | dd_Smed_v6_858_0_1 | |
| cluster_6753 | | | |
| cluster_686 | SMESG000076529.1 | dd_Smed_v6_475_0_1 | TTN |
| cluster_696 | SMESG000055720.1 | dd_Smed_v6_2538_0_1 | PRKAA2 |
| cluster_718 | SMESG000037231.1 | dd_Smed_v6_1475_0_1 | NPEPL1 |
| cluster_727 | SMESG000049071.1 | dd_Smed_v6_2082_0_1 | DDX4 |
| cluster_7397 | SMESG000038649.1 | dd_Smed_v6_6398_0_1 | |
| cluster_7455 | SMESG000024669.1 | dd_Smed_v6_3583_0_1 | |
| cluster_754 | SMESG000055572.1 | dd_Smed_v6_859_0_1 | CAT |
| cluster_755 | SMESG000071264.1 | dd_Smed_v6_665_0_1 | IPO5 |
| cluster_7560 | | | |
| cluster_761 | SMESG000010495.1 | dd_Smed_v6_2020_0_1 | FARSB |
| cluster_767 | SMESG000017093.1 | dd_Smed_v6_4014_0_1 | DDHD2 |
| cluster_775 | SMESG000020467.1 | dd_Smed_v6_2039_0_1 | |
| cluster_7938 | SMESG000030583.1 | | |
| cluster_803 | SMESG000065325.1 | dd_Smed_v6_141_0_1 | HSPD1 |
| cluster_8169 | | | |
| cluster_8234 | | dd_Smed_v6_47_0_1 | |
| cluster_853 | SMESG000065612.1 | dd_Smed_v6_2092_0_1 | ETS2 |
| cluster_8538 | | | |
| cluster_8700 | | | |
| cluster_877 | SMESG000079650.1 | dd_Smed_v6_124_0_1 | TUBA1A |
| cluster_883 | | dd_Smed_v6_523_0_1 | ELOVL3 |
| cluster_923 | SMESG000061099.1 | dd_Smed_v6_30_0_1 | EEF1A1 |
| cluster_937 | SMESG000003007.1 | dd_Smed_v6_282_0_1 | SEC61A2 |
| cluster_975 | SMESG000003820.1 | dd_Smed_v6_2022_0_1 | LPCAT1 |

Articles



OPEN

Analysis of Fox genes in *Schmidtea mediterranea* reveals new families and a conserved role of *Smed-foxO* in controlling cell death

Eudald Pascual-Carreras^{1,2,3}✉, Carlos Herrera-Úbeda^{1,2,3}, Maria Rosselló^{1,2}, Pablo Coronel-Córdoba^{1,2}, Jordi Garcia-Fernàndez^{1,2}, Emili Saló^{1,2} & Teresa Adell^{1,2}✉

The forkhead box (Fox) genes encode transcription factors that control several key aspects of development. Present in the ancestor of all eukaryotes, Fox genes underwent several duplications followed by loss and diversification events that gave rise to the current 25 families. However, few Fox members have been identified from the Lophotrochozoa clade, and specifically from planarians, which are a unique model for understanding development, due to the striking plasticity of the adult. The aim of this study was to identify and perform evolutionary and functional studies of the Fox genes of lophotrochozoan species and, specifically, of the planarian *Schmidtea mediterranea*. Generating a pipeline for identifying Forkhead domains and using phylogenetics allowed us the phylogenetic reconstruction of Fox genes. We corrected the annotation for misannotated genes and uncovered a new family, the QD, present in all metazoans. According to the new phylogeny, the 27 Fox genes found in *Schmidtea mediterranea* were classified into 12 families. In Platyhelminthes, family losses were accompanied by extensive gene diversification and the appearance of specific families, the A(P) and N(P). Among the newly identified planarian Fox genes, we found a single copy of *foxO*, which shows an evolutionary conserved role in controlling cell death.

Abbreviations

| | |
|------|-----------------------------------|
| Amq | <i>Amphimedon queenslandica</i> |
| Bla | <i>Branchiostoma lanceolatum</i> |
| Bose | <i>Bothrioplana semperi</i> |
| Cate | <i>Catenulia</i> |
| Cgi | <i>Crassostrea gigas</i> |
| Cte | <i>Capitella teleta</i> |
| Djap | <i>Dugesia japonica</i> |
| Dlac | <i>Dendrocoelum lacteum</i> |
| Dme | <i>Drosophila melanogaster</i> |
| Emul | <i>Echinococcus multiocularis</i> |
| FHA | Forkhead associated domain |
| FKH | Forkhead domain |
| Fox | Forkhead Box |
| Geap | <i>Geocentrophora applanta</i> |
| Gsa | <i>Gyrodactylus salaris</i> |
| Hro | <i>Helobdella robusta</i> |
| Hsa | <i>Homo sapiens</i> |
| Ili | <i>Intoshia linei</i> |
| Lept | <i>Leptoplana tremellaris</i> |
| Lgi | <i>Lottia gigantea</i> |
| Lna | <i>Lingula anatine</i> |

¹Department of Genetics, Microbiology and Statistics and Institute of Biomedicine, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalunya, Spain. ²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalunya, Spain. ³These authors contributed equally: Eudald Pascual-Carreras and Carlos Herrera-Úbeda. ✉email: eudald.pascual@uib.no; tadellc@ub.edu

| | |
|-------------|--|
| <i>Meli</i> | <i>Mesostoma lingua</i> |
| <i>Mli</i> | <i>Macrostomum lignano</i> |
| <i>Mli</i> | <i>Macrostomum lignano</i> |
| <i>Mosp</i> | <i>Monocelis</i> sp. |
| NES | Nuclear exportation signal |
| NLS | Nuclear localization signal |
| <i>Nve</i> | <i>Nematostella vectensis</i> |
| <i>Obi</i> | <i>Octopus bimaculoides</i> |
| <i>Pfl</i> | <i>Ptychodera flava</i> |
| <i>Pnig</i> | <i>Polycelis nigra</i> |
| <i>Pten</i> | <i>Polycelis tenuis</i> |
| <i>Ptor</i> | <i>Planaria torva</i> |
| <i>Sdo</i> | <i>Suberites domuncula</i> |
| <i>Sko</i> | <i>Saccoglossus kowalevskii</i> |
| <i>Sman</i> | <i>Schistosoma mansoni</i> |
| <i>Smed</i> | <i>Schmidtea mediterranea</i> Asexual strain |
| <i>Smes</i> | <i>Schmidtea mediterranea</i> Sexual strain |
| <i>Spol</i> | <i>Schmidtea polychroa</i> |
| <i>Spu</i> | <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> |
| <i>Tca</i> | <i>Tribolium castaneum</i> |
| TF | Transcription Factor |
| <i>Tsol</i> | <i>Taenia solium</i> |
| WGD | Whole Genome Duplication |
| <i>Xtr</i> | <i>Xenopus tropicalis</i> |

Forkhead box (Fox) genes belong to the ‘winged helix’ superfamily of transcription factors (TF) with a specific DNA-binding domain referred to as the Forkhead domain (FKH), with approximately 100 Aa. In Metazoa, Fox genes are expressed in a specific spatiotemporal manner during development, and control essential processes as cell death, cell cycle and stem cell differentiation into specific cell lineages and populations^{1–3}. Thus, Fox genes play a major role during embryonic and postembryonic development, including: gastrulation, lifespan, immune system regulation or tissue differentiation and maintenance¹. In humans, the lack of some Fox genes leads to embryonic lethality or developmental diseases such as Parkinson’s, defects in the immune system, speech and language learning or cancer^{1,2,4,5}.

Currently, over 2000 Fox proteins have been identified in 108 species of fungi and metazoans, including a vast number of Phyla, such as Choanoflagellata⁶, Ctenophora⁷, Placozoa⁸, Porifera⁹, Cnidaria¹⁰, Echinodermata¹¹, Hemichordata¹², Cephalochordata^{13,14} and Chordata^{14,15}. However, few Fox genes have been identified in lophotrochozoan species, and most functional studies have been only performed in few model organisms such as mice^{16–18}, *Drosophila melanogaster*^{19,20} or *C. elegans*²¹. Planarians are Lophotrochozoans well known for their astounding ability to regenerate any body part and change their size according to food availability. Such tissue plasticity is due to the presence of adult stem cells (neoblasts) that can give rise to all differentiated cell types, which is accompanied by the continuous activation of the intercellular signalling mechanisms^{22–24}. Planarians’ phylogenetic position and plasticity makes them an interesting model for investigating the Fox family at an evolutionary and functional level.

Fox genes are currently phylogenetically classified and grouped into 25 families (A to S)^{2,25}. The different gains and losses of Fox families have shaped the history of Fox family evolution, such as the division of family Q into Q1 and Q2, N into N1/4 and N2/3, L into L1 and L2 or J into J1 and J2/3¹⁴. Another example of gain is the S family, which seems to evolve by duplication of the C family and is specifically found in vertebrates^{11,26}. Fox family losses have also been reported, such as the AB in vertebrates¹⁵ or E, H, I, J2/3, M and Q1 in Ecdysozoa¹⁴.

The aim of this study was to identify and classify the Fox genes of the planarian species *Schmidtea mediterranea* (*Smed*), along with the Fox genes of other lophotrochozoan species whose genome or transcriptome is currently available^{27–32}. Previous studies of Fox genes expression and function in *Smed* showed that they were tissue specific and participated in its maintenance. The essential role of *foxA* in the maintenance of the pharynx and endodermal tissue has already been identified in planarians³³, similar to its role in early endoderm development in vertebrates^{34–36}, or the role of J1 paralogs in ciliogenesis³⁷, similar to the one described in vertebrate species as mice, chickens or frogs^{38,39}. However, other important Fox families such as the O family, related with metabolism, growth and aging^{40,41} had not been identified in planarians.

Through generating a pipeline for identifying Forkhead domains we identified and annotated 27 Fox genes in *Smed*, 18 of which are firstly reported here. Phylogenetic analyses allowed us to classify *Smed* Fox in 12 families. The integration of the newly identified Fox from *Smed* and other lophotrochozoans and Platyhelminthes with all reported Fox genes allowed for the identification of the QD family, a new family which appears to originate after the split of sponges from the rest of the eumetazoans. Most of the Fox families also originated during this period, which was followed by various loss events and some diversification. Specifically, Platyhelminthes suffered a huge gene family loss followed by gene diversification originating specific families: A(P) and N(P). Finally, we identified a single copy of the *foxO* gene in planarians and demonstrated its conserved role in controlling cell death.

Results

***Schmidtea mediterranea* presents 27 Fox genes that can be classified in 12 families.** With the aim to identify all Fox genes of *Smed*, we developed a pipeline for identifying Forkhead domains (FKH) using the available FKH from Pfam in combination with TransDecoder and HMMER (Fig. 1a, see “Methods”). As a result, we found 27 distinct genes that contained this domain in the planarian genome²⁷. To determine which family each of these genes belonged to, we performed a phylogenetic analysis using the FKH domain of the Fox genes of an additional 20 species across metazoans, including several lophotrochozoans, to better resolve the *Smed* Fox groups (Fig. 1a and “Methods”). The analysis resulted in the classification of the 27 FKH-containing *Smed* genes into 12 Fox families (Figs 1b,c, S1, S2, S3). The complete information and new annotation regarding each FKH-containing gene identified is provided in the supplementary materials (S1 File), along with the raw tree (S2 File).

The phylogenetic tree (Fig. 1b) shows that 5 out of these 12 families belong to Clade II, which is argued to be the ancestor clade^{42,43}; and 7 belong to Clade I. To better visualise the different Fox genes in each cluster, we inferred a series of new phylogenetic trees including only the genes from closely related families (Figs. 1c, S2, S3). Using this visualisation, we found some *Smed* Fox genes that were not properly classified: a *Smed* Fox gene that clusters between the L1 and the I families (*Smed-foxL1/I*) (Fig. 1c), a *Smed* Fox gene clustering as a sister group of the A, AB and B families (*Smed-foxA3*) (Figs. 1c, S2), and a *Smed* Fox clustering as a sister group of the N2/3 family (*Smed-foxN2/3-4*) (Fig. 1c, S3). Furthermore, we can observe how the Q2 family, widely described in many species^{12,44-46} has a branch populated with several genes that cluster with a divergent Q2 gene known as *foxQD* in *Saccoglossus kowalevskii* (*Sko*)¹². We consider this branch to be a new family (Fig. S2) which we called QD, due to the FKH-containing gene originally described in *Sko*. A *Smed* Fox gene belongs to this family (*Smed-foxQD*).

Focusing on the presence of Fox genes in each family, we can observe that despite the number of Fox genes in *Smed* has remained similar to the rest of lophotrochozoans (see purple lines in Fig. 2), the number of families with representatives of *Smed* and the other two Platyhelminthes (*Schistosoma mansoni* and *Macrostomum lignano*) has decreased. Particularly, Platyhelminthes seem to have lost the AB, B, E, H, I, Q1, Q2, M and N1/4 families (red dashed square in Fig. 2). This suggests a huge family loss at the base of Platyhelminthes phylum (orange lines in Fig. 2) coupled with an expansion of the Fox number in specific families.

Platyhelminthes present specific Fox subfamilies: FoxA(P) and FoxN(P). To further investigate the phylogeny of the unclassified *Smed* Fox genes (*Smed-foxL1/I*, *Smed-foxA3* and *Smed-foxN2/3-4*) we performed a second phylogenetic analysis focused on Platyhelminthes data. Repeating the same pipeline previously described, we identified the FKH-containing genes from a total of 19 Platyhelminthes species (including *Smed*), 8 of which belong to the Tricladida order, to which *Smed* belongs (Fig. 3a). Platyhelminthes Fox data can be found in the S3 File and the raw tree can be found in the S4 File. As previously, we also performed additional phylogenetic trees of close-related families to better visualize each family (Figs. S1, S3b, S4, S5). This analysis allowed us to properly classify the *foxL1/I* gene into the L1 family (Fig. 3b), which seems to be slightly divergent in the Tricladida Order, and thus we renamed it as *Smed-foxL1*. Furthermore, the new analysis allowed the identification of two new subfamilies only present in Platyhelminthes to which the *Smed-foxA3* and the *Smed-foxN2/3-4* genes belonged. Thus, we renamed them as *Smed-foxA(P)* (Fig. 3b) and *Smed-foxN(P)*, respectively (P meaning specific of Platyhelminthes) (Fig. S5). In this analysis the N subfamily was found to be specific to Tricladida, while the A(P) subfamily was also found in other Platyhelminth orders.

Based on these analyses we have identified and classified all FKH containing genes of *Smed*, including the ones already published, which in some cases have been reclassified according to our analysis. Thus, the previous *Smed-foxQ2*⁴⁹ is now classified as *Smed-foxQD*, and the previous *Smed-Albino*⁵⁰ gene is now renamed as *Smed-foxP*. The new classification of all *Smed* Fox genes can be found in Table 1 (also in S1 Table). We did not relate the subclassification of family genes between species, since it could cause a misleading annotation (i.e. *foxD2* genes of *Smed* and *Hsap* are not directly homologs). The analysis of their protein domains shows that in addition to the FKH domain, the K family genes also contained the Forkhead associated domain (FHA) and the P family also showed a related coiled coil. Most of the proteins were enriched in nuclear localization signal (NLS) and/or nuclear export signal (NES), in accordance with their function as TFs (Fig. S6).

Thanks to this new analysis, we could also confirm the loss of several Fox families in planarians (the AB, B, E, H, I, Q1, Q2, M and N1/4 families) and we could determine that most of this family losses found in planarians predate the emergence of the Platyhelminthes phylum. Besides the family losses earlier mentioned (Fig. 2), Tricladida additionally lost the J2/3 family. Interestingly, Tricladida (see turquoise lines in Fig. 4) have doubled the FKH-containing genes compared to the other Platyhelminthes, while the number of families remained constant, supporting an intrafamily diversification of Fox genes in this group (Fig. 4).

To note, the new QD family found in this study was found to be present in all Platyhelminthes, while the Q2 family is lost in all of them. To better decipher the relation between the new QD family and Q2 family, we performed a new phylogenetic analysis (Fig. 5). Increasing the number of species used outputted more confident Bayes and Bootstrap node values, supporting that a new Fox family has been uncovered, which is present in most Metazoa, including Platyhelminthes. Some genes misannotated in other families, such as Q2, B and I were reannotated as QD (Table 2, S1 File).

***Schmidtea mediterranea* Fox genes appear not to be linked in the genome and to have drifted through evolution.**

Regarding the relative position of Fox genes in the genomes of Metazoa, we can see how some of them typically present a linkage such as in the case of the families D-E or C-F-L1-Q1, which in other species is shown to cover different interval regions, from 20 to 300 kb^{26,52, 53}. When comparing their genomic position relative to other coding genes, Irimia et al.⁵⁴ demonstrated that some of the Fox genes had retained microsynteny across metazoans with a variety of genes. Although the *Smed* genome²⁷ is not assembled

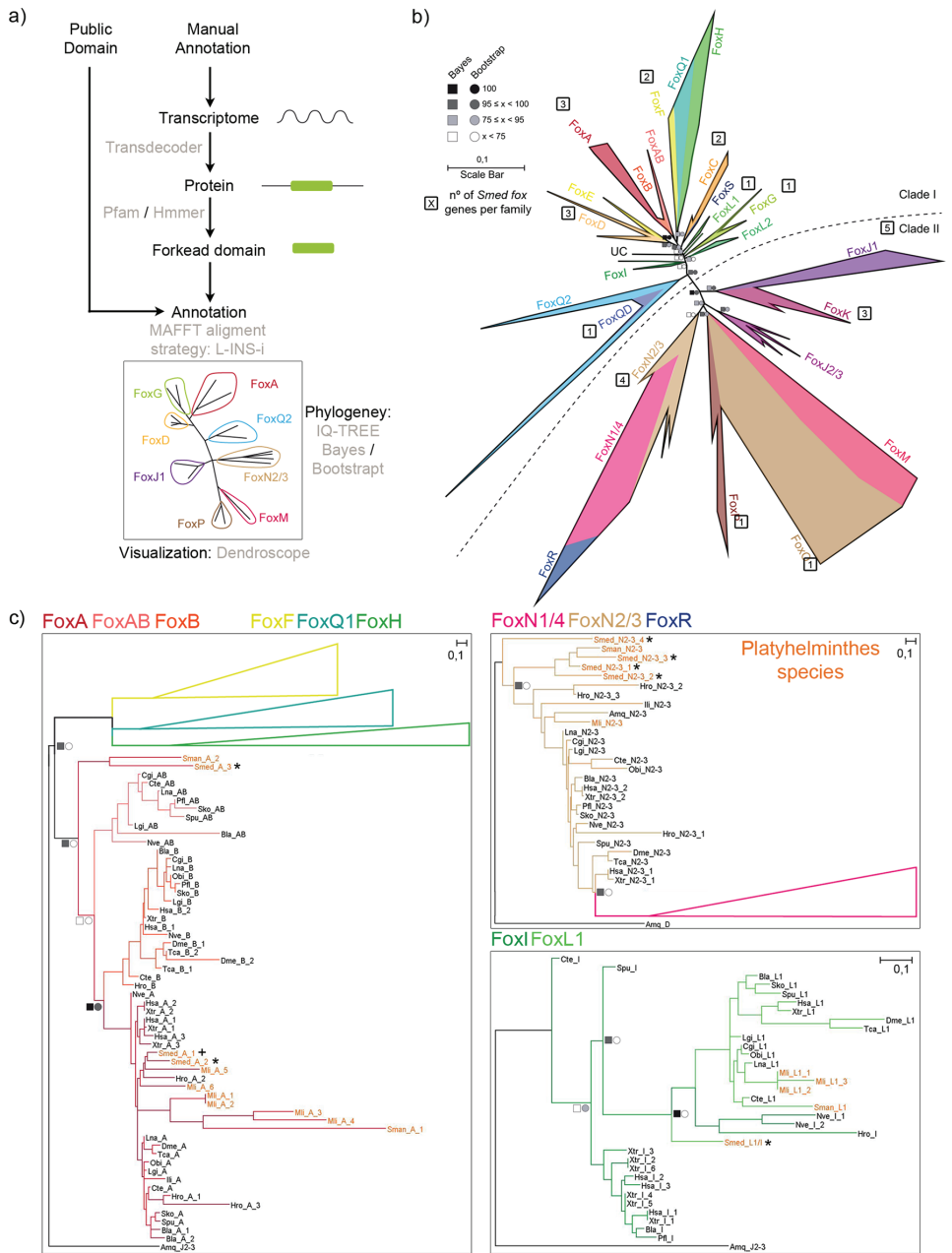


Figure 1. Fox family evolution in Metazoa reveals 27 Fox genes in *Schmidtea mediterranea* divided in 12 families. (a) pipeline annotate Fox genes. (b) The ML phylogenetic trees based on FKH. Number of genes per family in *Schmidtea mediterranea* is indicated inside a square next to each family. At nodes, values for the approximate Bayes (square) and Likelihood (circle) ratio test are shown. Colour indicates % of confidence. Family tree branches were collapsed at the base of the common node. One gene was unclassified in any family (UC). Dashed line divides Clade I and Clade II Fox genes. (c) For each node-sharing families, a phylogenetic tree was created using an *Amq* gene from the opposite clade as out group. Family branches are painted with the same colour as they are represented in the trees. Platyhelminthes genes are coloured light orange. Dark crosses indicate previous characterized genes and dark asterisks indicate new fox characterized in *Schmidtea mediterranea* (*Smed*). Aminoacidic sequences used are found in S1 File. Scale indicates expected aminoacidic substitution per site.

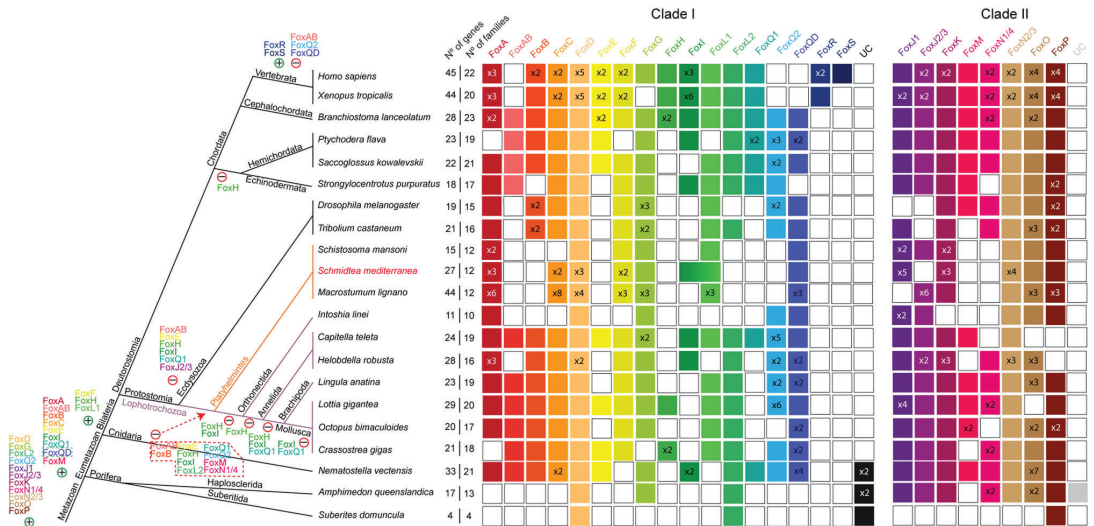


Figure 2. Distribution of Fox homologs in Metazoan clade indicating gene and family losses and some gene duplications in *Schmidtea mediterranea*. Coloured boxes indicate the presence of an ortholog based on the phylogenetic analysis. When there were no evidences of ortholog, the box remained white. A number (x N°) inside a box indicates paralogs per family and species. Families are divided in Clade I and II. Number of genes and number of families per species are indicated. Metazoan⁴⁷ and Lophotrochozoa⁴⁸ phylogenies were used. Light purple lines indicate lophotrochozoan species and within light orange indicate Platyhelminthes superphylum species. Gains (+) and losses (-) of genes are placed next to each clade. Main Clade I Fox acquisition was at the base of Eumetazoa and different events of gains and losses happened through evolution. Specifically, many families were lost in Platyhelminthes (red dashed polygon).

at chromosome level, we examined the genomic neighbourhood of *Smed* Fox genes. The only genes present in the same scaffold were *foxD2* and *foxA1* with ~187 kb of distance between them (S1 Table). Although the distance is less than the 0.1% of genome size⁵² there are no other reports of A-D family linkage, meaning that no canonical Fox genes linkages are found in this assembly version of *Smed* genome. In order to verify if, despite this, there was some level of microsynteny conservation, we took an orthology-based approach similar to the one used to identify orthologous lincRNAs between distant species⁵⁵ using humans as a comparison, as well as manually checking the existence of already described microsyntenic pairs. In both cases, we found no conserved microsynteny (S5 File). Additionally, we decided to perform whole-genome alignments between the different scaffolds to examine the inter-paralog syntenic relationships (Figs. 6, S7). However, the synteny seems to be broken in all cases with most of the alignments falling exclusively into repeating elements such as LINES.

Our data suggest that the Fox families found to be linked in other species (C-F-L1-Q1 and D-E)^{26,52} are not linked in *Smed*, and *Smed* Fox genes show no microsynteny with described genes. However, this analysis should be repeated when the genome of *Smed* is completely assembled.

***Smed-foxO* controls cell death in planarians.** The expression pattern and function of most *Smed* Fox genes remain unstudied. We performed an exhaustive analysis of their expression pattern by in situ hybridization and by an *in-silico* search in the SCSeq databases^{56,57}, as well as a functional screening through RNAi. The results show a tissue-specific pattern of expression for most of the genes which could give clues about their function (Figs. S8–S10, S1 Table). RNAi inhibition produced regenerative defects that were mild in some of them (Fig. S11) but obvious in others, which could not regenerate proper eyes nor CNS (Fig. S12). For instance, *foxD3* was expressed in GABAergic neurons according to the SCSeq databases (Fig. S8) and when inhibited produced strong regenerative defects in the brain (Fig. S12, S1 Table). Both Platyhelminthes/planarian specific *foxA(P)* and *foxN(P)* showed strong phenotype after inhibition (Fig. S12). *foxA(P)* was expressed in ‘activated early epidermal progenitors’ according to the SCSeq databases (Fig. S8) and when inhibited animals could hardly regenerate nor anterior or posterior wounds, giving rise to small animals (Fig. S12). *foxN(P)* was expressed in brain branches and epidermal cells (Fig. S9), and when silenced animals did not regenerate eyes and presented a smaller brain, suggesting that RNAi animals presented neural regenerative defects (Fig. S12).

We found particularly interesting the discovery of a unique copy of *foxO*, which is the homolog of *daf-16* in *C. elegans*, known for its role in increasing longevity⁵⁸. Nowadays *foxO* is known to be crucial in controlling metabolism and oxidative stress and also participates in the regulation of genes related to tissue repair and homeostasis⁴¹. Thus, we wondered whether *Smed-foxO* could have a role in controlling tissue regeneration and homeostasis as well in planarians. First, we found that *Smed* FOXO conserves the three specific sites (Fig. S13a), that under nutrient rich conditions are phosphorylated by AKT and lead to its ubiquitin degradation^{59, 60}. To

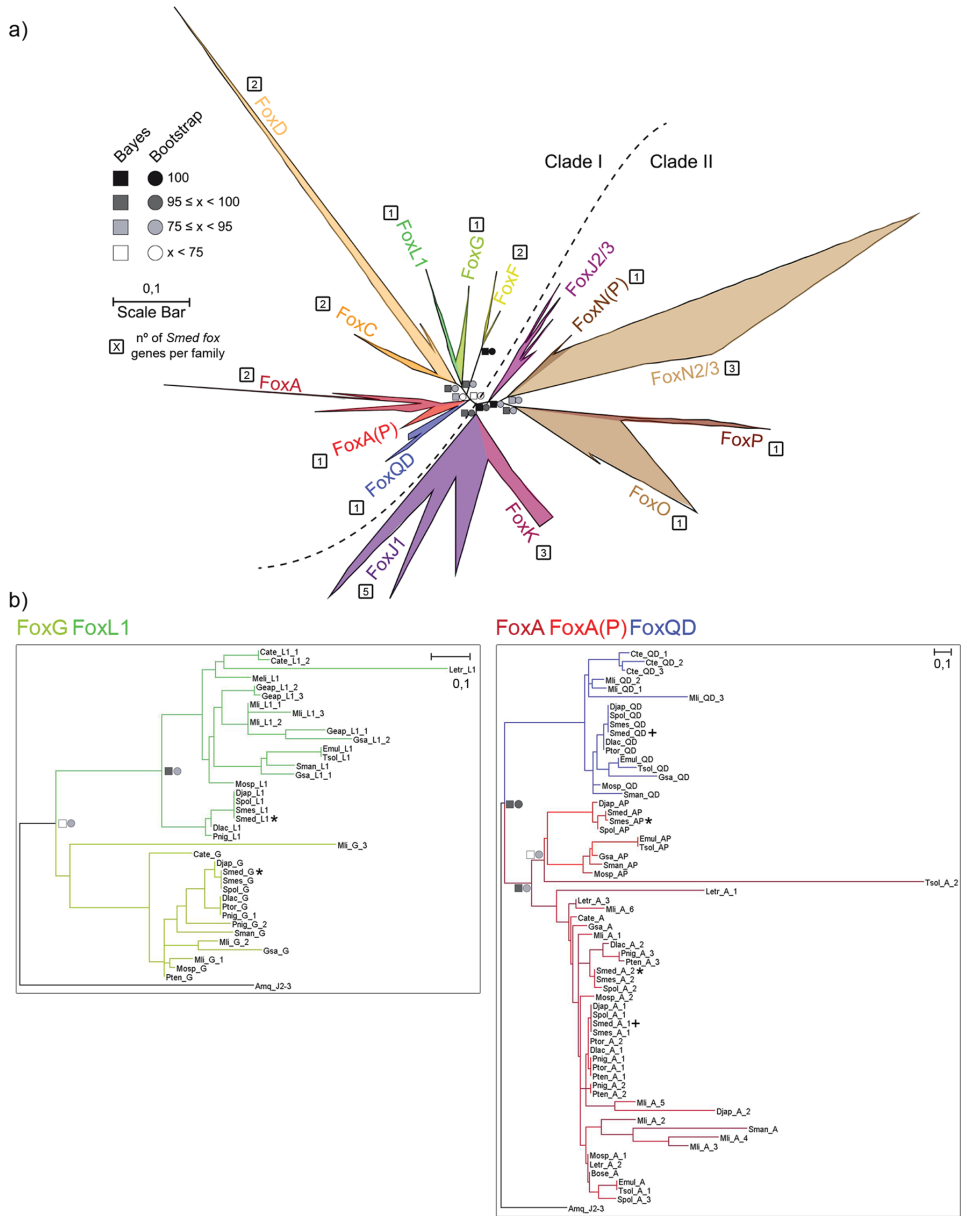


Figure 3. Fox family evolution in Platyhelminthes indicates family diversification. **(a)** The ML phylogenetic trees based on FKH of Fox family evolution in Lophotrochozoan clade. Number of genes per family in *Schmidtea mediterranea* is indicated inside a square next to each family. At nodes, values for the approximate Bayes (square) and Likelihood (circle) ratio test are shown. Colour indicates % of confidence. Family tree branches were collapsed at the base of the common node. Dashed line divides Clade I and Clade II Fox genes. **(b)** For each node-sharing families, a phylogenetic tree was created using an *Amq* gene from the opposite clade as out group. Family branches are painted with the same colour as they are represented in the trees. Dark cross indicates previous characterized gene and dark asterisk indicates new fox characterized in *Schmidtea mediterranea* (*Smed*). Aminoacidic sequences used are placed in S3 File. Scale indicates expected aminoacidic substitution per site.

| Family | New gene name | Previous name | Gene Bank ID |
|--------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| A | <i>Smed-foxA1</i> | <i>Smed-FoxA</i> | JX010556 / BK013013 |
| | <i>Smed-foxA2</i> | | BK013028 |
| | <i>Smed-foxA(P)</i> | | BK013026 |
| C | <i>Smed-foxC1</i> | | BK013019 |
| | <i>Smed-foxC2</i> | | AY967492 / BK013022 |
| D | <i>Smed-foxD1</i> | <i>Smed-FoxD</i> | KC577557 / BK013024 |
| | <i>Smed-foxD2</i> | | BK013027 |
| | <i>Smed-foxD3</i> | | BK013021 |
| F | <i>Smed-foxF1</i> | <i>Smed-FoxF</i> | KJ934801 / BK013018 |
| | <i>Smed-foxF2</i> | <i>Smed-FoxF-1</i> | BK013034 |
| G | <i>Smed-foxG</i> | | BK013020 |
| L1 | <i>Smed-foxL1</i> | | BK013023 |
| Q/D | <i>Smed-foxQ/D</i> | <i>Smed-FoxQ2</i> | JX091076 / BK013031 |
| J1 | <i>Smed-foxJ1-1</i> | <i>Smed-FoxJ1-1</i> | JX842843 |
| | <i>Smed-foxJ1-2</i> | <i>Smed-FoxJ1-2</i> | JX842844 |
| | <i>Smed-foxJ1-3</i> | <i>Smed-FoxJ1-3</i> | JX842845 |
| | <i>Smed-foxJ1-4</i> | <i>Smed-FoxJ1-4</i> | JX842846 |
| | <i>Smed-foxJ1-5</i> | | BK013017 |
| K | <i>Smed-foxK1</i> | | BK013030 |
| | <i>Smed-foxK2</i> | | BK013032 |
| | <i>Smed-foxK3</i> | | BK013035 |
| N2/3 | <i>Smed-foxN2/3-1</i> | | BK013014 |
| | <i>Smed-foxN2/3-2</i> | | BK013016 |
| | <i>Smed-foxN2/3-3</i> | | BK013029 |
| | <i>Smed-foxN(P)</i> | | BK013015 |
| O | <i>Smed-foxO</i> | | BK013025 |
| P | <i>Smed-foxP</i> | <i>Smed-Albino</i> | KX531078 / BK013033 |

Table 1. Fox genes in *Schmidtea mediterranea*. New and previous names of Fox genes in *Smed* are shown, with their corresponding GeneBank Ids.

check whether in planarians this mechanism is conserved, we quantified *foxO* levels in fed animals. qPCR quantification demonstrated that *foxO* was down-regulated in fed conditions (Fig. S13b). Altogether, suggested that the AKT-dependent mechanism of *foxO* regulation could be conserved in planarians. Then, we found *Smed-foxO* expressed ubiquitously and according to the SCSeq databases it was present in several cell types, such as neoblasts, neurons, parenchymal, secretory and epidermal cells (Fig. S9–S10, S1 Table). Through RNAi inhibition, we found that in regenerating animals *foxO* RNAi inhibits the differentiation of the eyes and the proper regeneration of the brain (Fig. S13c). To gain insight into its function in tissue renewal, we inhibited it by RNAi in intact starving animals. qPCR demonstrates *Smed-foxO* mRNA downregulation in *Smed-foxO* (RNAi) animals (Fig. S13d). After two weeks of inhibition half of knockdown animals presented unpigmented zones, areas in which the brown pigment of epidermal or eye cells is lost (Fig. 7a). Analysis of the CNS (anti-synapsin) and the pharynx (DAPI) demonstrates that those structures are smaller and not properly maintained in *Smed-foxO* RNAi animals (Fig. 7b). The problems in tissue turnover could arise by unpaired cell proliferation and/or cell death. To test these possibilities, we analysed M phase cells through PH3 staining, and apoptosis by TUNEL and caspase-3 assay. Cell proliferation was unaffected after two weeks of inhibition (Fig. S13e). However, both TUNEL and caspase-3 assays demonstrate that the apoptotic response that normally takes place in starved planarians, which are shrinking, was inhibited in *Smed-foxO* RNAi animals (Fig. 7c,d). To confirm the pro-apoptotic role of FoxO in planarians we quantified the levels of the pro-apoptotic gene *bak*, which is a reported target of *foxO*⁶¹. qPCR quantification shows their downregulation in *foxO* (RNAi) animals (Fig. S13f). A decrease in cell death that is not balanced by an increase in cell proliferation must end up with an increase in the number of cells. We found that *foxO* (RNAi) planarians reduced their size equivalently to control animals (Fig. S13g). However, the quantification of cells in the epidermis demonstrates an increase in cell density in the RNAis (Fig. S13h). Furthermore, we observe that epidermal cells are disorganized.

Overall, these results demonstrate that *Smed-foxO* is necessary for planarian cell turnover through the control of cell death but not cell proliferation.

Discussion

The Fox genes in Metazoa: a story of early gains and specific losses. The Fox genes evolution has been a field of interest since their discovery. Although quite rich in different families, it seems that the ancestral Fox gene was remarkably similar to the J1 family. This family has been proposed as the original Fox family, giving rise to the rest of families by gene expansion and duplication⁴². Few Fox genes have been identified in

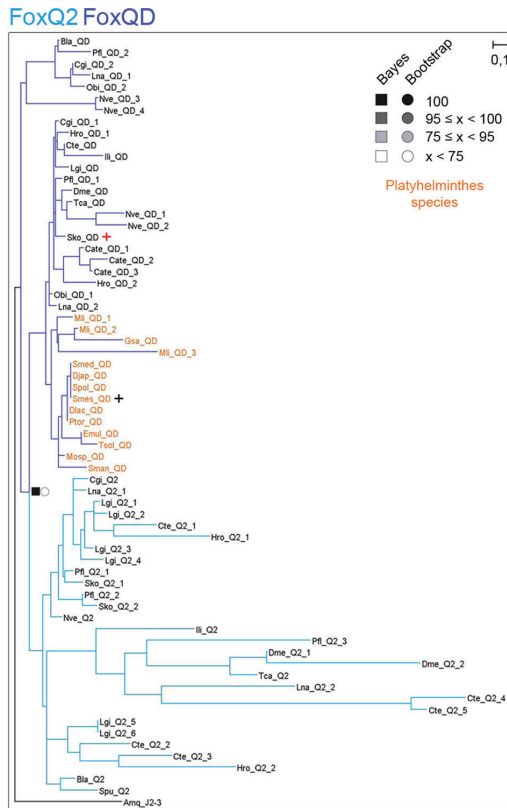


Figure 5. New family FoxQD is broadly found in Metazoa but missing in Vertebrata and Porifera. The ML phylogenetic trees based on FKH of Q2 and QD family evolution in all metazoan species studied in this work. At nodes, values for the approximate Bayes (square) and Likelihood (circle) ratio test are shown. Colour indicates % of confidence. An *Amq-J2/3* from the opposite clade was used as out group. Family branches are painted with the same colour as they are represented in the trees. Dark asterisk indicates a new fox characterized in *Schmidtea mediterranea* (*Smed*). Red cross indicates *Saccoglossus kowalewski foxQD* gene. Platyhelminthes QD genes are coloured light orange. Aminoacidic sequences used are placed in S1 and S3 File. Scale indicates expected aminoacidic substitution per site.

two new subfamilies were only present in the Platyhelminthes superphylum. We have considered them to be Platyhelminthes-specific subfamilies as they still cluster together with their main branch, but do not mix with the other members. In the case of the N(P), it appears to be Triclad-specific. However, a more exhaustive phylogenetic analysis should be performed to support this observation. We propose that the huge losses that took place before the origin of this clade may have caused the duplication and divergence that ultimately lead to the formation of the A(P) and N(P) subfamilies. According to the SCSeq databases both genes are expressed in specific cells populations; *foxA(P)* in 'activated early epidermal progenitors' and *foxN(P)* in epidermic, GABAergic and secretory 2 cells, which could agree with its functional specialization after duplication. The RNAi analysis demonstrates they have an important role during regeneration, but further studies are required to investigate their specific role during planarians regeneration.

Tricladida may have suffered a genome reorganisation. Regardless of the extensive above-mentioned variations in family numbers due to gains and losses, the number of Fox genes present across organisms seems to be constant. The conserved number is roughly 23 genes with some obvious exceptions such as humans or sponges (Fig. 2). This regularity may seem surprising, but as Fernandez and Gabaldon⁶⁹ pointed out, family losses are usually compensated by gene duplications of the remaining family members (as appears to be the case in Platyhelminthes). We cannot discard the possibility that family losses were compensated by the emergence of de novo genes, which could cluster in pre-existing families due to artefacts of the clustering methods⁶⁵. Another interesting aspect to examine is the relation between the number of Fox genes and the number of Fox families. When we study this connection in Platyhelminthes we find the opposite; the number of families remains constant while the number of Fox genes increases in Tricladida (Fig. 4). This could be explained in three ways: i)

| Species | n° FoxQD | Annotation | | |
|----------------------------------|----------|------------|----|---------------|
| | | New | Re | Previous |
| <i>Branchiostoma lanceolatum</i> | 1 | | x | FoxD3 |
| <i>Ptychodera flava</i> | 2 | x | | |
| <i>Saccoglossus kowalevskii</i> | 1 | | | |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | 1 | | x | Non annotated |
| <i>Tribolium castaneum</i> | 1 | | x | FoxA1_B-like |
| <i>Schistosoma mansoni</i> | 1 | x | | |
| <i>Schmidtea mediterranea</i> | 1 | | x | FoxQ2 |
| <i>Macrostyum lignano</i> | 3 | x | | |
| <i>Intoshia linei</i> | 1 | x | | |
| <i>Capitela teleta</i> | 1 | | x | FoxQ2_Lb |
| <i>Helobdella robusta</i> | 2 | x | | |
| <i>Lingula anatina</i> | 2 | x | | |
| <i>Lottia gigantea</i> | 1 | | x | FoxQ2b |
| <i>Octopus bimaculoides</i> | 2 | x | | |
| <i>Crassostrea gigas</i> | 2 | | x | FoxB/FoxI |
| <i>Nematostella vectensis</i> | 4 | x | | |

Table 2. New annotation of QD genes in different metazoan species. Number of paralogs per species is indicated. They are classified as New or Re-annotated genes. In this case, the previous family is shown.

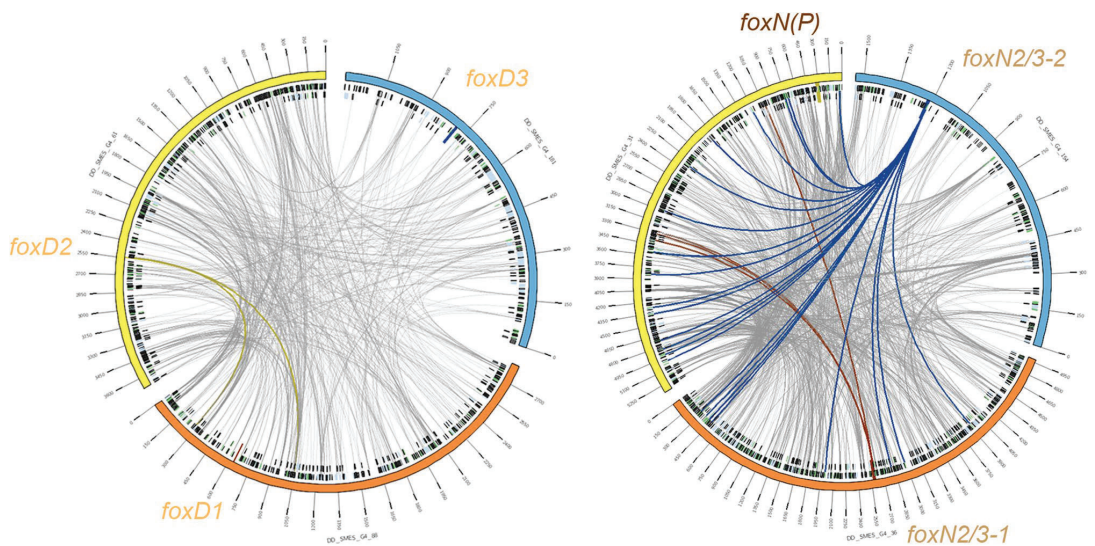


Figure 6. Fox paralogs do not present syntenic relationships in *Smed* genome. Alignments between scaffolds containing same-family Fox genes are represented with Circos. The Circos representation is composed of two tracks: In the outer ring the scaffolds containing Fox genes are labelled with their name (each tick representing 150 kb); in the inner ring, the repeating elements²⁹ coloured in green (LINES), blue (TLR) and black (simple repeats and other). Repeats are filtered to be shown only when greater than 1 kb. Grey lines connecting the scaffolds are the representation of the alignments, filtered to be shown only when greater than 1 Kb. In each scaffold, the region corresponding to the Fox gene (+ -5 Kb) is represented as a perpendicular darker region, and all the links that fall onto it are coloured accordingly.

several tandem duplications occurred before the branching of Tricladida, ii) a partial genome duplication event happened and affected the Fox genes, iii) a whole genome duplication (WGD) event happened. Currently, we do not have enough data to support any of these hypotheses. Other studies that have found gene duplications in Platyhelminthes species propose that WGD events could have occurred^{63,64,70,71}. In *Smed*, we found every Fox gene in a different scaffold (except for *foxA1* and *foxD1*) and we could not find any trace of microsynteny retained in the Fox gene regions, not even within the *Smed* genome comparing paralogs-containing scaffolds. It must be

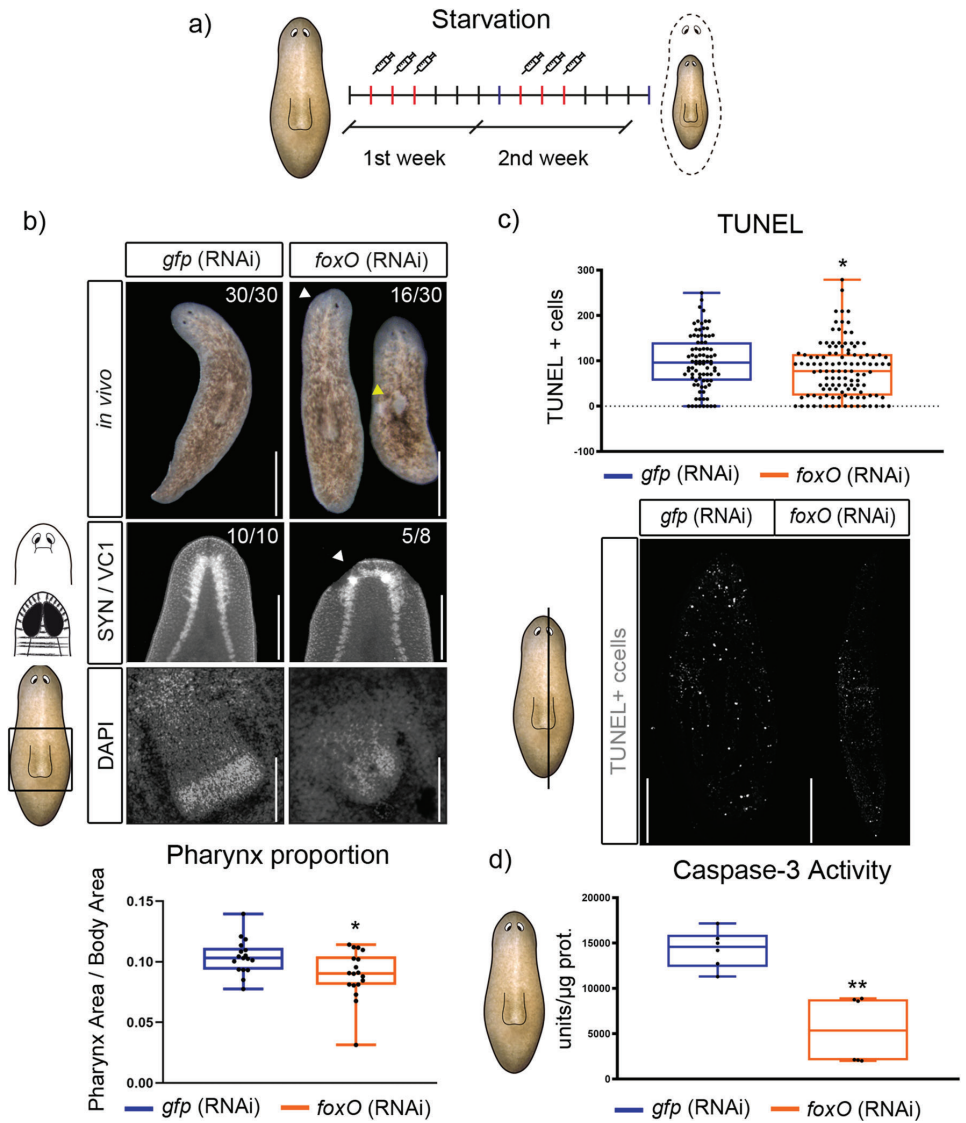


Figure 7. Starving *foxO* (RNAi) animals show tissue disruption and a reduction of cell death. (a) Schematic depicting RNAi procedure. (b) 50% of *in vivo* *foxO* knockdown animals presented unpigmented regions (white arrow), neural tissue disappearance (yellow arrow in synapsin immunoassayed animals, and pharynx size reduction, as shown by DAPI staining and relative size quantification (controls, $n = 17$; RNAi, $n = 18$; $*P < 0.05$). (c) Quantification of TUNEL + cells on transversal sections show a reduction of positive cells in *foxO* (RNAi) animals compared to controls (controls, $n = 86$; RNAi, $n = 117$; $*P < 0.05$). (d) Quantification of caspase-3 activity in *foxO* (RNAi) animals and controls shows cell death reduction (controls, $n > 6$; RNAi, $n > 6$; $**P < 0.01$). Scale bars: b up and mid = 100 μ m and down = 10 μ m; c = 100 μ m.

noted that although the *Smed* genome is not completely assembled but is still fragmented in 481 scaffolds, most of the scaffolds interrogated were more than 3 Mb long and only two of them shorter than 1 Mb. Thus, in the *Smed* genome we cannot observe any indicator of WGD although a massive reorganization, erasing any trace of it, could have occurred. For clarification, we would need a number of Tricladida available genomes of sufficient quality. Regrettably, the *Smed* genome is the only high quality Tricladida genome currently accessible.

Specificity of Fox genes families expression and function. The identification of the complete set of Fox genes in *Smed* together with the analysis of the expression pattern and function of the newly identified genes provides a more complete view of the function of each fox gene and family. Some results agree with an evolutionary conserved role of fox families and others do not. For instance, the A family mostly participates in endoderm specification during gastrulation, notochord formation in vertebrates or pharynx formation in cnidarians and planarians^{72–76}. Accordingly, in *Smed*, *Djap* and *Spol*, foxA1 is expressed in the pharynx, and particularly in *Smed* it was demonstrated to be fundamental for its specification^{33,77,78}. However, we found foxA2 expression in neuronal cells in the dorsoventral margin and foxA(P) in epidermal cells. Families C-F-L1-Q1 usually cluster together in the genome and participate in the development of mesoendodermal tissues in many organisms^{43,79}. We found no gene cluster arrangement of C-F-L1 families, but those genes might conserve their function determining mesoendodermal tissues in *Smed*, since their expression correlates with muscle cells and, particularly, foxF2 regulates a specific pharynx muscle type^{80,81}. The D family is expressed in notochord and neural crest in chordates, in intestinal precursors in *C.elegans*⁸² and in the nervous system in *Drosophila melanogaster*⁸³. In *Smed* and *Djap*, foxD1 is expressed in anterior muscle cells and participates in the anterior face decision^{84–86}. foxD2 and foxD3 were found in neurons and muscle cells, respectively. Accordingly, after knocking down foxD2, planarians presented strong regenerative defects in the SNC. The J1 family was broadly found in ciliated cells in different animals and tissues^{87,88}. In *Smed*, foxJ1–4 were found expressed in ciliated cells in different epidermal patterns³⁷; and the new foxJ1–5 is found in the epidermis, neuronal and protonephridia cells, suggesting a conserved function of the family in ciliated cells. In vertebrates, the K family has been found expressed in mesodermal and ectodermal tissues^{89,90}. In *Smed*, foxK1–3 were found in the nervous system and in parenchymal or secretory cells. Interestingly, after the inhibition of three K genes, planarians presented regenerative defects in the nervous system, suggesting that all three genes have maintained a role controlling neurogenesis.

Overall, the integration of the current data regarding Fox families suggests that the expansion of families often results in expression and functional diversification.

Cell death regulation by *Smed-foxO* is conserved in planarians. Several Fox families have been lost or have been expanded in Platyhelminthes. Interestingly, the FoxO family is one of the few that shows a unique family member. FoxO has crucial roles in controlling molecular process related with aging and cancer^{41,69}. FoxO senses oxidative stress and responds through regulating cell motility, stress resistance, or cell death⁹¹. FoxO also has a conserved role in maintaining cellular energy homeostasis by coordinating cellular supplies and demands³⁹. When nutrients are available, InsulinR is activated and FoxO is phosphorylated by AKT, which inhibits its entrance into the nucleus^{59,60}. Under conditions of growth factor limitation or other stresses, FoxO enters the nucleus and inhibits mTORC1. Our data shows that *Smed-foxO* is probably regulated by AKT, since it conserves the phosphorylation domains and, furthermore, *Smed-foxO* RNAi inhibition impairs the apoptotic response, which is the opposite phenotype described after AKT RNAi in planarians⁷⁷. Thus, it could be proposed that in starved planarians, the limitation of nutrients inhibits the insulin pathway and AKT, allowing for the increase in levels of unphosphorylated *Smed-foxO* that can enter the nucleus. In the nucleus, *Smed-foxO* activates the apoptotic response required in starved planarians to trigger degrowth^{93–98}. In *Smed-foxO* (RNAi) animals this transcriptional activity cannot take place and neither can the apoptotic response. The reduction of cell death after foxO inhibition appears to be evolutionarily conserved as it has been also observed in *Hydra*⁹⁹, *C.elegans*^{100,101}, *Drosophila melanogaster*^{20,102} and in various mammal tissue types^{103–106}. Although the mRNA expression of foxO is found in specific cell types its regulation can take place post-transcriptionally¹⁰⁷, thus with the present data we cannot discern about the contribution of specific tissues to the RNAi phenotype observed in this study. Since we have observed that epidermal cells are disorganized, and this is one of the cell lineages where foxO is expressed, we could hypothesize that a decrease in cell death in this cell type could contribute to the phenotype observed.

Smed-foxO could also be regulated by other pathways as the Sirtuin family¹⁰⁸, which senses cellular metabolic state and acetylates FoxO (activation). Recently, Ziman et al. have demonstrated in planarians that upon starvation and after *sirtuin-1* inhibition (foxO inhibition) animals display a reduction in cell death⁹⁷.

The cellular REDOX state is not only essential for cellular homeostasis but it is necessary to activate the regenerative response in several models, as well as in planarians¹⁰⁹. In this study we have shown that *Smed-FoxO* is also required for proper regeneration, but further studies are required to test whether it also senses ROS levels both in regenerating and in intact planarians.

Conclusions

As we acquire more information on the presence of the TF Fox family across metazoan species, it becomes clearer that some Fox genes originated at the base of metazoans followed by different events of gene loss and diversification as proposed by^{42,69,110}. Following this thread, as the number of annotated Fox genes increase, our ability to classify them also improves up until the point where ideally no Fox would be misannotated. In the past, these errors in the annotation led to a misunderstanding of the evolution of conserved functions in different Fox families.

In this study, the new annotation allowed for the proposal of a new family present in most metazoans, the FoxQD, as well as phylum-specific families exclusively found in Platyhelminthes. The appearance of phylum-specific families might not be unique to Platyhelminthes and could have happened several times throughout evolution. To prove this theory, there is a need of a better Fox gene annotation from all across the metazoan species. Besides, the proper phylogeny of these genes is not the only benefit. Having better annotated Fox genes in different key species will also help us to understand how different gene regulatory networks and developmental processes could have evolved.

Schmidtea mediterranea is a unique model that raises developmental questions in an evolutionary context due to its position in lophotrochozoans, an under-studied clade, and due to its stem cell-based plasticity. The identification of 27 genes divided into 12 families will give us the bases from which to understand how the TFs take part in the regulation of key molecular pathways that control major developmental roles. In particular, in this study we proved that *Smed-foxO*, which in contrast to other families is constantly present in metazoans, is evolutionary conserved to regulate cell death.

Finally, the identification of complete gene families in *Smed* will also help to understand the evolution of planarians and Platyhelminthes. Here we have seen how in the order Tricladida the number of Fox genes increased while the number of families was retained. However, we could not find traces of neither a genome (whole or partial) duplication event nor tandem duplications of the Fox genes. This indicates that in planarian ancestors a genomic reorganisation could have occurred. A larger amount of Platyhelminthes and Tricladida genomes are needed to clarify these evolutionary scenarios.

Methods

All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

Experiments were performed with planarians, flatworms that do not require specific approvals.

Sequence and phylogenetic analyses. For generating the phylogenetic trees, we first obtained the FOX protein sequences from several different sources. In some of the cases we were able to collect them from the public databases, like in the case of *Hsa* or *Xtr* (S2 Table). For the rest of the organisms a manual annotation was required. If the only resource available was a transcriptome, like in the case of *Tsol*, we used Transdecoder (v5.5.0) to obtain the translated proteins. Using HMMER with default parameters and a cutoff ϵ -value of $1e-4$ (v3.1b2) and the Pfam¹¹¹ motive of the Forkhead domain (PF00250.13), we extracted the Forkhead-containing proteins.

The whole set of translated proteins was aligned again using MAFFT¹¹² with the L-INS-i strategy and the aligning Forkhead domain was selected. This alignment was the input used for IQ-TREE¹¹³ to generate the phylogenetic tree. The options used to run the webserver of IQ-TREE were the ones by default, including the automatic substitution model selector and the ultrafast bootstrap analysis, except for the number of bootstrap alignments (set at 2500), the single branch test number of replicates (set at 2000) and the approximate Bayes test option (selected). The trees were visualized using Dendroscope3 v3.6.3¹¹⁴ with the default parameters.

For *Smed* FOX domains disposition architecture the NCBI web server was used (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) to identify FKH, FHA and FOXP coiled coil;¹¹⁵ and¹¹⁶ were used to identify NLS and NES, respectively.

Paralog analysis. The homology relationships between *Smed* and human was assessed with the best hit in a two-way blast (v2.6.0) search against human RefSeq transcripts. For the analysis of *Smed* scaffolds, a blast of the whole genome against the whole genome with the parameters “-evalue $1e-20$ -word_size 100” was performed, and then the data was visualized using Circos (v0.69-9), adding a track for repeating elements. Both, the links and the repeats were filtered for only rendering those greater than 1 Kb.

Animal maintenance. Asexual clonal strain of *Smed* BCN-10 biotype were maintained in PAM water¹¹⁷ as previously described¹¹⁸. To keep planarian population, animals were fed twice per week with liver, and starved for a week before being used in any experiment.

Isolation of Fox genes and quantitative real-time PCR. In any experiment, TRIzol reagent (Invitrogen) was used to extract total RNA from intact planarians, and cDNA was synthesized as previously described in⁹⁸. Fox genes PCR fragments were cloned into pGEM-T Easy (Promega) vector for dsRNA synthesis or pCRII (Life Technologies) vector to ssRNA synthesis. Nucleotide sequence data reported are available in the Third Party Annotation Section of the DDBJ/ENA/GenBank databases under the accession numbers TPA: BK010973-BK010987. Quantitative real-time PCRs were performed on 7500 Fast PCR System (Applied Biosystems), experiments were conducted using 3 biological and 3 technical replicates for each condition. Expression levels were normalized to that of the housekeeping gene *ura4*. All primers used in this study are shown at S6 File.

Whole-mount in situ hybridization. SP6 or T7 polymerase and DIG- or FITC- modified (Roche) were used to synthesise RNA probes in vitro. For colorimetric whole-mount in situ hybridization (WISH) the previously described¹¹⁹ protocol was followed. Animals were sacrificed with 5% *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), fixed with 4% formaldehyde (FA), and permeabilized with Reduction Solution.

RNAi experiments. Double strand RNA (dsRNA) was synthesised by in vitro transcription (Roche) as previously described¹²⁰. Injections of dsRNA (3×32.2 nl) were carried into the digestive system of each animal on 3 consecutive days per week using Nanoject II injector (Drummond Scientific Company). Experiments in intact animals were conducted with starved animals undergoing 2 consecutive weeks of injection, without amputation. In regenerating experiments, animals underwent two weeks of inhibition and amputation. *gfp* was injected as a control.

Immunohistochemistry staining. Whole-mount immunohistochemistry staining was performed as previously described¹²¹. Animals were sacrificed with 2% HCl and fixed with 4% FA. Animals were blocked in

1% bovine serum albumin (BSA) in 1X PBSTx 0,3% (Blocking Solution) for 2 h at RT. Primary antibodies were diluted in blocking solution and incubated 16 h rocking at 4 °C. Then, washes were performed for at least 4 h. Secondary antibodies were diluted in blocking solution for 16 h rocking at 4 °C.

The following antibodies were used in these experiments: mouse anti-synapsin (anti-SYNORF1, 1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA), rabbit anti-phospho-histone H3 (Ser10) (D2C8) (PH3) (1:500; Cell Signaling Technology) and mouse anti-VC1 (anti-arrestin, 1:15,000, kindly provided by Professor K. Watanabe). The secondary antibody used was Alexa 488-conjugated goat anti-mouse (1:400; Molecular Probes, Waltham, MA, USA) and Alexa 568-conjugated goat anti-rabbit (1:1000; Molecular Probes, Waltham, MA, USA). Nuclei were stained with DAPI (1:5000; Sigma).

Caspase 3 activity assay. At the end of the second week of RNAi inhibition, protein extraction was performed. BioRad protein reagent was used to obtain protein concentration of the cell lysates. Fluorometric analysis of caspase-3 activity was performed as described previously¹²². Fluorescence was measured in a luminescence spectrophotometer (Perkin- Elmer LS-50) using Fluostar Optima microplate fluorescence reader (BMG Labtech), applying the following settings: excitation, 380 nm; emission, 440 nm. 20 mg of protein extract was used to determine enzyme activity, incubating for 2 h at 37 °C with 20 µM caspase-3 substrate Ac-DEVD-AMC or 2 ml from a stock of 1 mg/ml for a final volume of 150 µl. Three technical replicates were analysed per condition.

TUNEL assay on paraffin sections. Animals were sacrificed with 2% HCl and fixed with 4% PFA. Paraffin embedding and sectioning were carried out as previously described in¹²³. Slides were de-waxed and re-hydrated as previously described in¹²⁴. Sections were treated as described previously in¹²⁵ and after the dewaxing step, they were incubated with Proteinase K (20 µg/ml for 10 min at room temperature). Finally, the ApopTag Red In situ Apoptosis Detection Kit (CHEMICON, S7165) was used, following manufacturer's protocol. Nuclei were stained with DAPI (1:5000; Sigma).

Imaging and quantification. WISH images were captured with a ProgRes C3 camera from Jenoptik (Jena, TH, Germany). In vivo images were obtained using Scmex 3.0 camera in a Zeiss Stemi SV 6 binocular loupe and measured using Fiji Y. A Zeiss LSM 880 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) was used to obtain confocal images of whole-mount immunostainings, TUNEL staining and epidermal sections. Representative confocal stacks for each experimental condition are shown. Cell counting of PH3+ and TUNEL staining was carried out by eye quantification in a previous defined area of each animal. Areas are schematically indicated in each figure. The total number of PH3+ cells was divided by the animal area. For TUNEL quantification, TUNEL positive cells were counted in at least 30 representative transversal sections per animal. The number of positive cells were divided by the mean area of the all sections in each animal. For epidermal cell density, the number of nuclei were manually counted and divided per the total image area. Images were blind analysed and later grouped according to each genotype. At least two animals were analysed per condition.

Statistical analysis and presentation. Statistical and presentation analyses were performed using GraphPad Prism 8. Two-sided Student's t-tests ($\alpha=0.05$) were performed to compare the means of 2 populations. To compare 2 populations, we used box plots depicting the median, the 25th and 75th percentiles (box), and all included data points (black dots). Whiskers extend to the largest data point within the 1.5 interquartile range of the upper quartile and to the smallest data point within the 1.5 interquartile lower ranges of the quartile.

Received: 2 September 2020; Accepted: 18 December 2020

Published online: 03 February 2021

References

- Golson, M. L. & Kaestner, K. H. Fox transcription factors: From development to disease. *Development* **143**, 4558–4570 (2016).
- Ré, B., Benayoun, A., Caburet, S. & Veitia, R. A. Forkhead transcription factors: key players in health and disease. *Trends Genet.* <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.03.003> (2011).
- Jackson, B. C., Carpenter, C., Nebert, D. W. & Vasilios, V. Update of human and mouse forkhead box (FOX) gene families. *Human Genom.* **4**, 345–352 (2010).
- Hannenhalli, S. & Kaestner, K. H. The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 233–240 (2009).
- Enard, W. *et al.* Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. *Nature* **418**, 869–872 (2002).
- King, N. *et al.* The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature* **451**, 783–788 (2008).
- Yamada, A. & Martindale, M. Q. Expression of the tcnophore Brain Factor 1 forkhead gene ortholog (ctenoBF-1) mRNA is restricted to the presumptive mouth and feeding apparatus: Implications for axial organization in the Metazoa. *Dev. Genes Evol.* **212**, 338–348 (2002).
- Srivastava, M. *et al.* The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature* **454**, 955–960 (2008).
- Adell, T. & Müller, W. E. G. Isolation and characterization of five Fox (Forkhead) genes from the sponge *Suberites domuncula*. *Gene* **334**, 35–46 (2004).
- Magie, C. R., Pang, K. & Martindale, M. Q. Genomic inventory and expression of Sox and Fox genes in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev. Genes Evol.* **215**, 618–630 (2005).
- Tu, Q., Brown, C. T., Davidson, E. H. & Oliveri, P. Sea urchin Forkhead gene family: Phylogeny and embryonic expression. *Dev. Biol.* **300**, 49–62 (2006).

12. Fritzenwanker, J. H., Gerhart, J., Freeman, R. M. & Lowe, C. J. The Fox/Forkhead transcription factor family of the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii*. *EvoDevo* **5**, 17 (2014).
13. Yu, J. K. *et al.* The Fox genes of Branchiostoma floridae. *Dev. Genes Evol.* **218**, 629–638 (2008).
14. Mazet, F., Yu, J. K., Liberles, D. A., Holland, L. Z. & Shimeld, S. M. Phylogenetic relationships of the Fox (Forkhead) gene family in the Bilateria. *Gene* **316**, 79–89 (2003).
15. Paps, J., Holland, P. W. H. & Shimeld, S. M. A genome-wide view of transcription factor gene diversity in chordate evolution: Less gene loss in amphioxus?. *Brief. Funct. Genom.* **11**, 177–186 (2012).
16. Saló, E. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *BioEssays* **28**, 546–559 (2006).
17. Wang, X., Kiyokawa, H., Dennewitz, M. B. & Costa, R. H. The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16881–16886 (2002).
18. Wang, P. *et al.* Generation of mouse for conditional expression of forkhead box A2. *Endocrinology* **159**, 1897–1909 (2018).
19. Lee, H.-H. & Frasch, M. Survey of forkhead domain encoding genes in the Drosophila genome: Classification and embryonic expression patterns. *Dev. Dyn.* **229**, 357–366 (2004).
20. Zhang, S. *et al.* DFoxO promotes Wingless signaling in Drosophila. *Sci. Rep.* **6**, 22348 (2016).
21. Hope, I. A., Mounsey, A., Bauer, P. & Aslam, S. The forkhead gene family of *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **304**, 43–55 (2003).
22. Baguna, J., Saló, E. & Auladell, C. Regeneration and pattern formation in planarians. III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development* **107**, 77–86 (1989).
23. Wagner, D. E., Wang, I. E. & Reddien, P. W. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* **332**, 811–816 (2011).
24. Bagaña, J. The planarian neoblast: The rambling history of its origin and some current black boxes. *Int. J. Dev. Biol.* **56**, 19–37 (2012).
25. Kaestner, K. H., Knochel, W. & Martinez, D. E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* **14**, 142–146 (2000).
26. Wotton, K. R. & Shimeld, S. M. Comparative genomics of vertebrate Fox cluster loci. *BMC Genom.* **7**, 271 (2006).
27. Grohme, M. A. *et al.* The genome of *Schmidtea mediterranea* highlights the plasticity of cellular core mechanisms. *Nat. Publ. Gr.* <https://doi.org/10.1038/nature25473> (2018).
28. Egger, B. *et al.* A transcriptomic-phylogenomic analysis of the evolutionary relationships of flatworms. *Curr. Biol.* **25**, 1347–1353 (2015).
29. Rozanski, A. *et al.* PlanMine 3.0-improvements to a mineable resource of flatworm biology and biodiversity. *Nucleic Acids Res.* **47**, D812–D820 (2019).
30. Albertin, C. B. *et al.* The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature* **524**, 220–224 (2015).
31. Luo, Y. J. *et al.* The Lingula genome provides insights into brachiopod evolution and the origin of phosphate biomineralization. *Nat. Commun.* **6**, 8301 (2015).
32. Simakov, O. *et al.* Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. *Nature* **493**, 526–531 (2013).
33. Adler, C. E., Seidel, C. W., McKinney, S. A. & Sánchez Alvarado, A. Selective amputation of the pharynx identifies a FoxA-dependent regeneration program in planaria. *Elife* **3**, e02238 (2014).
34. Cirillo, L. A. *et al.* Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell* **9**, 279–289 (2002).
35. Gaudet, J. & Mango, S. E. Regulation of organogenesis by the *Caenorhabditis elegans* FoxA protein PHA-4. *Science* **295**, 821–825 (2002).
36. Eeckhoutte, J. *et al.* Cell-type selective chromatin remodeling defines the active subset of FOXA1-bound enhancers. *Genome Res.* **19**, 372–380 (2009).
37. Vij, S. *et al.* Evolutionarily ancient association of the FoxJ1 transcription factor with the motile ciliogenic program. *PLoS Genet.* **8**, e1003019 (2012).
38. Cruz, C. *et al.* Foxj1 regulates floor plate cilia architecture and modifies the response of cells to sonic hedgehog signalling. *Development* **137**, 4271–4282 (2010).
39. Stubbs, J., Oishi, I., Belmonte, J. C. I. & Kintner, C. The Forkhead protein, FoxJ1, specifies node-like cilia in *Xenopus* and Zebrafish embryos. *Nat. Genet.* **40**, 1454 (2008).
40. Martins, R., Lithgow, G. J. & Link, W. Long live FOXO: Unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell* **15**, 196–207 (2016).
41. Carter, M. E. & Brunet, A. Quick guide FOXO transcription factors. *Curr. Biol.* **17**, 113–114 (2007).
42. Larroux, C. *et al.* Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 980–996 (2008).
43. Shimeld, S. M., Boyle, M. J., Brunet, T., Luke, G. N. & Seaver, E. C. Clustered Fox genes in lophotrochozoans and the evolution of the bilaterian Fox gene cluster. *Dev. Biol.* **340**, 234–248 (2010).
44. Yaguchi, S., Yaguchi, J., Angerer, R. C. & Angerer, L. M. A Wnt-FoxQ2-nodal pathway links primary and secondary axis specification in sea urchin embryos. *Dev. Cell* **14**, 97–107 (2008).
45. Chevalier, S., Martin, A., Leclère, L., Amiel, A. & Houliston, E. Polarised expression of FoxB and FoxQ2 genes during development of the hydrozoan *Clytia hemisphaerica*. *Dev. Genes Evol.* **216**, 709–720 (2006).
46. Yu, J. K., Holland, N. D. & Holland, L. Z. AmphifoxQ2, a novel winged helix/forkhead gene, exclusively marks the anterior end of the amphioxus embryo. *Dev. Genes Evol.* **213**, 102–105 (2003).
47. Telford, M. J., Budd, G. E. & Philippe, H. Phylogenomic insights into animal evolution. *Curr. Biol.* **25**, R876–R887 (2015).
48. Paps, J., Bagaña, J. & Riutort, M. Lophotrochozoa internal phylogeny: New insights from an up-to-date analysis of nuclear ribosomal genes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **276**, 1245–1254 (2009).
49. Lapan, S. W. & Reddien, P. W. Transcriptome analysis of the planarian eye identifies ovo as a specific regulator of eye regeneration. *Cell Rep.* **2**, 294–307 (2012).
50. Wang, C. *et al.* Forkhead containing transcription factor Albino controls tetrapyrrole-based body pigmentation in planarian. *Cell Discov.* **2**, 16029 (2016).
51. Sluys, R. & Riutort, M. Planarian diversity and phylogeny. *Planarian Regener.* **1774**, 1–56 (2018).
52. Shimeld, S. M., Degnan, B. & Luke, G. N. Evolutionary genomics of the Fox genes: Origin of gene families and the ancestry of gene clusters. *Genomics* **95**, 256–260 (2010).
53. Mazet, F., Amemiya, C. T. & Shimeld, S. M. An ancient Fox gene cluster in bilaterian animals. *Curr. Biol.* **16**, R314–R316 (2006).
54. Irimia, M. *et al.* Extensive conservation of ancient microsynteny across metazoans due to cis-regulatory constraints. *Genome Res.* **22**, 2356–2367 (2012).
55. Herrera-Ubeda, C. *et al.* Microsyntentic clusters reveal conservation of lncRNAs in chordates despite absence of sequence conservation. *Biology (Basel)* **8**, 61 (2019).
56. Plass, M. *et al.* Cell type atlas and lineage tree of a whole complex animal by single-cell transcriptomics. *Science* **1723**, eaaq723 (2018).
57. Zeng, A. *et al.* Prospectively isolated tetraspanin + neoblasts are adult pluripotent stem cells underlying planaria regeneration. *Cell* **173**, 1593–1608.e20 (2018).

58. Lin, K., Hsin, H., Libina, N. & Kenyon, C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* **28**, 139–145 (2001).
59. Wang, X., Hu, S. & Liu, L. Phosphorylation and acetylation modifications of FOXO3a: Independently or synergistically?. *Oncol. Lett.* **13**, 2867–2872 (2017).
60. Obsil, T. & Obsilova, V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene* **27**, 2263–2275 (2008).
61. Song, K.-H. *et al.* REP1 inhibits FOXO3-mediated apoptosis to promote cancer cell survival. *Cell Death Dis.* **8**, e2536–e2536 (2018).
62. Yang, M. *et al.* Phylogeny of forkhead genes in three spiralian and their expression in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* **32**, 1207–1223 (2014).
63. Riddiford, N. & Olson, P. D. Wnt gene loss in flatworms. *Dev. Genes Evol.* **221**, 187–197 (2011).
64. Olson, P. D. Hox genes and the parasitic flatworms: New opportunities, challenges and lessons from the free-living. *Parasitol. Int.* **57**, 8–17 (2008).
65. Guijarro-Clarke, C., Holland, P. W. H. & Paps, J. Widespread patterns of gene loss in the evolution of the animal kingdom. *Nat. Ecol. Evol.* **4**, 519–523 (2020).
66. Koziol, U., Jarero, F., Olson, P. D. & Brehm, K. Comparative analysis of Wnt expression identifies a highly conserved developmental transition in flatworms. *BMC Biol.* **14**, 10 (2016).
67. Scimone, M. L., Kravarik, K. M., Lapan, S. W. & Reddien, P. W. Neoblast specialization in regeneration of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Stem Cell Rep.* **3**, 339–352 (2014).
68. Ong, T.-H. *et al.* Mass spectrometry imaging and identification of peptides associated with cephalic ganglia regeneration in *Schmidtea mediterranea*. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.709196> (2016).
69. Fernández, R. & Gabaldón, T. Gene gain and loss across the metazoan tree of life. *Nat. Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1069-x> (2020).
70. Cho, S. J., Vallès, Y., Giani, V. C., Seaver, E. C. & Weisblat, D. A. Evolutionary dynamics of the wnt gene family: A lophotrochozoan perspective. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 1645–1658 (2010).
71. Olson, P. D., Zarowiecki, M., Kiss, F. & Brehm, K. Cestode genomics: Progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. *Parasite Immunol.* **34**, 130–150 (2012).
72. Fritzenwanker, J. H., Saina, M. & Technau, U. Analysis of forkhead and snail expression reveals epithelial–mesenchymal transitions during embryonic and larval development of *Nematostella vectensis*. *Dev. Biol.* **275**, 389–402 (2004).
73. Olsen, C. L. & Jeffery, W. R. A forkhead gene related to HNF-3 β is required for gastrulation and axis formation in the ascidian embryo. *Development* **124**, 3609–3619 (1997).
74. Taguchi, S. *et al.* Characterization of a hemichordate fork head/HNF-3 gene expression. *Dev. Genes Evol.* **210**, 11–17 (2000).
75. Boyle, M. J. & Seaver, E. C. Developmental expression of foxA and gata genes during gut formation in the polychaete annelid *Capitella* sp. I. *Evol. Dev.* **10**, 89–105 (2008).
76. Mango, S. E., Lambie, E. J. & Kimble, J. The pha-4 gene is required to generate the pharyngeal primordium of *Caenorhabditis elegans*. *Development* **120**, 3019–3031 (1994).
77. Martín-Durán, J. M., Amaya, E. & Romero, R. Germ layer specification and axial patterning in the embryonic development of the freshwater planarian *Schmidtea polychroa*. *Dev. Biol.* **340**, 145–158 (2010).
78. Koinuma, S., Umesonoy, Y., Watanabe, K. & Agata, K. Planaria FoxA (HNF3) homologue is specifically expressed in the pharynx-forming cells. *Gene* **259**, 171–176 (2000).
79. Mazet, F., Amemiya, C. T. & Shimeld, S. M. An ancient Fox gene cluster in bilaterian animals. *Curr. Biol.* **16**, 314–316 (2006).
80. Scimone, M. L. *et al.* foxF-1 controls specification of non-body wall muscle and phagocytic cells in planarians. *Curr. Biol.* **28**, 3787–3801.e6 (2018).
81. He, X. *et al.* FOX and ETS family transcription factors regulate the pigment cell lineage in planarians. *Development* <https://doi.org/10.1242/dev.156349> (2017).
82. Kersey, R. K., Brodigan, T. M., Fukushige, T. & Krause, M. W. Regulation of UNC-130/FOXO-mediated mesodermal patterning in *C. elegans*. *Dev. Biol.* **416**, 300–311 (2016).
83. Lacin, H. *et al.* Genome-wide identification of *Drosophila* Hb9 targets reveals a pivotal role in directing the transcriptome within eight neuronal lineages, including activation of Nitric oxide synthase and Fd59a/Fox-D. *Dev. Biol.* **388**, 117–133 (2014).
84. Vogt, M. C. *et al.* Stem cell-dependent formation of a functional anterior regeneration pole in planarians requires Zic and Forkhead transcription factors. *Dev. Biol.* **390**, 136–148 (2014).
85. Koinuma, S., Umesonoy, Y., Watanabe, K. & Agata, K. The expression of planarian brain factor homologs. *DjFoxG and DjFoxD*. [https://doi.org/10.1016/s1567-133x\(02\)00097-2](https://doi.org/10.1016/s1567-133x(02)00097-2) (2003).
86. Scimone, M. L., Lapan, S. W. & Reddien, P. W. A forkhead transcription factor is wound-induced at the planarian midline and required for anterior pole regeneration. *PLoS Genet.* **10**, e1003999 (2014).
87. Yu, X., Ng, C. P., Habacher, H. & Roy, S. Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat. Genet.* **40**, 1445–1453 (2008).
88. Sinigaglia, C., Busengdal, H., Leclère, L., Technau, U. & Rentzsch, F. The bilaterian head patterning gene six3/6 controls aboral domain development in a cnidarian. *PLoS Biol.* **11**, e1001488 (2013).
89. Pohl, B. S. & Knöchel, W. Isolation and developmental expression of *Xenopus* FoxJ1 and FoxK1. *Dev. Genes Evol.* **214**, 200–205 (2004).
90. Casas-Tinto, S., Gomez-Velazquez, M., Granadino, B. & Fernandez-Funez, P. FoxK mediates TGF- β signalling during midgut differentiation in flies. *J. Cell Biol.* **183**, 1049–1060 (2008).
91. Storz, P. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 593–605 (2011).
92. Tatebe, H. & Shiozaki, K. Evolutionary conservation of the components in the tor signaling pathways. *Biomolecules* **7**, 77 (2017).
93. Bagunyà, J. & Romero, R. Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia* **84**, 181–194 (1981).
94. Thommen, A. *et al.* Body size-dependent energy storage causes Kleiber's law scaling of the metabolic rate in planarians. *Elife* **8**, 1–29 (2019).
95. Pascual-Carreras, E. *et al.* Planarian cell number depends on blitzschnell, a novel gene family that balances cell proliferation and cell death. *Development* **147**, 1–14 (2020).
96. de Sousa, N., Rodríguez-Esteban, G., Rojo-Laguna, J. I., Saló, E. & Adell, T. Hippo signaling controls cell cycle and restricts cell plasticity in planarians. *PLoS Biol.* **16**, e2002309 (2018).
97. Ziman, B., Karabinis, P., Barghouth, P. & Oviedo, N. J. Sirtuin-1 regulates organismal growth by altering feeding behavior and intestinal morphology in planarians. *J. Cell Sci.* <https://doi.org/10.1242/jcs.239467> (2020).
98. Almedo-Castillo, M. *et al.* JNK controls the onset of mitosis in planarian stem cells and triggers apoptotic cell death required for regeneration and remodeling. *PLoS Genet.* **10**, e1004400 (2014).
99. Lasi, M., David, C. N. & Böttger, A. Apoptosis in pre-Bilaterians: Hydra as a model. *Apoptosis* **15**, 269–278 (2010).
100. Hansen, M. *et al.* A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet.* **4**, e24 (2008).

101. Pinkston-Gosse, J. & Kenyon, C. DAF-16/FOXO targets genes that regulate tumor growth in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* **39**, 1403–1409 (2007).
102. Demontis, F. & Perrimon, N. FOXO/4E-BP signaling in Drosophila muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell* **143**, 813–825 (2010).
103. Molina, M. D. *et al.* Noggin and noggin-like genes control dorsoventral axis regeneration in planarians. *Curr. Biol.* **21**, 300–305 (2011).
104. Mammucari, C. *et al.* FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* **6**, 458–471 (2007).
105. Lokireddy, S. *et al.* The ubiquitin ligase Mub1 induces mitophagy in skeletal muscle in response to muscle-wasting stimuli. *Cell Metab.* **16**, 613–624 (2012).
106. Altintas, O., Park, S. & Lee, S. J. V. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Rep.* **49**, 81–92 (2016).
107. Klotz, L.-O. *et al.* Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* **6**, 51–72 (2015).
108. Pan, H. & Finkel, T. Key proteins and pathways that regulate lifespan. *J. Biol. Chem.* **292**, 6452–6460 (2017).
109. Pirotte, N. *et al.* Reactive oxygen species in planarian regeneration: An upstream necessity for correct patterning and brain formation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 1–19 (2015).
110. Degnan, B. M., Vervoort, M., Larroux, C. & Richards, G. S. Early evolution of metazoan transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 591–599 (2009).
111. El-Gebali, S. *et al.* The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* **47**, D427–D432 (2019).
112. Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108> (2017).
113. Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* **44**, W232–W235 (2016).
114. Huson, D. H. & Scornavacca, C. Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst. Biol.* **61**, 1061–1067 (2012).
115. Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M. & Yanagawa, H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 10171–10176 (2009).
116. La Cour, T. *et al.* Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 527–536 (2004).
117. Cebrià, F. & Newmark, P. A. 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 (2005).
118. Fernández-Taboada, E. *et al.* Smed-SmB, a member of the LSm protein superfamily, is essential for chromatoid body organization and planarian stem cell proliferation. *Development* **137**, 1055–1065 (2010).
119. Currie, K. W. *et al.* HOX gene complement and expression in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Evodevo* **7**, 7 (2016).
120. Sanchez Alvarado, A. & Newmark, P. A. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5049–5054 (1999).
121. Ross, K. G. *et al.* Novel monoclonal antibodies to study tissue regeneration in planarians. *BMC Dev. Biol.* **15**, 1–21 (2015).
122. González-Estévez, C., Felix, D. A., Aboobaker, A. A. & Saló, E. Gtdap-1 promotes autophagy and is required for planarian remodeling during regeneration and starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 13373–13378 (2007).
123. Cardona, A., Fernández, J., Solana, J. & Romero, R. An in situ hybridization protocol for planarian embryos: Monitoring myosin heavy chain gene expression. *Dev. Genes Evol.* **215**, 482–488 (2005).
124. Sureda-Gómez, M., Martín-Durán, J. M. & Adell, T. Localization of planarian β CATENIN-1 reveals multiple roles during anterior-posterior regeneration and organogenesis. *Development* <https://doi.org/10.1242/dev.135152> (2016).
125. Pelletier, J. *et al.* Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev. Biol.* **338**, 76–85 (2010).

Acknowledgements

The authors thank all the member of Emili Saló, Teresa Adell, Francesc Cebrià and Jordi García labs for discussion of the results and their suggestions; Jordi Paps for helpful advice and discussion while writing the manuscript, and Cristina Guijarro-Clarke for sharing genomic data.

Author contributions

E.P.C., C.H.U., M.R. and P.C.C. performed the experiments. E.P.C., C.H.U. and T.A. wrote the main manuscript text. All authors reviewed the manuscript.

Funding

EPC and CHU are recipients of an FPI (Formación del Profesorado Investigador) scholarship from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (MEC). The funder had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or manuscript preparation. ES and TA received funding from the Ministerio de Educación y Ciencia (grant number BFU2017-83755-P and BFU2014-56055-P). ES and TA benefits from 2017SGR-1455 from ACU (Generalitat de Catalunya). ES received funding from AGAUR (Generalitat de Catalunya: grant number 2009SGR1018). JGF received funding from the Ministerio de Educación y Ciencia (grant number BFU2017-86152-P). In no case the funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80627-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.P.-C. or T.A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

TUNEL staining in sections of paraffin-enabled planarians

Maria Rosselló ^{1,2}, Teresa Adell ^{1,2*}

¹ Department of Genetics, Microbiology and Statistics and Institute of Biomedicine, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Catalunya, Spain

² Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Catalunya, Spain

* Corresponding author: tadellc@ub.edu

Running head

TUNEL staining in sections of paraffin-enabled planarians

Abstract

Planarians are a model animal for the study of regeneration and homeostasis. Understanding how planarians control their cellular balance is key to the knowledge of their plasticity. Both apoptotic and mitotic rates can be quantified in ‘whole mount’ planarians. Apoptosis is usually analyzed through terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL), a technique that detects cell death by identifying DNA breaks. In this paper we detail a protocol to analyze apoptotic cells in paraffin sections of planarians, which enables a more accurate cellular visualization and quantification than in ‘whole mount’.

Key words: TUNEL, paraffin sections, planarian, apoptosis, cell death, DNA fragmentation

1. Introduction

Planarians are flatworms, which are able to regenerate any body part and to change their size upon nutrient availability. These amazing features are controlled by changes in cell proliferation and cell death. During planarian regeneration, two peaks of apoptosis occur; one initial response near the wound at 1 to 4 hours after injury and a second systemic increase of apoptosis after three days of injury (Pellettieri *et al.*, 2010). Changes in size related to the nutrient status is also related to cell death, since there is a proportional decrease in cell death to the nutritional abundance (Baguña, 1976; Pellettieri *et al.*, 2010). All these features make cell death an essential process for understanding planarian biology.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) is a technique that permits to observe apoptotic cells directly in the tissue. This technique is based in the DNA breaks produced when cells undergo apoptosis (Bortner, Oldenburg and Cidlowski, 1995). This oligos leaves 3'-hydroxyl termini (3'-OH) that are targeted by the enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). The TdT catalyzes the addition of labeled dUTP to the free 3'-OH. These newly modified ends are finally targeted by specific antibodies allowing the immunostaining of cells that undergo cell death.

TUNEL has been used in whole mount planarians (Stubenhaus and Pellettieri, 2018). However, this protocol presents technical difficulties, since in uninjured animals the poor permeability of the tissue impedes the detection of all apoptotic cells. Here we provide a new TUNEL protocol in planarian paraffin sections, which allows the detection of apoptotic cells inside the planarian tissues, providing a detailed view of all apoptotic cells and their localization.

The TUNEL staining in paraffin sections has three main steps. 1) fixation of the animals; 2) paraffin inclusion of planarians, which consists in their paraffin embedding, sectioning and deparaffinization (Adell *et al.*, 2018); and 3) the tunnel staining, using the ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit.

2. Materials

2.1 Planarian fixation

- 2% HCl solution: HCl diluted in ultrapure cold H₂O (see Note 1).
- 4% PFA solution: 4% paraformaldehyde powder diluted in PBS. To dilute warm the solution at no more than 50 °C and agitate manually. Let the solution to set at room temperature before using (see Note 2).
- 1× PBS: 10× PBS stock diluted to 1× with ultrapure H₂O.
- 10× PBS: 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, and 20 mM KH₂PO₄ in ultrapure H₂O. Adjust pH to 7.4 with 37% HCl solution.

2.2 Paraffin embedding, sectioning and deparaffinization

- 100% Ethanol.
- 96% Ethanol (diluted in ultrapure H₂O).
- 70% Ethanol (diluted in ultrapure H₂O).
- 100% Xylene (see Note 3).
- 1:1 Xylene:EtOH (1:1 mixture of xylene and EtOH).
- 100% Paraffin for histopathology.
- 50% Paraffin (1:1 mixture of paraffin and xylene, pre heated to 56 °C).

2.3 Tunnel staining using ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit

- Proteinase K solution: 20 µg/ml of proteinase K diluted in PBS.
- ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich S7165).
- TdT enzyme solution: 70% Reaction Buffer from ApopTag® kit and 30% TdT Enzyme from ApopTag® kit.
- Stop/Wash solution: 2 ml of Stop/Wash Buffer from ApopTag® kit in 68 ml of ultrapure H₂O.
- Anti-Dig solution: 53% Blocking Solution from ApopTag® kit and 47% Anti-Digoxigenin-Rhodamine from ApopTag® kit.
- Nuclear staining: 0.5 µg/mL DAPI in PBS. Conveniently prepared as a 1:10.000 dilution of a 5 mg/mL stock in ultrapure H₂O (can be frozen at -20).
- Mounting solution: SlowFade® (Glycerol-based commercial reagent) or 4% n-propyl gallate in 70% glycerol.

3. Methods

3.1 Planarian fixation

1. Transfer planarians to a 15 ml tube. Replace planarian salt solution with pre-chilled 2% HCl solution to kill the animals and to remove the mucus. Incubate for 4 min alternating one minute in ice and one minute in gentle manual agitation.
2. Replace the HCl with the fixative 4% PFA and incubate planarian during 4h at 4 °C in agitation.
3. Wash fixed planarians once with 1× PBS and continue washing with 1× PBS overnight at 4 °C in agitation.
4. Discard the 1× PBS and replace it with 70% EtOH. Incubate during 10 min at room temperature (see Note 4).

3.2 Paraffin embedding, sectioning and deparaffinization

1. Dehydrate planarians performing the following washes at room temperature under agitation:
 - 10 min 70% EtOH
 - 10 min 96% EtOH
 - 2 x 5 min 100% EtOH
 - 10 min 1:1 Xylene:EtOH
 - 2 x 5 min 100% Xylene
2. Bring planarians to 56 °C replacing Xylene with 1:1 Xylene:Paraffin solution. Incubate 5 min at 56 °C.
3. Transfer planarians from tubes to small glass containers and fill them with paraffin. This process must be done in the 56 °C oven otherwise the paraffin will solidify.
4. Incubate for 20 min with paraffine.
5. Replace the paraffine in the glass containers with new paraffine. Incubate for twenty minutes.
6. Repeat the previous step.
7. After the last paraffin incubation put a Petri dish on a warm plate a 56 °C. Fill it with paraffin.
8. Transfer planarians from the oven to the Petri dish using a pre-heated 56 °C Pasteur pipette.
9. Set up the planarians among the Petri dish separated from each other (see Note 5).
10. Remove the Petri dish from the warm plate and let it sit for at least 30 min.
11. Store at 4 °C overnight (see Note 6).
12. Use a scalpel blade to cut each planarian in cubes (see Note 7 and Note 8). Attach the cubes to the microtome support (see Note 9).

13. Section the planarian with a microtome (see Note 10).
14. Place the ribbon of histological sections on a poly-L-lysine-coated slide. The slide must be covered with ultrapure H₂O and on the hot plate set to 37 °C.
15. Dry the slices overnight at 37 °C.
16. Deparaffinize and rehydrate planarian sections performing the following washes at room temperature in glass jars:
 - 2 x 5 min 100% Xylene
 - 2 x 5 min 100% EtOH
 - 2 x 5 min 96% EtOH
 - 2 x 5 min 70% EtOH
 - 2 x 5 min 1× PBS

3.3 Tunnel staining using ApopTag[®] Red In Situ Apoptosis Detection Kit

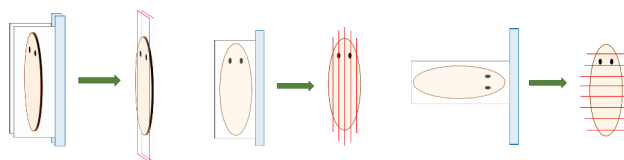
1. If a positive control of the experiment is required, slides can be treated with agents that produce DNA breaks. This step is optional and must only be done if we want to induce cell death. We have two options:
 - Incubate slides with 2N HCl during 40 min at room temperature.
 - Treat slides with 5U/ml of DNase diluted in 1× PBS for 1h at room temperature.
2. For antigen unmasking incubate slides with 20 µg/ml proteinase K during 10 min at room temperature. This step can be done in glass jars.
3. Wash the slides twice with 1× PBS during 2 min in glass jars
4. Take out the slides from the jar and dry the excess of liquid by capillarity. Quickly pipette 150 µl of Equilibration Buffer from the ApopTag[®] Kit and incubate for at least 10 seconds (see Note 11).
5. Remove the Equilibration buffer and rapidly add 50 µl of TdT enzyme solution (see Note 12) on top of the slide. Cover the slide with a plastic cover provided in the kit (see Note 13). Incubate in a humidified chamber (see Note 14) at 37 °C for 2 hours.
6. After TdT incubation submerge the slides in a glass jar with Stop/Wash buffer. Incubate at room temperature for 10 min
7. Wash the slides for 2 min in 1× PBS three times.
8. Remove the slides from the jar and rapidly add 80 µl of anti-DIG solution on top of the slide. Cover the slide with a plastic cover provided in the kit. Slides must never be completely dry. Process one

slide at a time, as the slices must not dry out (see Note 11). Put slides in a humidified chamber and incubate at 4 °C overnight (see Note 15).

9. Submerge slides in a glass jar with 1× PBS for 2 min.
10. Wash 3× with 1x PBS, 2 min each time.
11. Incubate with a Nuclear staining for at least 30 min (see Note 16).
12. Mount using a Mounting solution.

4. Notes

1. The solution must be made just before use
2. The 4% PFA solution can be prepped the day before and kept in the fridge until is used. Avoid using solutions that had been stored for a long time because it can impact in the fixation process.
3. Xylene is toxic, and the commercial substitute Neo-Clear can be used.
4. Other protocols suggest that animals can be stored at -20 °C in 70% EtOH. For the Tunnel this steep is not recommended because it can affect the final staining.
5. In order to spread the planarians in the plate is useful to use the punch at 54°C. The punch, with wooden or plastic handle, can be kept in the 56°C chamber in order to keep it warm. If the punch is not warm the planarians will stick to it.
6. Paraffin blocks can be stored at 4 °C for short term storage or at 20 °C for long term storage.
7. To cut the planarians individually use a warm blade to avoid cracking. The blade can be from a scalpel or an old microtome blade. To warm the blade a Bunsen flame can be used. When cutting the paraffin avoid using excessive force. The warm metal of the blade will melt the paraffin making the process easier. Do not pally heat directly on the animal only in the surrounding paraffin.
8. The paraffin cubes must be a few centimeters wider than the planarian to avoid damaging the animal. In terms of height the zone that will be facing the microtome support should be thicker. See the scheme in Note 9 to know how to orient planarians.
9. The orientation of the cub on the microtome support is determining the type of cut that will be posteriorly made. See the scheme below.



10. The thickness of the microtome slides is usually set at 10 µm but this parameter can vary depending on the experimental needs.
11. Slides must never be completely dry. In some steps were low quantities of reagents are used process one slide at a time; finish the process in one slide before continuing with the next one.
12. TdT enzyme solution must be freshly made and kept in ice until used.
13. Plastic covers can be washed and reused in further experiments. Wash the covers with abundant distilled H₂O and let them dry covered with absorbent paper.

14. A humidified chamber can be obtained with wet absorbent paper in a big petri dish, to create a humid ambient to avoid solution evaporation.
15. Antibody incubation can also be performed at room temperature during 3 h. Room temperature incubation sometimes can lead to the appearance of unspecific staining.
16. Several nuclear stainings can be used. We use DAPI because it has no interference with the red fluorescence of the TUNEL antibody.

5. References

1. Adell, T. *et al.* (2018) 'Immunohistochemistry on paraffin-embedded planarian tissue sections', in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 367–378. doi: 10.1007/978-1-4939-7802-1_11.
2. Bagaña, J. (1976) 'Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. I. Mitotic studies during growth, feeding and starvation', *Journal of Experimental Zoology*, 195(1), pp. 53–64. doi: 10.1002/jez.1401950106.
3. Bortner, C. D., Oldenburg, N. B. E. and Cidlowski, J. A. (1995) 'The role of DNA fragmentation in apoptosis', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, pp. 21–26. doi: 10.1016/S0962-8924(00)88932-1.
4. Pellettieri, J. *et al.* (2010) 'Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration', *Developmental Biology*, 338(1), pp. 76–85. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.09.015.
5. Stubenhaus, B. and Pellettieri, J. (2018) 'Detection of apoptotic cells in planarians by whole-mount TUNEL', in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 435–444. doi: 10.1007/978-1-4939-7802-1_16.

Figures

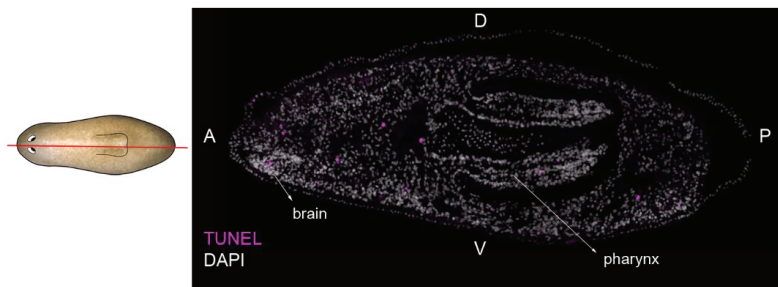


Figure 1. TUNEL staining in a section of paraffin embedded planarian. Magenta dots are cells undergoing apoptosis, since they are positive for TUNEL staining. Nucleus are stained with DAPI (white), and show the different planarian tissues, as the pharynx and the brain. A magnification of the yellow squared area is showed (x 3). A, anterior; P, posterior; V, ventral; D, Dorsal. The drawing on the left indicates the level of the sagittal section performed. Scale is 0,5 mm.