

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Descripción comparada de la regeneración en planarias acuáticas de bosque montano y páramo**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas**

**ERIKA SAMARY PINTO NOGALES**

**Quito, 2020**

*A mi familia, quienes me apoyan incondicionalmente en cada etapa de mi vida*

*A mi madre, la que me presiona para seguir adelante*

*A mi hermana, la que me corrige y me mima*

*A mi padre, el que me enseña cosas nuevas*

*A mi abuelita, la que me inspira a cumplir mis metas*

**Descripción comparada de la regeneración en planarias acuáticas de bosque montano  
y páramo**

**Comparative description of regeneration in aquatic planarians from paramo and  
montane forest**

**Autores:** Erika Pinto <sup>1,2</sup> y Andrés Romero-Carvajal<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia  
Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador

<sup>2</sup> epinto095@puce.edu.ec

<sup>3</sup> [maromero@puce.edu.ec](mailto:maromero@puce.edu.ec)

## RESUMEN

La regeneración en planarias es un tema ampliamente estudiado en especies modelo como *Schmidtea mediterránea*, sin embargo, la capacidad de regeneración es variable entre los cientos de especies existentes. Esta capacidad puede estar ausente o ser restringida en algunas planarias como *Bdelloura candida* o *Dendrocoelum lacteum*. Entender esta variabilidad es importante para comprender la evolución de la capacidad regenerativa en planarias adaptadas a distintos ambientes. Sin embargo, la información sobre patrones de regeneración y proliferación celular en otras especies de planaria es limitada. En este estudio se describen las etapas de regeneración y patrones de proliferación celular en planarias acuáticas de una población de páramo del Río Pita (3359 m.s.n.m.) en Ecuador. Se encontró que el proceso de regeneración a 22 °C, es más lento que en planarias acuáticas del mismo río, a una menor elevación (bosque montano; 2843 m.s.n.m.). Además, los cambios de proliferación post-amputación difieren, con aumentos significativos de células mitóticas a las 18 h y 192 h en el fragmento posterior y 18h en el fragmento anterior. A pesar de las diferencias, ambas poblaciones coinciden con la ausencia de un segundo aumento de proliferación en el fragmento anterior, sugiriendo que esta respuesta a los tejidos faltantes no se da en todos los casos de amputación.

**Palabras clave:** páramo, planarias, proliferación celular, regeneración.

## ABSTRACT

Regeneration in planarians has been well studied in model species like *Schmidtea mediterranea*, however regeneration capacity can vary among the hundreds of existing species. This capacity can be absent or restricted in species like *Bdelloura candida* and *Dendrocoelum lacteum*. Understanding this variability is important in order to understand the evolution of regeneration in planarians adapted to distinct environments. Yet, information regarding regeneration patterns and cell proliferation is limited for other planarian species. This study describes the regeneration stages and cell proliferation patterns in a population of aquatic planarians from the Ecuadorian paramo, at Pita River (3359 m.a.s.l.). It was found that the regeneration process is slower at 22 °C, compared to a population of aquatic planarians from the same river at a lower elevation (montane forest, 2843 m.a.s.l.). In addition, changes in cell proliferation also differ, with significant increases of mitotic cells at 18 h and 192 h in the posterior fragment and 18h in the anterior fragment. Despite of the differences, both populations share the absence of a second increase in the anterior fragment, suggesting the missing tissue response does not happen in all amputation cases.

**Keywords:** cell proliferation, paramo, planarian, regeneration.

## INTRODUCCIÓN

Las planarias son invertebrados pertenecientes al grupo de los Platyhelminthes, muy estudiados por su capacidad para regenerar tejidos (Collins, 2017). Esta capacidad les permite reconstruir organismos completos incluso a partir de fragmentos pequeños, por lo que han sido considerados animales inmortales por algunos científicos como TH Morgan (Pellettieri, 2019). En su ambiente natural, las planarias utilizan su capacidad regenerativa en el recambio de tejidos (Homeostasis de tejidos) o regeneración de partes del cuerpo perdidas en situaciones traumáticas (Rossi, Salvetti, Batistoni, Deri, y Gremigni, 2008; Baguñà, 2012). Además, una gran cantidad de especies utilizan la regeneración para reproducirse de forma asexual, regenerando dos individuos completos por fisión binaria (Rossi et al., 2008; Stocchino y Manconi, 2013).

El proceso de regeneración en planarias ha sido muy estudiado y en la actualidad se sabe que este proceso está regulado por la presencia de una población heterogénea de células madre, ubicadas en el mesófilo, llamadas neoblastos (Alessandra y Rossi, 2019; Reddien y Alvarado, 2004). Los neoblastos y su inmediata descendencia, son las únicas células en el cuerpo de la planaria que pueden entrar en mitosis, por lo cual son de vital importancia para mantener la homeostasis (Baguñà, 2012; Tanaka y Reddien, 2011). Además, los neoblastos responden a las heridas incrementando su tasa de proliferación, por lo que aparecen en una proporción alta (25%) luego de darse la amputación o corte de los tejidos. La población heterogénea de neoblastos incluye células pluripotentes llamadas neoblastos clonogénicos, que darán lugar a las células faltantes de todos los tipos de tejidos (González-Estévez, 2009; Wagner, Wang, y Reddien, 2011).

La diversidad de ambientes en los que se pueden encontrar planarias ha permitido la evolución de diferencias en la capacidad de regeneración que aún no son comprendidas por

completo (Vila-Farré y C. Rink, 2018). Por ejemplo, se ha reportado la ausencia de regeneración en la especie de planaria marina *Bdelloura candida*, y regeneración reducida en el caso de la planaria de agua dulce *Dendrocoelum lacteum*, incapaz de regenerar la cabeza a partir de fragmentos posteriores (Sivickis, 1931; Teshirogi, Ishida, y Yamazaki, 1977). Por otro lado, se ha visto la influencia de la temperatura, encontrando que tanto en *Schmidtea mediterranea* como en otro platelminto, *Macrostomun lignano*, al aumentar la temperatura la regeneración se da de manera más rápida (Hammoudi, Torre, Ghigo, y Drancourt, 2018; Wudarski, Ustyantsev, Glazenburg, y Berezikov, 2019).

Aunque todavía no se comprende por completo a qué se deben las diferencias en la capacidad de regenerar de diferentes especies de planarias, estas podrían explicarse por las estrategias de historia de vida que han evolucionado en los diversos ecosistemas (Egger, Gschwentner, y Rieger, 2007; Sánchez Alvarado, 2000). Estudiar por qué algunas planarias son capaces de regenerarse mientras otras no, permitiría entender los defectos durante el proceso de regeneración, así como la evolución de esta habilidad. Para aportar más información sobre la capacidad de regeneración en distintas especies, esta investigación describe el proceso regenerativo y patrón de proliferación celular de una población de páramo ecuatoriano (3359 m.s.n.m.), permitiendo realizar comparaciones con otra población ya descrita en el bosque montano (2843 m.s.n.m.) del mismo río (Oviedo, 2019). Debido a diferencias en el ecosistema, como la temperatura, se encontró que la población de planarias de páramo muestra un proceso regenerativo más lento que el de la población de bosque montano y otras especies modelo como *S. mediterranea*.

## **METODOLOGÍA**

**Colección y mantenimiento de especímenes.** - La población de planarias de páramo fue colectada en la estación de colecta de agua potable “H12 Pita Bocatona” del DMQ ubicada

en el Río Pita, Sangolquí-Pichincha en 0° 29' 49.43" S 78° 26' 4.79" O (3359 m.s.n.m.). Todas las planarias fueron colectadas con el permiso N° 011-2018-IC-FAU-DNB/MA del Museo de Zoología (QCAZ) - Sección invertebrados de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Inicialmente la población de planarias fue mantenida a temperatura ambiente, alrededor de 22 °C, en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Debido a que la tasa de supervivencia fue muy baja a 22 °C, esta población fue posteriormente reubicada a 17 °C y 4 °C. Todas las planarias se mantuvieron en contenedores plásticos (~25 individuos por contenedor) con agua libre de cloro y esterilizada con ozono. El agua se dejó reposar al menos 5 días antes de ser usada para evitar contaminación de volátiles y cloro. No se proveyó de aireación dentro de los contenedores, pero el agua fue renovada cada 2-3 días para permitir el flujo de oxígeno y evitar la acumulación de microorganismos. Todas las planarias fueron alimentadas con hígado triturado suministrado una vez por semana (Oviedo, 2019).

**Extracción de ADN, secuenciamiento y alineamiento.** - ADN fue extraído de cuatro planarias completas con un peso de ~10mg utilizando el mini kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific) usando el protocolo del fabricante. Secuencias parciales del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) y el gen nuclear Factor de Elongación 1-alfa (EF-1 $\alpha$ ) fueron amplificadas usando la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) con las condiciones especificadas para la polimerasa Invitrogen™ *Taq* DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific). Información sobre los primers usados pueden encontrarse en Oviedo (2019). Los productos del PCR fueron visualizados en geles de agarosa y purificados usando ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher

Scientific) como se indica por el fabricante. Los genes mitocondriales y nucleares fueron secuenciados comercialmente por MacroGen Korea.

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas utilizando el software Geneious, v5.4.6 (Kearse et al., 2012) con las configuraciones por defecto para la alineación múltiple MAFFT (Kato & Toh, 2010). Las matrices concatenadas se construyeron en Mesquite (Mesquite Project) con las secuencias consenso de cada individuo secuenciado junto con las especies obtenidas a partir del Blastn y otros representantes de los géneros de la Familia DugesIIDae, disponibles en GenBank. Los modelos evolutivos y esquema de particiones se escogieron simultáneamente usando PartitionFinder v2.1.1. (Lanfear, Calcott, Ho, y Guindon, 2012).

**Análisis filogenético.** - Análisis filogenéticos fueron realizados para establecer relaciones entre individuos de cada linaje y entre linajes y determinar si existen especies nuevas de acuerdo al concepto filogenético de especie (Ridley 1993). Los datos mitocondriales y nucleares fueron analizados usando MrBayes versión 3.2.7<sup>a</sup> (Ronquist et al., 2012) y RAxML versión 8.2.12 (Stamakis, 2014). Los árboles filogenéticos fueron editados y visualizados a través de FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2014). En adición a la interferencia filogenética el número de haplotipos fue estimado usando DnaSP (Rozas, Sánchez-DelBarrio, Messeguer, & Rozas, 2003) y la red de haplotipos fue inferida usando PopART (Leigh y Bryant, 2015). Las distancias génicas fueron calculadas usando MEGA 7 (Kumar, Stecher, y Tamura, 2016).

**Etapas de regeneración y supervivencia.**- Para observar el proceso de regeneración se realizaron amputaciones de acuerdo al protocolo de Chan y Marchant (2011). El corte en todos los animales fue realizado bajo la proboscis dividiendo a cada individuo en un fragmento anterior y otro posterior. Debido a la dificultad para identificar órganos en el

fragmento anterior, el tiempo de regeneración fue medido observando los cambios morfológicos del fragmento posterior desde el día 1 al 21 post-amputación.

Las etapas de regeneración se identificaron de acuerdo a las propuestas para *Girardia tigrina*, siendo estas las siguientes: cierre de la herida (etapa 1); formación del blastema (etapa 2); crecimiento y diferenciación temprana (etapa 3); diferenciación definitiva (etapa 4) (Spiegelman y Dudley, 1973). La observación se detenía al identificar manchas oculares en el fragmento posterior, considerando a estos como evidencia de la diferenciación definitiva de los tejidos.

Ya que regenerar la sección amputada no aseguraba la supervivencia del individuo, se midió además la supervivencia y capacidad de regenerar de los fragmentos amputados a 22 °C, 17 °C y 4 °C. Debido a que los animales eran divididos en 2 fragmentos luego de la amputación, se consideró a cada fragmento como un individuo diferente. Se clasificó a los fragmentos como capaces de regenerar si alcanzaban la etapa 4 de regeneración (diferenciación definitiva de tejidos) y como sobrevivientes si se mantenían con vida por más de 21 días después de la amputación.

**Inmunotinción.** - Para detectar células proliferativas, se marcaron células en mitosis con un anticuerpo primario para la Histona 3, fosforilada en la serina 10 (SIGMA life science), y con anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (SIGMA life science). Las inmunotinciones se realizaron a las 3h, 6h, 18h, 48h y 192h. Para la fijación los individuos fueron incubados en agua fría por 2-6 min hasta que se mantuvieran en posición recta para luego ser fijados, primero con HCl 2% helado por 10min, y después con fijativo Carnoy helado por 2h (6:3:1 Etanol: Cloroformo: Ácido acético) para finalmente ser conservados en metanol 100% a 4 °C una noche. Antes del blanqueo los animales fueron rehidratados de forma gradual (25%, 50%, 75%, 100%) reemplazando el metanol con PBSTx. Para el blanqueo las planarias

rehidratadas se incubaron en solución de blanqueo (1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5% formamida y 0.5X SSC) por 4 horas bajo una lámpara de luz blanca. Se realizó un pos-fijado después del blanqueo usando formaldehído 4% diluido en PBSTx por una noche. El formaldehído 4% fue lavado y después reemplazado por solución de bloqueo (10% suero de cordero en PBSTx) por 4 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (H3P) fue diluido en solución de bloqueo (1:500) e incubado en el tejido por 48 horas en movimiento. Se lavó el anticuerpo primario realizando 3 lavados con PBSTx y se bloqueó 1h con solución de bloqueo. Posteriormente se incubó el anticuerpo secundario (anti-rabbit IgG) diluido (1:500) en solución de bloqueo por 48h. Después de remover el anticuerpo, se realizaron 3 lavados de PBSTx de 1h seguido de un lavado con solución de bloqueo de 1h y deshidratación gradual en metanol por una noche a temperatura ambiente. Finalmente, las planarias marcadas fueron transparentadas y montadas en benzyl benzoato: benzyl alcohol (2:1) (Oviedo, 2019).

**Imagen y análisis estadístico.** - Las imágenes de inmunotinción fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ni con magnificación 5x, usando la cámara Mshot Ms60 con el programa Mshot Image Analisis System. Las imágenes fueron montadas en Image J (Rueden et al., 2017) usando la herramienta Z-project y unidas en Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, Inc.) usando la herramienta photomerge. Las células en mitosis en cada periodo de tiempo fueron contabilizadas de forma manual usando la herramienta Multi point de Image J. El número total de células de cada individuo fue corregido tomando en cuenta el área del animal. Para determinar la distancia de las células a la herida se clasificaron las mediciones en intervalos de 25 unidades, usando la longitud total de cada animal.

## RESULTADOS

**Etapas de regeneración y proliferación.-** Se colectaron alrededor de 200 individuos de una población de planarias de páramo del Río Pita, estos se caracterizaron a breves rasgos por cuerpos alargados y delgados de pigmentación moteada y parda con una línea longitudinal marcada oscura dividiendo el cuerpo en dos mitades, además la forma de la cabeza fue triangular con aurículas puntiagudas conspicuas similar a la reportada para las especies del género *Girardia* (Fig. 1) (Sluys y Riutort, 2018). El aspecto de las planarias de esta población difirió del encontrado en la especie de bosque montano, reportada por Oviedo (2019) del mismo río. La población de bosque montano se caracteriza por tener cuerpos más anchos y cortos con coloración café oscura llana y con una línea blanca dividiendo el cuerpo en dos mitades (Fig. 2).

Inicialmente las etapas de regeneración se observaron a 22 °C, los tiempos aproximados para cada etapa fueron obtenidos tras reunir datos de 156 fragmentos amputados. Se identificó las etapas en los siguientes días post amputación (dpa): el cierre de la herida (etapa 1) entre el 1er y 6to dpa, la aparición del blastema (etapa 2) del 6to dpa al 9no dpa, el crecimiento del blastema y diferenciación temprana (etapa 3) entre 9no y 12vo dpa, y por último la diferenciación definitiva de tejidos (etapa 4) entre el 13vo y 18vo dpa (Fig. 3). La identificación de etapas de regeneración a 22°C presentó dificultades debido a la alta mortalidad en comparación a planarias de la misma población mantenidas en temperaturas más bajas (Fig. 4). Además, se registraron múltiples lesiones, pérdida de tejido en distintos lugares del cuerpo así como en el lugar de la amputación (Fig. 5) y divisiones espontaneas de los fragmentos que aún no regeneraban; esto era seguido por su muerte.

Para comparar la respuesta de regeneración con la población de bosque montano, células proliferativas fueron identificados como las células en mitosis marcadas por el anticuerpo primario para la porción fosforilada de la histona 3 (H3P). El aumento de células mitóticas fue mayor en el fragmento posterior que en el anterior por  $\sim 114$  células/mm<sup>2</sup> a las 3h,  $\sim 124$  células/mm<sup>2</sup> a las 6h,  $\sim 209$  células/mm<sup>2</sup> a las 18h,  $\sim 199$  células/mm<sup>2</sup> a las 48h,  $\sim 277$  células/mm<sup>2</sup>. El aumento de proliferación mitótica se presentó como un aumento gradual de las células mitóticas y no como un pico de proliferación. En el fragmento anterior, 18h fue el punto de tiempo con mayor número de células mitóticas por mm<sup>2</sup> en relación a 3h (Fig. 6). Este aumento en la proliferación se distribuyó a lo largo de todo el fragmento anterior, sin embargo, se encontró una concentración de células mitóticas cerca de la herida a las 192h sin que la cantidad de las mismas aumentara significativamente (Fig. 7). Para el fragmento posterior, 18h y 192h fueron los dos puntos de tiempo con mayor número de células mitóticas por mm<sup>2</sup> en relación a 3h, y a su vez los dos puntos de tiempo más similares entre sí (Fig.6). Ambos aumentos en la proliferación celular se distribuyeron a lo largo del fragmento posterior sin mostrar concentración de células mitóticas cerca de la herida en ningún punto de tiempo (Fig. 7).

**Supervivencia y regeneración.** - A causa de la alta mortalidad y baja regeneración registrada a 22 °C, las etapas de regeneración y supervivencia fueron observadas en 68 fragmentos a 17 °C y 48 fragmentos a 4 °C. En los fragmentos mantenidos a 17 °C se identificó la etapa 1 entre el 1er y 6to dpa, etapa 2 entre el 6to y 9no dpa, etapa 3 entre el 12vo al 15vo dpa, y etapa 4 entre el 18vo y 15vo dpa (Fig. 8). Por último, en los fragmentos de 4 °C se identificó la etapa 1 durante el 1er y 9no dpa, etapa 2 en el 12vo dpa e inicio de la etapa 3 el 15vo día (Fig. 9). Se realizó una observación adicional más allá de los 21 días establecidos y se identificó que los fragmentos expuestos a 4 °C continuaban en la etapa 3 (crecimiento del blastema y diferenciación temprana) alrededor de los 36 dpa

indicando que el proceso regenerativo es mucho más lento a 4 °C que a 17 °C o 22 °C (Fig. 9N, Fig. 10).

Ya que la regeneración y diferenciación de tejidos no aseguraban la supervivencia de los individuos y viceversa, se consideró como sobrevivientes a todos los fragmentos que mostraran señales de vida por más de 21 días post-amputación. Tomando esto en cuenta, la mortalidad fue de 100% a 22 °C mientras que a 4 °C y 17 °C no hubo una diferencia significativa en la mortalidad siendo esta de 14% y 16% respectivamente (Fig. 4A). El mayor número de muertes se registraron en promedio durante los primeros 6 días post amputación en las 3 temperaturas. Posterior a los 6 días, en 22 °C el porcentaje de fragmentos sobrevivientes sigue disminuyendo hasta alcanzar el 100% de mortalidad. Contrario a esto a 17 °C no se vuelve a registrar muertes y a 4 °C solo se vuelven a registrar 2 muertes a los 18 días (Fig. 11).

Para clasificar un fragmento como regenerado, este debía haber completado la 4ta etapa de regeneración (diferenciación definitiva) durante los 21 días de observación, 17 °C fue la única temperatura en la que el porcentaje de regeneración (86%) fue igual al porcentaje de supervivencia. Sin embargo, el 84% los fragmentos observados a 4 °C mostraron las 2 primeras etapas e inicios de la 3ra etapa por lo que probablemente alcanzarían esta última etapa en días posteriores, y fueron considerados como parcialmente regenerados (Fig. 10). Por último, en 22 °C el porcentaje de fragmentos regenerados fue significativamente menor que el porcentaje de fragmentos regenerados y parcialmente regenerados a 17 °C y 4 °C ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Solo el 8% de fragmentos observados llegaron a la etapa 4 de regeneración (diferenciación definitiva) (Fig. 4A).

Para cada temperatura analizada se mantuvo un grupo control de individuos a los que no se les amputó ningún fragmento del cuerpo. Al medir la supervivencia de los controles se

encontró que a 22 °C existió una mortalidad del 100% del grupo control, indicando que esta temperatura es letal para la población de planarias de páramo (Fig. 4B). Contrario a esto, tanto a 17 °C como a 4 °C la mortalidad del grupo control fue del 0% indicando que ninguna de estas temperaturas afectó a la supervivencia (Fig. 4C, Fig. 4D), y que la mortalidad encontrada en los fragmentos podría ser consecuencia de estrés causado por la amputación.

**Análisis filogenético.** - La información molecular editada comprendió 189 pares de bases para el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI), y 487 pares de bases para el gen nuclear Factor de Elongación 1-  $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ). Los árboles resultantes de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana para el gen COI sugirieron la emparentación con el género *Girardia*, mientras que para el gen EF1- $\alpha$  sugirieron la emparentación con *Schmidtea polychroa*. En los análisis de ambos genes la población de bosque montano forma su propio clado, separándose de la población de bosque montano reportada por Oviedo, (2019) (Fig. 12). Las distancias genéticas calculadas por pares mostraron una distancia promedio de 9.5% entre la población de bosque montano y de páramo para EF 1- $\alpha$  y de 19.33% para COI. A su vez se encontró un promedio de 3.3% de distancia entre los individuos de la población de páramo para COI, las distancias completas pueden ser revisadas en Tabla 1 y Tabla 2. Adicionalmente la distancia genética para COI entre la población de páramo y *Girardia dorotocephala* fue en promedio de 27.3% y comparándola con *Schmidtea polychroa* para EF1- $\alpha$  fue de 10.6%.

Para los haplotipos se analizaron 4 individuos de la población de páramo: DB00271, DB00281, DB00331 y DB00341; y 2 individuos de la población de bosque montano del Río Pita: DB00051 y DB00011. La porción del gen COI analizada fue de 156bp con 33 sitios variables componiendo 4 haplotipos (H) como se describe a continuación: H1

DB00271; H2 DB00281, DB00331; H3 DB00051, H4 DB00011. Para EF1- $\alpha$  la porción de gen analizada fue de 388 bp con 35 sitios variables componiendo 3 haplotipos (H) como se describe a continuación: H1 DB00271, DB00281, DB00341; H2 DB00051, H4 DB00011. La red inferida en PopArt muestra dos haplotipos para EF1- $\alpha$  y 4 para COI (Fig. 13).

## DISCUSIÓN

**Etapas de regeneración y proliferación celular.** - Los páramos se caracterizan por ubicarse generalmente sobre los 3000 m.s.n.m. Estos poseen climas extremos a causa de las bajas temperaturas y alta radiación solar (Mena Vásconez y Hofstede, 2006). Múltiples adaptaciones han surgido en otros seres vivos para sobrevivir a este clima extremo, como cambios en la morfología y metabolismo (Cuesta, Sevink, Llambí, De Bièvre, y Posner, 2014; Mena Vásconez y Hofstede, 2006). Ningún estudio sobre regeneración en planarias de este tipo de ecosistema se ha realizado anteriormente aunque si se han encontrado otras planarias acuáticas de páramo como *Girardia festae* en Ecuador y *Girardia paramensis* en Colombia (Brusa, Negrete, Herrera-Martínez, y Herrando-Pérez, 2012).

Las planarias son organismos ectotermos, por lo que la temperatura del ambiente determina su temperatura corporal, pero además se ha demostrado que también influencia su ciclo de vida, desarrollo embrionario y regeneración (Calow, 1977; Claussen, Grisak, y Brown, 2003; Reynoldson, Young, y Taylor, 1965). En comparación a otras especies como *Schmidtea mediterranea*, *Girardia tigrina*, y la población de bosque montano, el proceso de regeneración analizado en este estudio es más lento necesitando de al menos 18 días para regenerar manchas oculares a 22 °C. La población de bosque montano regenera manchas oculares en 13 días en la misma temperatura (Oviedo, 2019). Por otro lado, *G. tigrina* y *S. mediterranea* pueden llevar a cabo el mismo proceso entre ~7 y 14 días a 17 °C y 19 °C respectivamente (Hammoudi et al., 2018; Spiegelman y Dudley, 1973). Aunque la

regeneración en la población de páramo si fue más lenta, el tiempo de regeneración entre especies es variable sin importar la temperatura, ya que a pesar de que *G. tigrina* y *S. mediterranea* se regeneran a temperaturas más bajas, el proceso de regeneración es más rápido. La capacidad de regeneración es variable encontrando un rango de regeneración desde nula, pasando por parcial, hasta total (Brockes, Kumar, y Velloso, 2001; Brøndsted, 1939), por lo que no sería inusual encontrar diferencias en la velocidad de regeneración para distintas especies.

Con respecto a la proliferación celular *S. mediterranea* presenta dos picos de proliferación celular tras una herida, el primero se ha descrito como una respuesta general a cualquier tipo de herida, mientras que el segundo pico solo se encuentra como respuesta a heridas que presentan la remoción de tejido (Wenemoser y Reddien, 2010). En *S. mediterranea* el primer pico se dispara a las 6 h y el segundo a las 48 h. Por otro lado, en la población de bosque montano (Río Pita) ambos picos aparecen en el fragmento posterior, mientras que el fragmento anterior solo presenta el primer pico de proliferación (Oviedo, 2019; Wenemoser y Reddien, 2010). En la población de páramo, no se encontró picos de proliferación como los encontrados en la población de bosque montano o *S. mediterranea*, la proliferación celular aumentó progresivamente con el mayor número de células a 18 h y 192 h para el fragmento posterior y a 18 h para el fragmento anterior.

Se ha visto que la diferenciación de neoblastos durante el segundo pico de proliferación inicia la formación del blastema (Wenemoser y Reddien, 2010), tanto en *S. mediterranea* como en la población de bosque montano el blastema se forma alrededor de los 2-3 días, coincidiendo con la aparición del segundo pico de proliferación a las 48h (Oviedo, 2019; Wenemoser y Reddien, 2010), sin embargo en la población de páramo el blastema puede aparecer entre los 6 y 9 días post amputación que también coincide con el segundo

aumento de proliferación a los 8 días (192 h). Conforme a estos resultados, se sugeriría que la proliferación celular avanza de acuerdo al tiempo que toma completar el proceso de regeneración.

Por otro lado, se sabe que la respuesta al tejido faltante es la que dispara el segundo pico de proliferación, a pesar de esto, el segundo pico de proliferación no es necesario para todos los casos de regeneración. Por ejemplo, al extirpar manchas oculares estas pueden regenerarse completamente sin que se dispare el segundo pico (LoCascio, Lapan, & Reddien, 2017). En estudios sobre inhibición de la folistatina (necesaria para que se produzca el segundo pico de proliferación) se ha determinado que las heridas con remoción de tejido si pueden regenerarse, aun con la ausencia de este pico. Esto sucede a una velocidad más lenta, por lo que se propone que la función de la respuesta al tejido faltante es acelerar el proceso de regeneración (Tewari, Stern, Oderberg, y Reddien, 2018). A pesar de que se encuentra una concentración de células mitóticas en la herida, tanto en la población de bosque montano como en la población de páramo, no se encuentra un segundo pico o aumento de proliferación en el fragmento anterior. Como ya se explicó, el segundo pico de proliferación puede ser dispensable sin afectar la realización del proceso regenerativo, por lo que los resultados de este estudio confirman que no se necesita un segundo pico o aumento de proliferación en todos los casos de amputación de tejido.

Contrario a lo reportado a *S. meditarreana*, los fragmentos anteriores de la población de páramo muestran menor cantidad de células mitóticas que los fragmentos posteriores, por lo que estos resultados se asemejan más a los reportados para la población del bosque montano. Al amputar un fragmento posterior este tendrá que regenerar *de novo*, intestino y una cabeza completa con cerebro, ojos y conexiones neuronales funcionales reintegradas al tejido existente. Un fragmento anterior regenerará y reintegrará menos órganos por lo que

se ha determinado que la magnitud de la respuesta de proliferación dependerá de la necesidad del fragmento para reintegrar funcionalmente órganos preexistentes (Oviedo, 2019; Pellettieri et al., 2010).

Los ensayos de proliferación celular y regeneración aquí analizados fueron realizados en planarias expuestas a 22 °C. Esta temperatura resultó ser letal a pesar de permitir la regeneración en el 8% de los individuos, lo que podría haber generado irregularidades como la ausencia de picos y falta de concentración de células en el fragmento posterior. Se necesitaría analizar la proliferación celular a 17 °C y 4 °C donde encontramos que la regeneración y supervivencia fueron más altas para confirmar los resultados observados.

**Supervivencia y regeneración.** - Inicialmente la identificación de etapas de regeneración a temperatura ambiente (22 °C) en el laboratorio representó un problema debido a la baja supervivencia de los individuos en los primeros 6 días post-amputación. La temperatura juega un papel muy importante en el metabolismo de los organismos (Huey y Stevenson, 1979), por lo que la alta mortalidad podría deberse a adaptaciones metabólicas de esta población al clima de páramo, donde la temperatura anual puede ir entre los 2 °C y 10 °C (Javellas y Thouret, 1995). Aunque la temperatura en el páramo también puede variar hasta 25 °C durante el día (Javellas y Thouret, 1995), de acuerdo a los resultados, la mayoría de individuos de esta población de páramo puede sobrevivir al menos 2 días a 22 °C sin mostrar lesiones, lo que les permitiría soportar estas variaciones diarias de temperatura típicas de su hábitat natural.

Adicionalmente, otras planarias de río también han mostrado sensibilidad a temperaturas altas como *Crenobia alpina* y *Phagocata vitta* (Wright, 1974). *Crenobia alpina* habita en ambientes montañosos con fluctuaciones de temperaturas diarias entre 10 °C y 15 °C y picos de temperaturas de hasta 25 °C (Pattee, 1969), similar a la población de páramo. Ya

que la cantidad de oxígeno disuelto en el agua varía inversamente con la temperatura (mayor temperatura, menos oxígeno), se cree que las especies que prefieren ambientes más fríos tienen una tasa de consumo de oxígeno alta, lo que causa su muerte en temperaturas más bajas donde hay menor disponibilidad de oxígeno disuelto (Daham, 1958).

Como ya se explicó anteriormente, la temperatura tiene una gran influencia en el ciclo de vida de las planarias. Debido a esto, al exponer la población de páramo a 17 °C y 4 °C (temperaturas más similares a las de su ambiente natural) la mortalidad disminuye y la supervivencia aumenta significativamente. Además de efectos en la supervivencia encontramos diferencias en la regeneración. El proceso de regeneración se retrasa a 4 °C en comparación a 17 °C identificando las primeras 3 etapas de regeneración al menos 3 días después. En contraste, a 22 °C las manchas oculares se identifican 3 días antes que a 17 °C. En *S. mediterranea* a temperaturas más altas de la usual (19 °C), el proceso de regeneración se acelera identificando manchas oculares (diferenciación definitiva) al menos dos días antes a 26 °C y 28 °C (Hammoudi et al., 2018). Por otro lado, en *Schmidtea polychroa* y *Bdellocephala punctata* al disminuir la temperatura el tiempo de regeneración se retrasa ( Brøndsted & Brøndsted, 1961). En este estudio se redujo la temperatura para permitir la supervivencia de los animales, sin embargo, también se observó el retraso del proceso de regeneración a temperaturas más bajas confirmando el efecto de la temperatura en la velocidad de regeneración de la misma especie.

**Análisis Filogenético.-** Históricamente los análisis moleculares en el orden Tricladida han presentado problemas debido a la dificultad para eliminar pigmentos o rastros de sales que puedan interferir en la calidad y pureza del ADN, sumada la ineficiencia de primers universales para este orden (Sluys y Riutort, 2018). A pesar de esto, los análisis realizados hasta el momento han resultado en árboles filogenéticos bien soportados (Álvarez-Presas,

Baguña, y Riutort, 2008; Carbayo, Silva, Riutort, y Álvarez-Presas, 2017) y también han permitido describir especies nuevas e incluso encontrar especies crípticas (Rader, Unmack, y Moore, 2017; Stocchino, Sluys, Riutort, Solà, y Manconi, 2017).

Las filogenias construidas en este estudio ubicaron a la población de páramo del Río Pita como un clado diferente a la población de bosque montano del mismo río, reportado por Oviedo (2019). Las distancias genéticas promedio obtenidas entre ambas poblaciones (9.5% EF 1- $\alpha$ , 19.33% COI) fueron lo suficientemente altas para ser consideradas especies diferentes. Debido a la sensibilidad a las temperaturas altas registrada para la población de páramo, sería muy difícil para esta sobrevivir a la altura de la población de bosque montano donde la temperatura es mayor, apoyando a estos resultados filogenéticos. A pesar de la distancia alta entre las dos poblaciones, estas se encuentran dentro del rango común para especies de un mismo género. Por ejemplo, entre especies de planarias del género *Polycelis* se ha encontrado hasta un 19.6% de distancia entre *Polycelis* sp. y *Polycelis tenius* (Rader et al., 2017).

Tanto la población de páramo como la población de bosque montano fueron ubicadas dentro del género *Girardia* según los análisis del gen mitocondrial COI. Por otro lado, los análisis del gen nuclear EF 1- $\alpha$  muestran mayor emparentación con especies de otros géneros como *Schmidtea polychroa*, sin embargo, este resultado podría deberse a la falta de información de este gen para otras especies del género *Girardia*, lo mismo que impide realizar un análisis de COI y EF 1- $\alpha$  concatenados. Aunque la distancia genética entre la población de páramo y *S. polychroa* sea más baja (~9%) que con *Girardia dorotocephala* (~22.4%), características morfológicas como la forma de la cabeza y las aurículas coincide con otras especies del género *Girardia*, por lo que se necesitaría analizar otras características morfológicas e histológicas para confirmar la clasificación sugerida.

Las distancias genéticas promedio para el gen COI entre individuos de la misma población también se mostraron altas (3.3%) en comparación a distancias reportadas para *S. polychroa*, donde solo individuos de lagos diferentes alcanzan distancias mayores al 3% (Pongratz, Gerace, y Michiels, 2002). Al analizar los haplotipos existentes dentro de la población solo se encuentra 1 nucleótido de diferencia entre los dos haplotipos de COI, por lo que estas no podrían considerarse especies crípticas dentro de la población. Un ejemplo es *Dugesia sicula* en la que se han encontrado hasta 11 nucleótidos de diferencia entre haplotipos de la misma especie (Lázaro y Riutort, 2013). Por otro lado, la elevada distancia intra-individuos que se encontró es similar a la reportada para la especie asexual *Polycelis coronata* (~3.8%) (Rader et al., 2017). Las especies asexuales pueden mantener proporciones más grandes de ADN mitocondrial con fragmentos variables debido a que todos los individuos heredan su ADNmt a la siguiente generación al contrario de las especies sexuales donde solo las hembras las heredan (Bessho, Ohama, y Osawa, 1992).

Debido a la baja capacidad de dispersión de las planarias (Lázaro & Riutort, 2013), tanto la población de páramo como la población de bosque montano podrían tratarse de especies nuevas para el Río Pita y Ecuador, ya que solo se han descrito a *Girardia festae* y *Girardia avertiginis* (Localidad, Papallacta) en el país (Borelli, 1898; Brusa et al., 2012; Sluys, Kawakatsu, y De León, 2005).

## CONCLUSIONES

La velocidad de regeneración es más lenta en la especie de páramo comparada con la de *Schmidtea mediterránea*, *Girardia tigrina* y la población de bosque montano. Los aumentos de proliferación celular también aparecen horas después, indicando que la proliferación celular avanza acorde a la velocidad de regeneración. Más ensayos a

diferentes temperaturas ayudarían a confirmar el comportamiento de las células proliferativas en esta especie de páramo.

El fragmento anterior presenta concentración de células mitóticas en la zona de la herida sin disparar el segundo pico de proliferación igual que la población de bosque montano, encontrando otro caso en el que la respuesta al tejido faltante no es necesaria para completar el proceso de regeneración.

Se sugiere que los individuos de la población de páramo utilizados en este estudio pertenecen a una especie diferente a la especie reportada anteriormente en el Rio Pita (bosque montano). Esta también podría ser una nueva especie para el Ecuador, sin embargo, se necesita analizar la histología u otros caracteres para confirmar estos resultados.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director Andrés Romero por confiar en mí y darme infinitas oportunidades. A Emilio Oviedo, por enseñarme todo sobre el manejo de planarias en el laboratorio y además motivarme siempre que lo necesitaba. A los miembros del Laboratorio de Biología del Desarrollo por sus comentarios críticos.

Agradezco a Sofía Muñoz y Vanessa Parra por guiarme con paciencia en las técnicas moleculares y análisis filogenéticos.

A mis amigos que me han acompañado a lo largo de la carrera. En especial a Daniela Zurita, Sofía Loor y Camilo Morán por estar siempre dispuestos a ayudarme.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador quien financió el trabajo de investigación.

Por último agradezco a mi familia, por apoyarme de todas las formas imaginables, por darme todo lo que he necesitado y porque se esforzaron tanto como yo para alcanzar esta etapa de mi vida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alessandra, S., y Rossi, L. (2019). Planarian stem cell heterogeneity - Novel Concepts. En A. Birbrair (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1123, pp. 39–54). Cham: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-11096-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-11096-3_4)
- Álvarez-Presas, M., Baguña, J., y Riutort, M. (2008). Molecular phylogeny of land and freshwater planarians (Tricladida, Platyhelminthes): From freshwater to land and back. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47(2), 555–568.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.01.032>
- Baguña, J. (2012). The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(1-2-3), 19–37. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113463jb>
- Bessho, Y., Ohama, T., y Osawa, S. (1992). Planarian mitochondria I. Heterogeneity of cytochrome c oxidase subunit I gene sequences in the freshwater planarian, *Dugesia japonica*. *Journal of Molecular Evolution*, 34(4), 324–330.  
<https://doi.org/10.1007/BF00160239>
- Borelli, A. (1898). Viaggio del Dr. Enrico Festa dell' Ecuador e regioni vicine. IX. Planaria d'acqua dolce. *Bolletino dei Musei di Zoologia e di Anatomia Comparata della Università di Torino*, 13(322), 1–6.
- Brockes, J. P., Kumar, A., y Velloso, C. P. (2001). Regeneration as an evolutionary variable. *Journal of Anatomy*, 199(1-2), 3–11. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2001.19910003.x>
- Brøndsted, A., y Brøndsted, H. (1961). Influence of temperature on rate of regeneration in the time-graded regeneration field in planarians. *Development*, 9(1), 159–166.

- Brøndsted, H. (1939). *Regeneration in planarians investigated with a new transplantation technique*. Dinamarca: Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S.
- Brusa, F., Negrete, L., Herrera-Martínez, Y., y Herrando-Pérez, S. (2012). *Girardia festae* (Borelli, 1898) (Platyhelminthes: Tricladida: DugesIIDae): Distribution extension in a high-altitude lake from Colombia. *Check List*, 8(2), 276–279.  
<https://doi.org/10.15560/8.2.276>
- Calow, P. (1977). The joint effect of temperature on the life cycle of four species of lake-dwelling triclads. *Oikos*, 34, 23–43.
- Carbayo, F., Silva, M. S., Riutort, M., y Álvarez-Presas, M. (2017). Rolling into the deep of the land planarian genus *Choeradoplana* (Tricladida, Continenticola, Geoplanidae) taxonomy. *Organisms Diversity and Evolution*, 18(2), 187–210.  
<https://doi.org/10.1007/s13127-017-0352-4>
- Chan, J. D., y Marchant, J. S. (2011). Pharmacological and functional genetic assays to manipulate regeneration of the planarian *Dugesia japonica*. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (54). <https://doi.org/10.3791/3058>
- Claussen, D. L., Grisak, A. G., y Brown, P. F. (2003). The thermal relations of the freshwater triclad flatworm, *Dugesia dorocephala* (Turbellaria: Tricladida). *Journal of Thermal Biology*, 28(6–7), 457–464. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(03\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(03)00039-1)
- Collins, J. J. (2017). Platyhelminthes. *Current Biology*, 27(7), R252–R256.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.016>
- Cuesta, F., Sevink, J., Llambí, L., De Bièvre, B., y Posner, J. (Eds.). (2014). *Avances en*

*investigación para la conservación de los páramos andinos*. CODESAN.

Daham, A. (1958). *Taxonomy and ecology of five species groups in the family Planariidae (Turbellaria Tricladida Paludicola)*. Malmö: Nya Litografen.

Egger, B., Gschwentner, R., y Rieger, R. (2007). Free-living flatworms under the knife: past and present. *Development genes and evolution*, 217(2), 89–104.

<https://doi.org/10.1007/s00427-006-0120-5>

González-Estévez, C. (2009). Autophagy meets planarians. *Autophagy*, 5(3), 290–297.

<https://doi.org/10.4161/auto.5.3.7665>

Hammoudi, N., Torre, C., Ghigo, E., y Drancourt, M. (2018). Temperature affects the biology of *Schmidtea mediterranea*. *Scientific Reports*, 8(1), 14934.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33355-5>

Huey, R. B., y Stevenson, R. D. (1979). Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: A Discussion of Approaches. *American Zoologist*, 19(1), 357–366.

<https://doi.org/10.1093/icb/19.1.357>

Javellas, R., y Thouret, C. (1995). Estudio de las temperaturas de las estaciones meteorológicas del transecto Parque Los Nevados (Cordillera Central, Colombia). En A. Santos & T. Van der Hammen (Eds.), *Estudios de ecosistemas tropoandinos* (pp. 241–278).

Katoh, K., y Toh, H. (2010). Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq224>

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., y Duran, C. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence

data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., y Guindon, S. (2012). PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6), 1695–1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>

Lázaro, E. M., y Riutort, M. (2013). *Dugesia sicula* (Platyhelminthes, Tricladida): The colonizing success of an asexual Planarian. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 268. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-268>

Leigh, J., y Bryant, D. (2015). PopART: Full feature software for haplotype network construction. *Methods Ecology Evolution*, 6(9), 1110–1116.

LoCascio, S. A., Lapan, S. W., y Reddien, P. W. (2017). Eye absence does not regulate Planarian Stem Cells during Eye Regeneration. *Developmental Cell*, 40(4), 381-391.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.02.002>

Mena Vásconez, P., y Hofstede, R. (2006). Los páramos ecuatorianos. En R. Moraes, L. Øllgaard, L. Kvist, F. Borchsenius, y H. Balslev (Eds.), *Botánica Económica de los Andes Centrales* (pp. 91–109). La Paz: Universidad Mayor de San Andrés.

Oviedo, E. (2019). Regeneration, reproduction and laboratory maintenance of aquatic and land planarians from Ecuador (Tesis de pregrado). Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Pattee, E. (1969). Coefficients thermiques et écologie de quelques planaires d'eau douce.

1. Tolérance des adults. *Annales de Limnologie*, 2, 469–475.

<https://doi.org/10.1051/limn/1969008>

Pellettieri, J. (2019). Regenerative tissue remodeling in planarians – The mysteries of morphallaxis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 87, 13–21.

<https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2018.04.004>

Pellettieri, J., Fitzgerald, P., Watanabe, S., Mancuso, J., Green, D. R., y Sánchez Alvarado,

A. (2010). Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Developmental Biology*, 338(1), 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.09.015>

Pongratz, N., Gerace, L., y Michiels, N. K. (2002). Genetic differentiation within and

between populations of a hermaphroditic freshwater planarian. *Heredity*, 89(1), 64–69.

<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800102>

Rader, R. B., Unmack, P. J., y Moore, J. N. (2017). Population genetics and dispersal of

the flatworm, polycelis coronata: A test of the habitat stability hypothesis. *Journal of Freshwater Ecology*, 32(1), 179–192.

<https://doi.org/10.1080/02705060.2016.1253624>

Rambaut, A. (2014). FigTree 1.4.2. Recuperado de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Reddien, P. W., y Alvarado, A. S. (2004). Fundamentals of planarian regeneration. *Annual*

*Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 725–757.

<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.095114>

Reynoldson, T. B., Young, J. O., y Taylor, M. C. (1965). The effect of temperature on the

life-cycle of four species of lake-dwelling triclads. *The Journal of Animal Ecology*,

34(1), 23. <https://doi.org/10.2307/2367>

- Ridley, M. (1993). Evolution. *Journal of Evolutionary Biology*, 6(1993), 615–617.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M., y Huelsenbeck, J. (2012). Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rossi, L., Salvetti, A., Batistoni, R., Deri, P., y Gremigni, V. (2008). Molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(1), 16–23. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7426-y>
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., y Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18), 2496–2497. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359>
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., y Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Sánchez Alvarado, A. (2000). Regeneration in the metazoans: why does it happen? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(6), 578–590. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200006\)22:6<578::AID-BIES11>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200006)22:6<578::AID-BIES11>3.0.CO;2-#)
- Sivickis, P. (1931). A quantitative study of regeneration along the main axis of the triclad body. *Archivio zoologico italiano*, 16, 430–449.
- Sluys, R., Kawakatsu, M., y De León, R. P. (2005). Morphological stasis in an old and widespread group of species: Contribution to the taxonomy and biogeography of the genus *Girardia* (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola). *Studies on Neotropical*

*Fauna and Environment*, 40(2), 155–180.

<https://doi.org/10.1080/01650520500070220>

Sluys, R., y Riutort, M. (2018). Planarian diversity and phylogeny. En J. C. Rink (Ed.), *Planarian Regeneration: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology 1774)* (pp. 5–7). Dresden: Springer. Recuperado de <http://www.springer.com/series/7651>

Spiegelman, M., y Dudley, P. L. (1973). Morphological stages of regeneration in the planarian *Dugesia tigrina*: A light and electron microscopic study. *Journal of Morphology*, 139(2), 155–183. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051390203>

Stamakis, A. (2014). RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. Recuperado de <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/21/bioinformatics.btu033.abstract>

Stocchino, G. A., y Manconi, R. (2013). Overview of life cycles in model species of the genus *Dugesia* (Platyhelminthes: Tricladida). *Italian Journal of Zoology*, 80(3), 319–328. <https://doi.org/10.1080/11250003.2013.822025>

Stocchino, G. A., Sluys, R., Riutort, M., Solà, E., y Manconi, R. (2017). Freshwater planarian diversity (Platyhelminthes: Tricladida: Dugesiidae) in Madagascar: new species, cryptic species, with a redefinition of character states. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 181(4), 727–756. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlx017>

Tanaka, E. M., y Reddien, P. W. (2011). The cellular basis for animal regeneration. *Developmental Cell*, 21(1), 172–185. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.016>

Teshirogi, W., Ishida, S., y Yamazaki, H. (1977). Regenerative capacities of transverse

pieces in the two species of fresh water planarians, *Dendrocoelopsis lactea* and *Polycelis sapporo*. *Science reports. Hirosaki University*, (24), 1–21.

Tewari, A. G., Stern, S. R., Oderberg, I. M., y Reddien, P. W. (2018). Cellular and molecular responses unique to major injury are dispensable for planarian Regeneration. *Cell Reports*, 25(9), 2577-2590.e3.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.004>

Vila-Farré, M., y C. Rink, J. (2018). The Ecology of Freshwater Planarians. En *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1774, pp. 173–205).  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1_3)

Wagner, D. E., Wang, I. E., y Reddien, P. W. (2011). Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6031), 811–816. <https://doi.org/10.1126/science.1203983>

Wenemoser, D., y Reddien, P. W. (2010). Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Developmental biology*, 344(2), 979–991.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.06.017>

Wright, J. F. (1974). Some factors affecting the distribution of *Crenobia alpina* (Dana), *Polycelis felina* (Dalyell) and *Phagocata vitta* (Duges) (Platyhelminthes) in Caernarvonshire, North Wales. *Freshwater Biology*, 4(1), 31–59.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1974.tb00938.x>

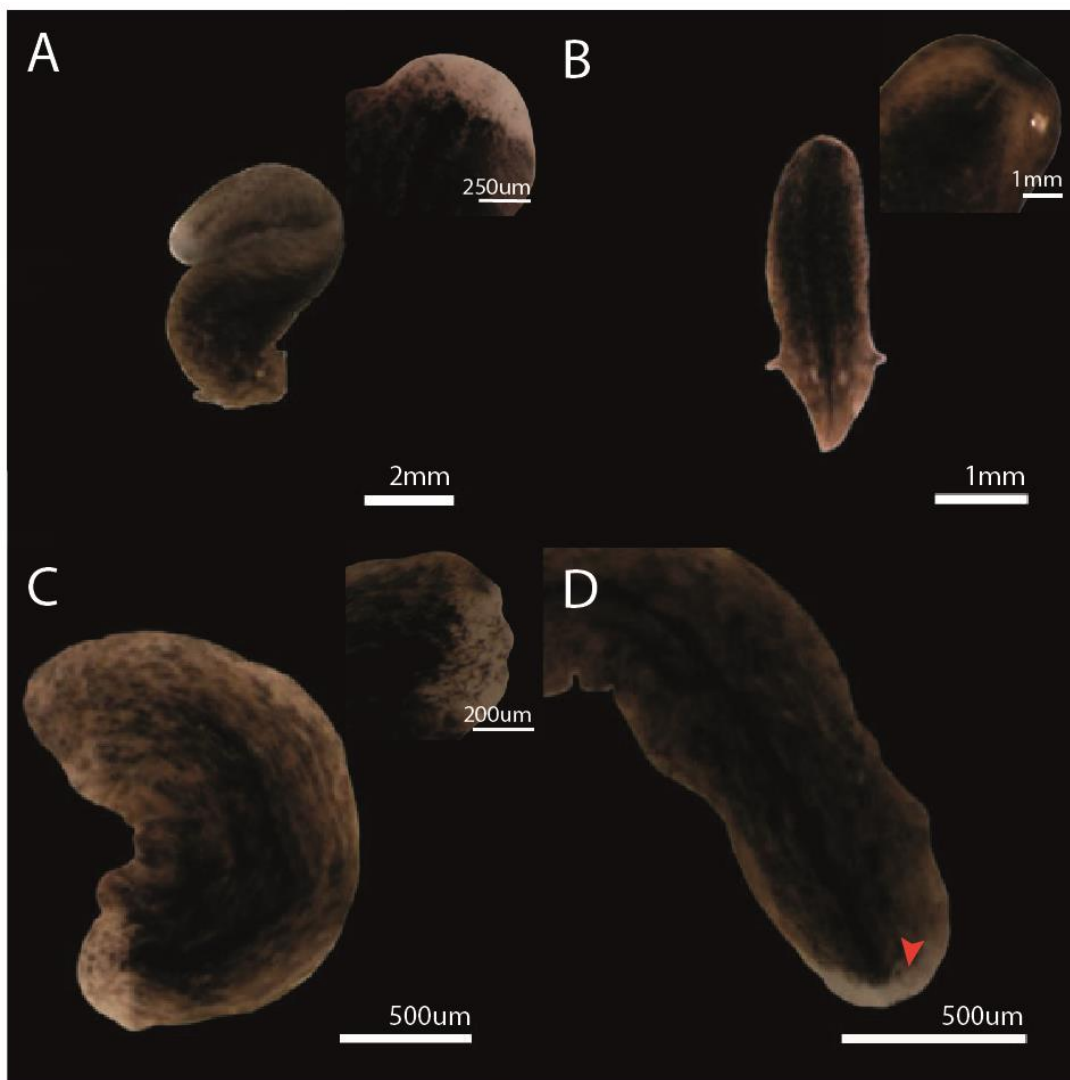
Wudarski, J., Ustyantsev, K., Glazenburg, L., y Berezikov, E. (2019). Influence of temperature on development, reproduction and regeneration in the flatworm model organism, *Macrostomum lignano*. *Zoological Letters*, 5(1), 7.  
<https://doi.org/10.1186/s40851-019-0122-6>

**FIGURAS**

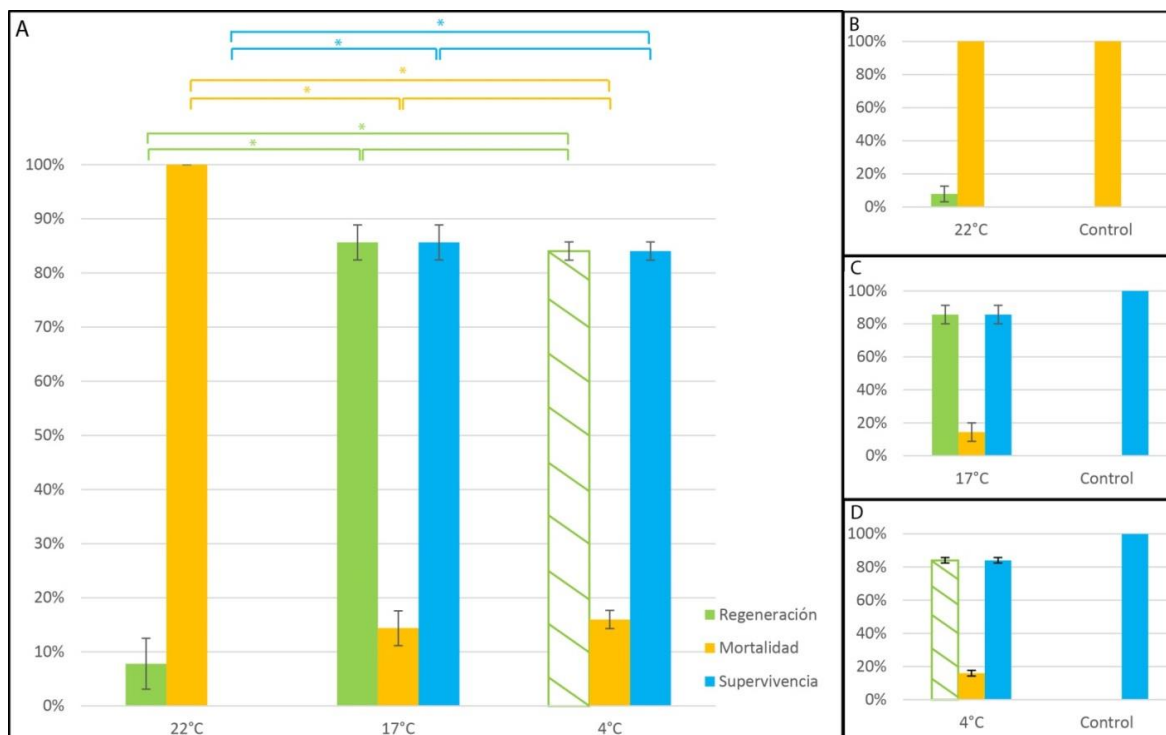
**Figura 1.** Aspecto de los individuos de la población de páramo. Las flechas negras señalan la aurícula puntiaguda conspicua y la línea oscura que divide el cuerpo.



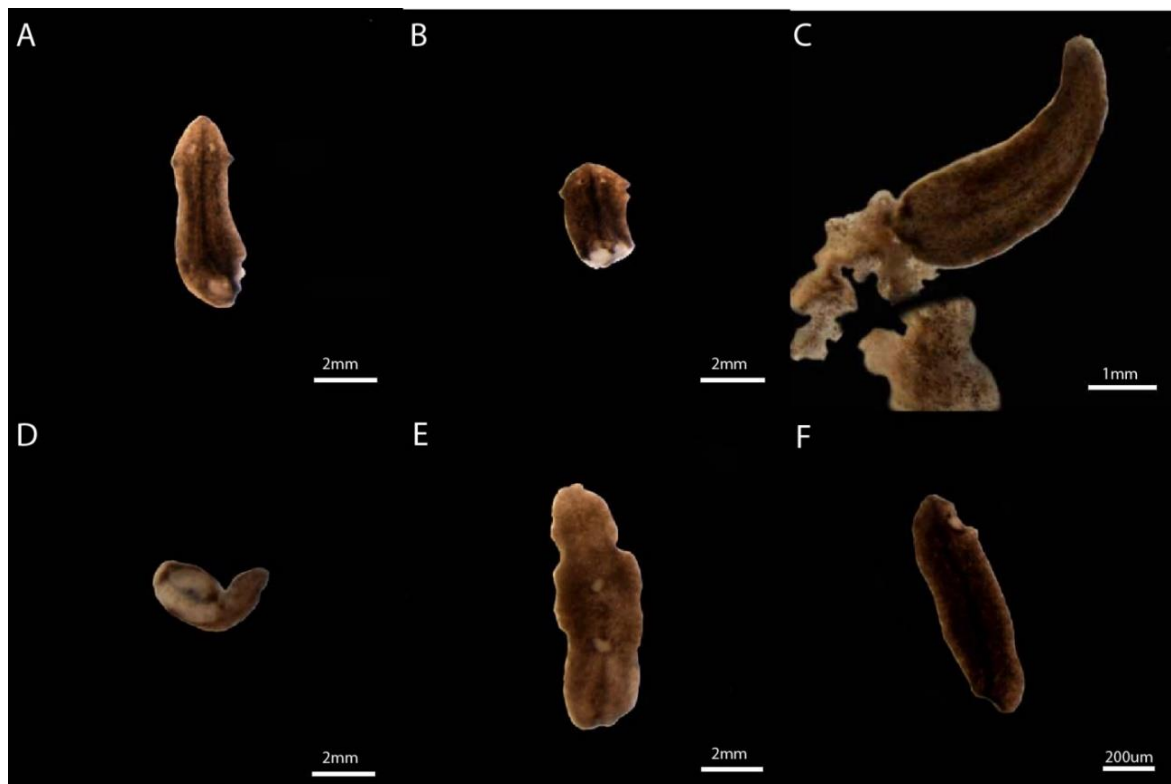
**Figura 2.** Los individuos de la población de páramo presentaron diferencias morfológicas al compararlas con la población de bosque montano. (A) Individuo de la población de páramo con coloración parda y moteada con línea negra dividiendo el cuerpo. (B) Individuo de la población de bosque montano con coloración café sin moteado y línea blanca dividiendo el cuerpo. Ambas poblaciones muestran las características del género *Girardia* como cabeza triangular con aurículas puntiagudas (las aurículas se encuentran contraídas en la foto).



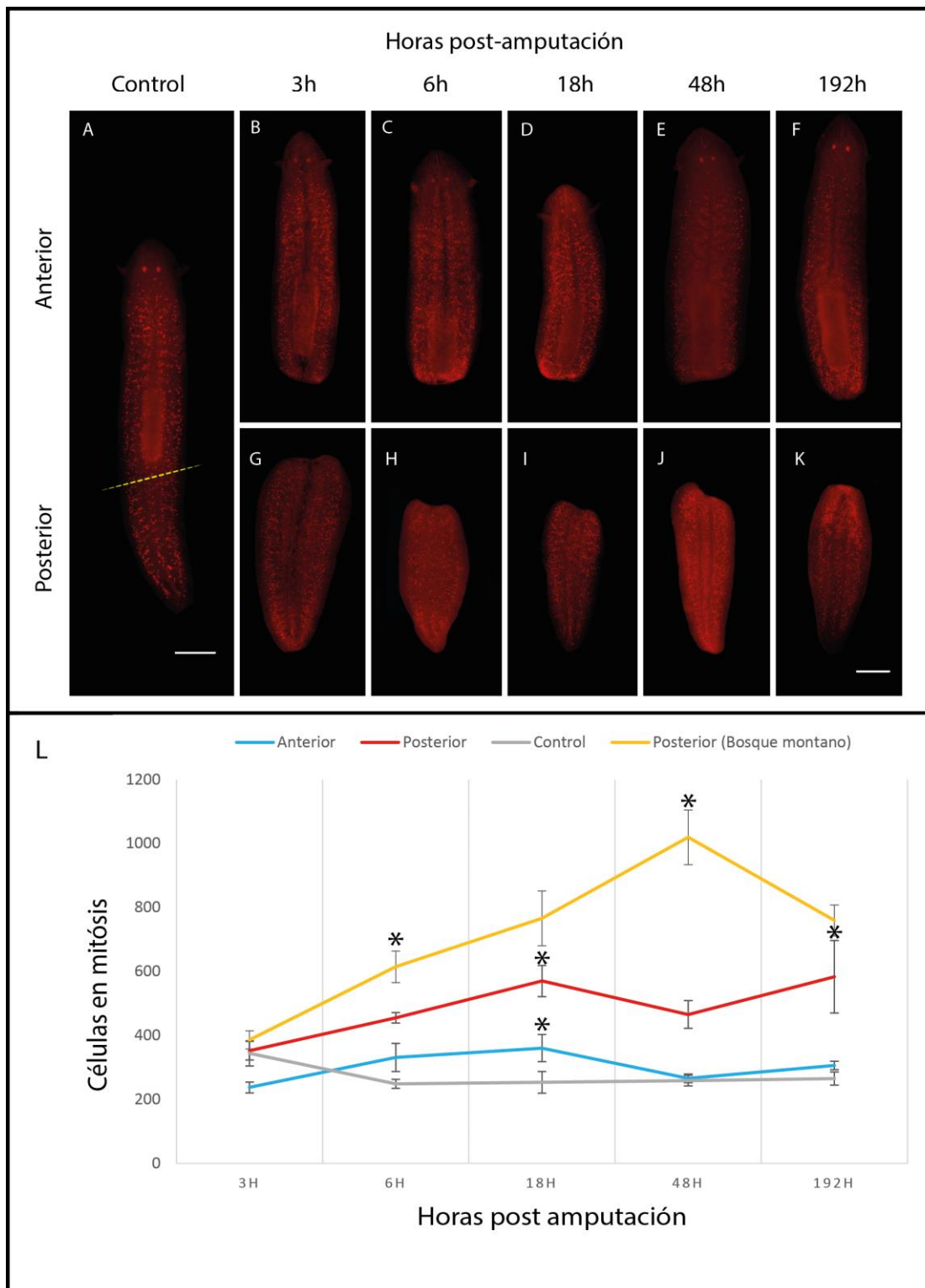
**Figura 3.** Los fragmentos anteriores y posteriores expuestos a 22 °C que logran regenerar completan el proceso de regeneración 18 días post-amputación. **(A-B)** Fragmentos anteriores 18 días después de la amputación. **(A)** Se observa blastema formado. **(B)** La herida se ha cerrado por completo y se observa tejido diferenciado con pigmentos. **(C-D)** Fragmentos posteriores 18 días después de la amputación. **(C)** Los individuos presentan células de pigmento en los nuevos tejidos regenerados. **(D)** La flecha roja indica las nuevas manchas oculares regeneradas, indicando que los neoblastos ya se han diferenciado, la masa de células regenerada es pequeña y las manchas oculares no se encuentran tan bien definidas.



**Figura 4. 22 °C es una temperatura letal para la población de páramo, el porcentaje de fragmentos regenerados es menos del 10% y todos los individuos mueren en los 21 días de observación.** En verde se observa el porcentaje de fragmentos regenerados, en amarillo el porcentaje de mortalidad y en azul el porcentaje de supervivencia que representa al total de fragmentos que vivieron más de 21 días. **(A)** 17 °C y 4 °C muestran porcentajes de supervivencia ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) y regeneración significativamente mayores a los de 22 °C. **(B)** a 22 °C el 8% de los fragmentos muestran regeneración completa, sin embargo, el 100% de los fragmentos mueren después de los 21 días. **(C)** A 17 °C 86% de los fragmentos completan el proceso de regeneración y sobreviven sobre el tiempo de observación. Se registra 14% de mortalidad. **(D)** A 4 °C los fragmentos no han completado el proceso de regeneración, sin embargo, el 84% alcanzan la etapa 3 de regeneración y sobreviven sobre el tiempo de observación. Solo el 16% de los fragmentos muere.

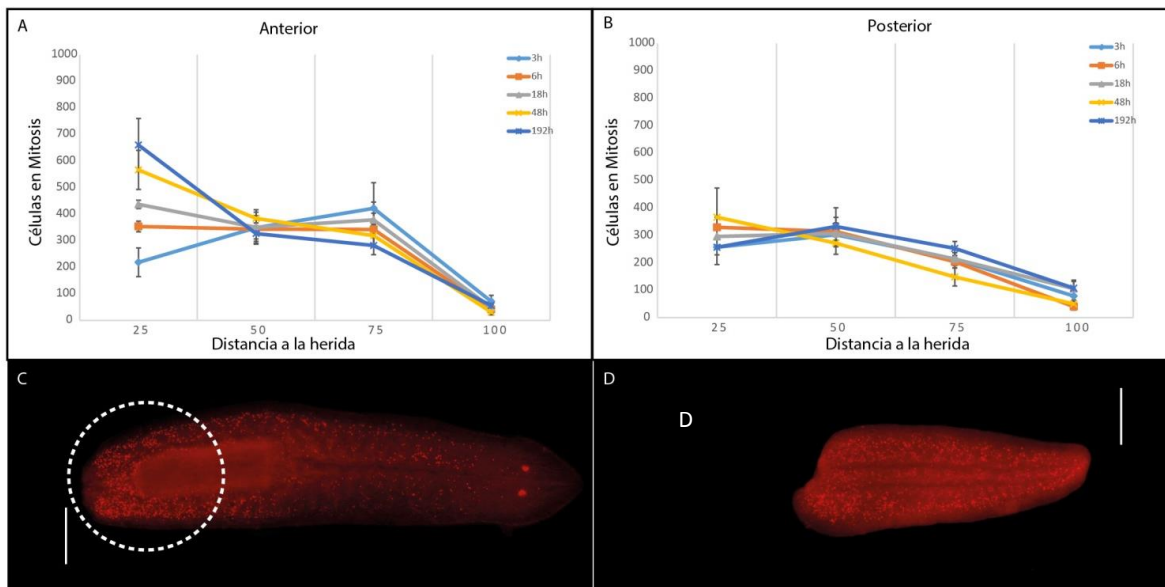


**Figura 5. Los fragmentos expuestos a 22 °C sufren lesiones o pérdida de tejido. (A- B)** Individuos que no han logrado cerrar la herida causada por la amputación y se han formado nuevas heridas en la zona. **(C-D)** Individuos que presentan tejido desprendido, **(C)** tejido perdido a partir de la herida que se encuentra desintegrándose, **(D)** epidermis perdida en la mitad de la parte ventral. **(E-F)** Planarias con heridas en otras partes del cuerpo que no sea el lugar de amputación como **(E)** la región ventral o **(F)** la región dorsal posterior.

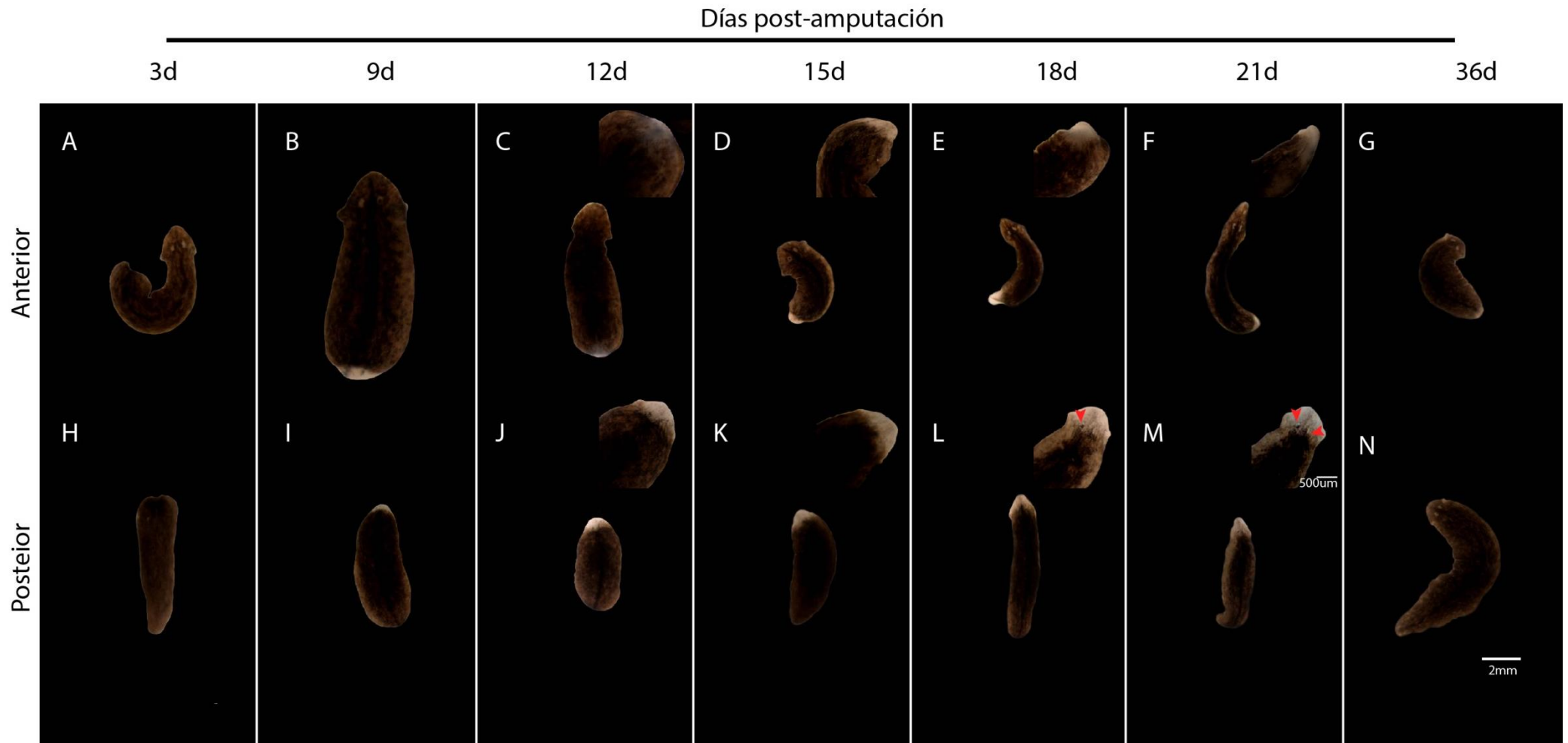


**Figura 6.** La proliferación de células mitóticas post amputación es mayor a las 18h en el fragmento anterior y a las 18h y 192h en el fragmento posterior. La cantidad de células mitóticas es menor a la encontrada en la población de bosque montano, donde los picos de proliferación se disparan a las 6h y 48h en el fragmento posterior. (A) Esquema del procedimiento de amputación, la línea verde representa el plano en el que se

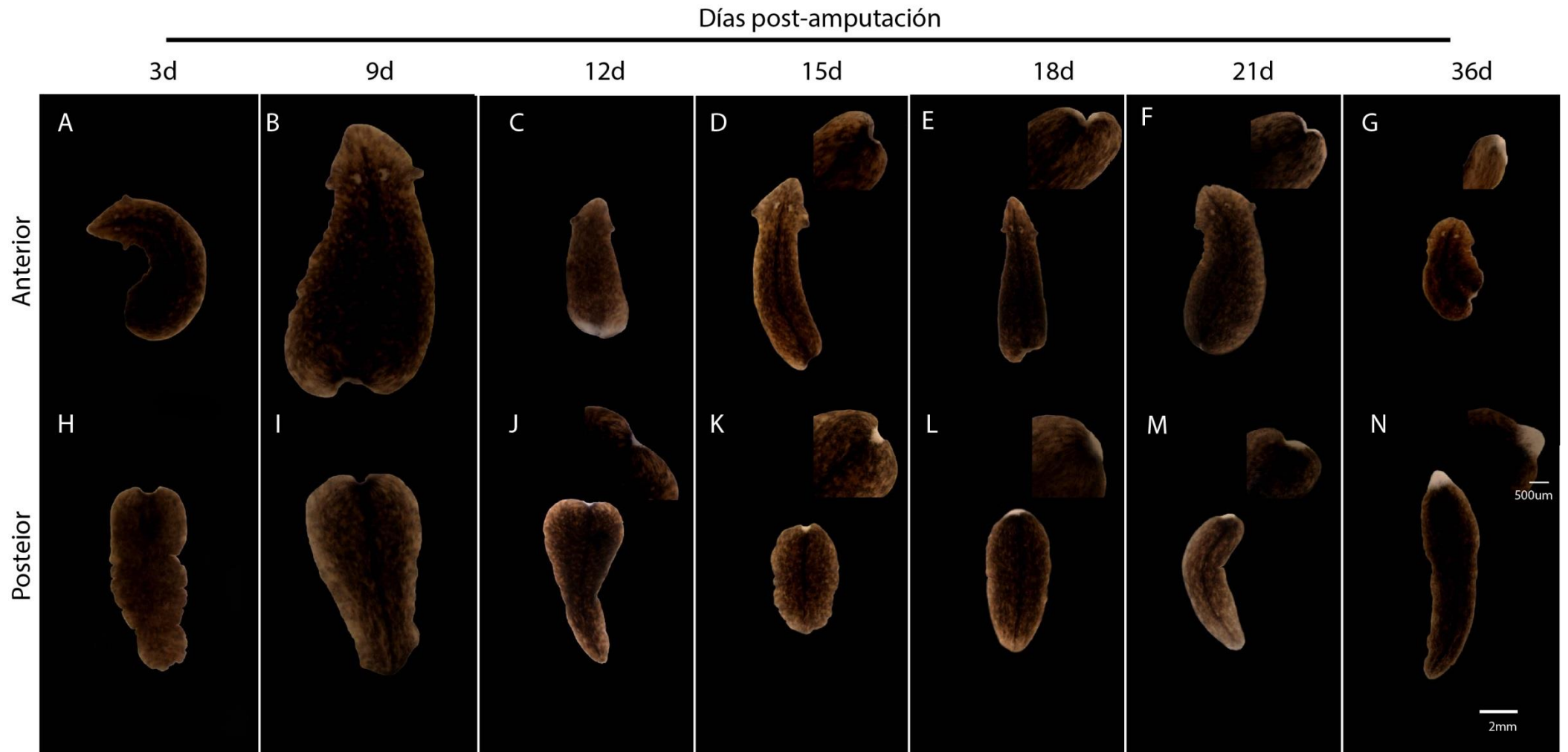
realizó el corte. Cada animal fue dividido en un fragmento anterior y posterior para ser analizado, se mantuvo controles para cada punto de tiempo sin amputar. **(B-F)** En el fragmento anterior la amputación dispara un aumento de células mitóticas a las 18h. **(G-K)** En el fragmento posterior la amputación dispara un aumento de células mitóticas a las 18h y 192h. **(L)** La densidad de células mitóticas es mayor en el fragmento anterior que en el posterior. Para el fragmento anterior el análisis de varianza muestra que existen diferencias significativas ( $p=0.0459$ ) entre las horas, siendo 18h el punto de tiempo con mayor número de células mitóticas versus 3h según la prueba de Tukey. Para el fragmento posterior el análisis de varianza muestra diferencias significativas ( $P=0.0125$ ) entre las horas, siendo 18h y 192h los puntos de tiempo con mayor número de células mitóticas versus 3h según la prueba de Tukey, a su vez esta prueba señala que 18h y 192h son los puntos de tiempo con cantidad de células mitóticas más similar entre sí.



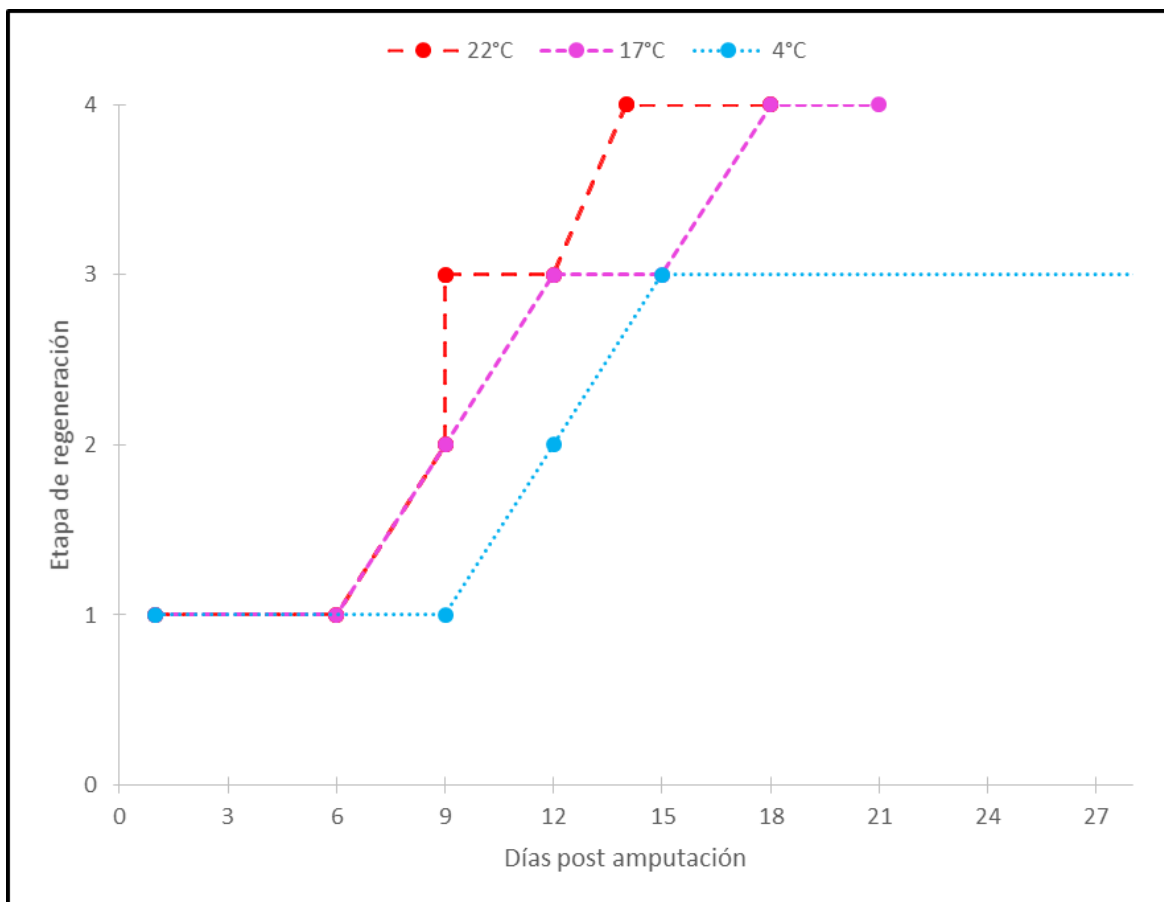
**Figura 7. Las células mitóticas se concentraron alrededor de la herida a las 192h en el fragmento anterior.** (A) Número de células mitóticas del fragmento anterior ubicadas a diferentes distancias de la herida en los puntos de tiempo analizados. Según el análisis de varianza solo se encontró diferencias significativas ( $p= 1.33e-05$ ) entre puntos de tiempo del primer intervalo, encontrándose una concentración de células mitóticas cerca de la herida a las 192h. (B) Número de células mitóticas del fragmento posterior ubicadas a diferentes distancias de la herida en los puntos de tiempo analizados. Según el análisis de varianza no se encontró diferencias significativas en ningún intervalo de distancia, indicando que la proliferación de células mitóticas se dio a lo largo todo el fragmento en todos los tiempos analizados. (C) Foto de uno de los fragmentos anteriores inmunoteñidos a las 192h. El círculo punteado blanco muestra la concentración de células mitóticas marcadas por el anticuerpo. (D) Foto de uno de los fragmentos posteriores inmunoteñidos a las 48h. No se visualiza una concentración evidente, las células mitóticas marcadas por el anticuerpo se encuentran dispersas por todo el fragmento.



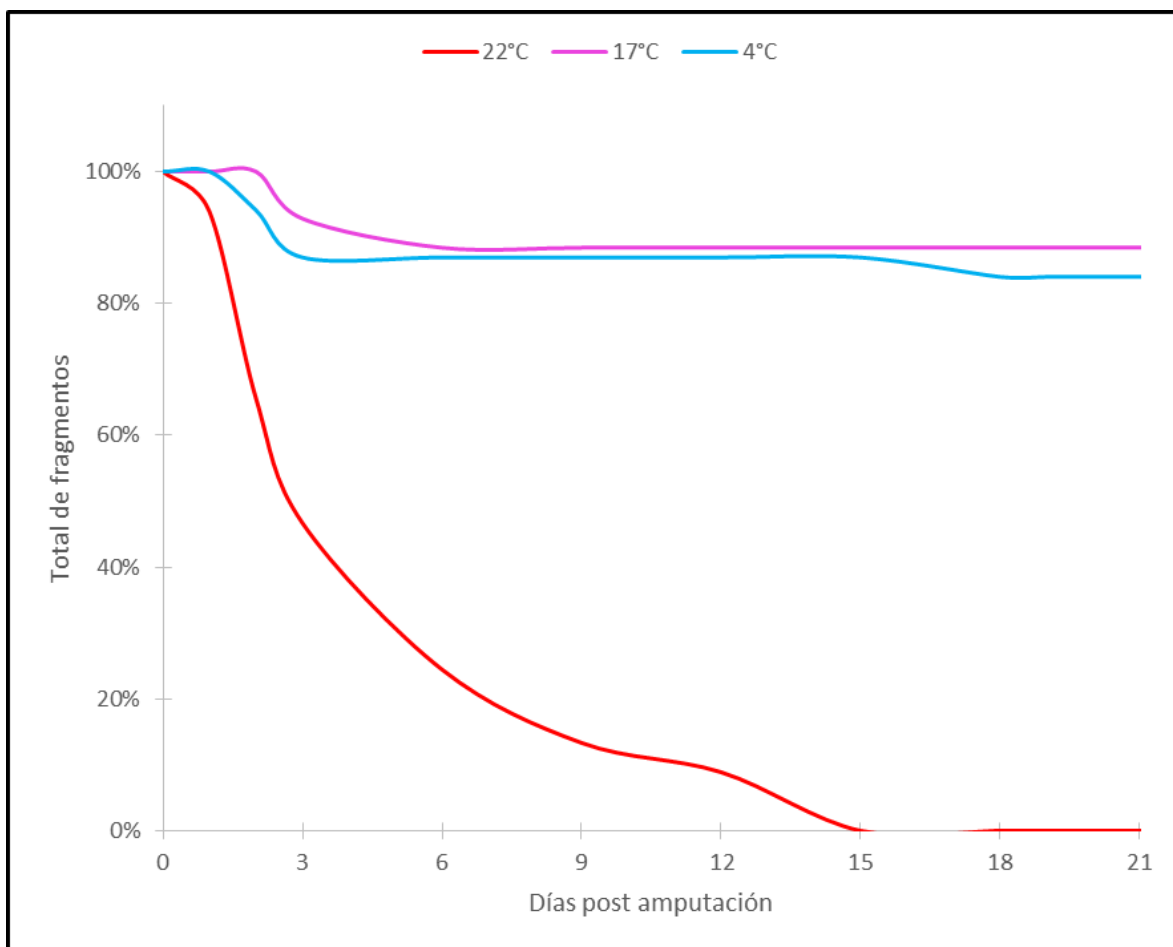
**Figura 8.** A 17°C el proceso de regeneración se completa entre los 18 y 21 días post-amputación. (A-N) Seguimiento de la regeneración en fragmentos anteriores y posteriores desde el día 3 al 21 post amputación (dpa). Adicionalmente se registró el día 36. (A, H) Cierre de la herida. (1-6dpa). (B, I) Formación del blastema (6-9dpa). (C, D, J, K) Crecimiento y diferenciación temprana (12-15dpa). (F, G, M, N) Diferenciación definitiva (18-21dpa). Las flechas rojas indican la formación de manchas oculares (G, N) regeneración y remodelación de tejidos completa.



**Figura 9.** A 4°C el proceso de regeneración no se completa en más de 21 días post-amputación, se identificaron las primeras 2 etapas de regeneración e inicio de la etapa 3. (A-N) Seguimiento de la regeneración en fragmentos anteriores y posteriores desde el día 3 al 21 post amputación (dpa). Adicionalmente se registró el día 36. (A, H, B, I) Cierre de la herida (1-9dpa). (C, J) Formación del blastema (9-12dpa) (E, F, L, M, N) Crecimiento y diferenciación temprana (empieza 15dpa). (G, N) El blastema sigue creciendo, todavía no se observa diferenciación definitiva.

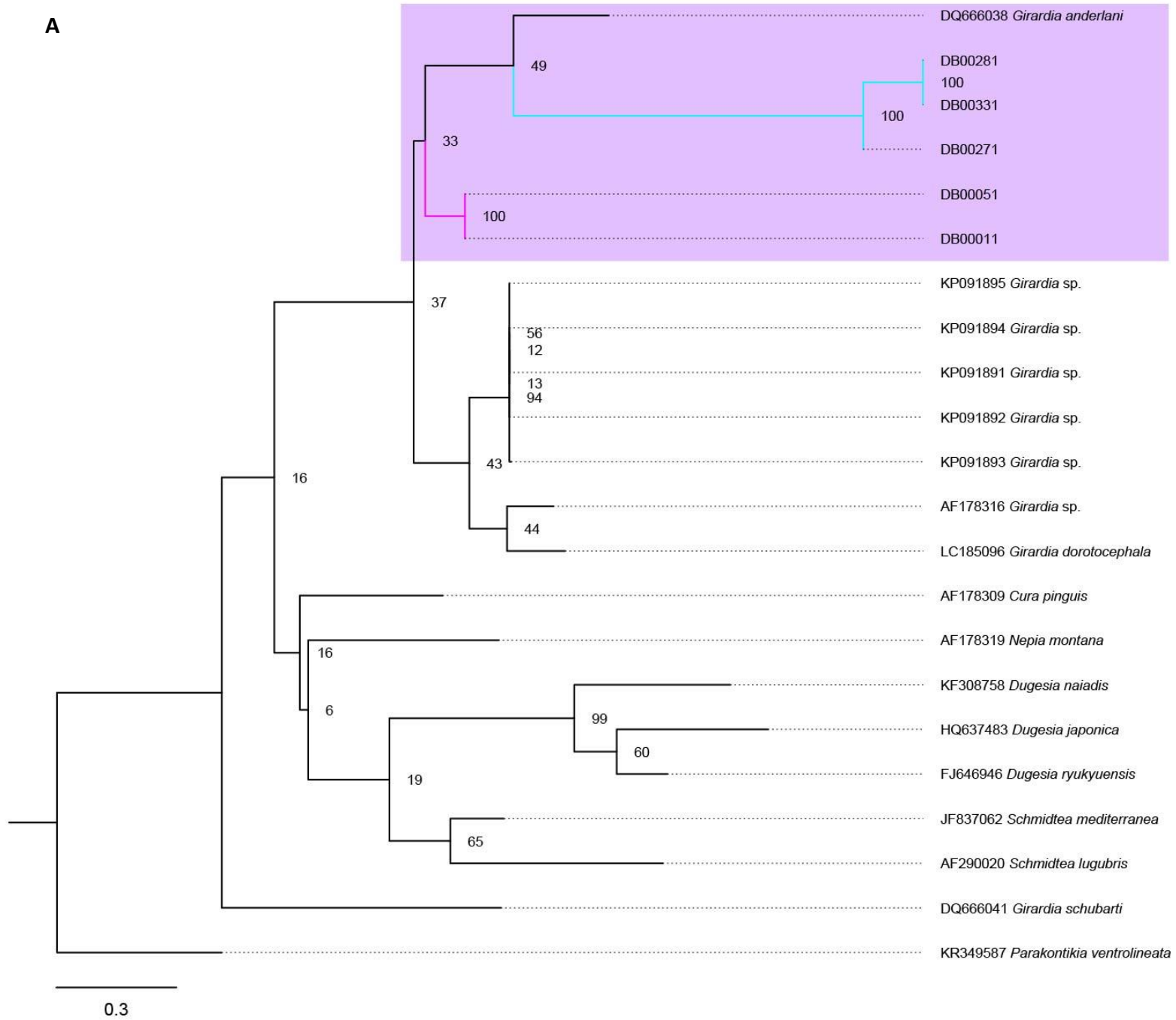


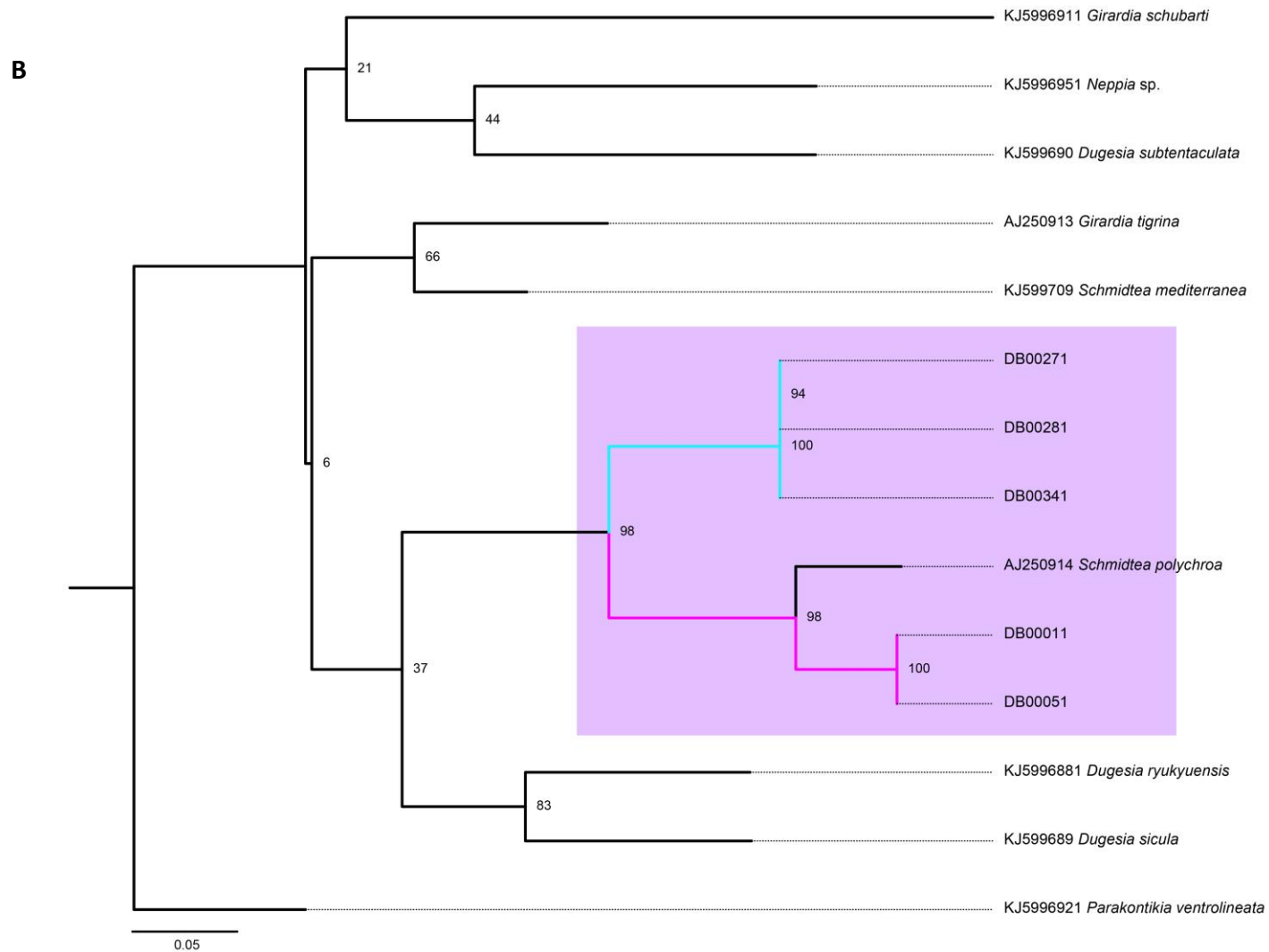
**Figura 10.** El proceso de regeneración es similar en 22 °C y 17 °C sobrelapandose en la etapa 1 y 2, mientras que a 4 °C el proceso es más lento. En 21 días de observación los fragmentos expuestos a 22 °C y 17 °C completan el proceso regenerativo, exhibiendo la etapa 4 a los 18 y 21 días respectivamente. Por otro lado, los fragmentos expuestos a 4 °C solo presentan las primeras 3 etapas de regeneración, el cierre de la herida y la formación del blastema se dan 3 días más tarde que en 22 °C y 17 °C. La tercera etapa (crecimiento y diferenciación del blastema) se extiende más de 21 días.



**Figura 11.** La mayoría de muertes se dan los primeros 6 días, 22 °C es letal mientras que 17 °C y 4 °C mantiene una cantidad estable de sobrevivientes en los 21 días de observación. 22 °C muestra una caída progresiva en la supervivencia de fragmentos hasta alcanzar la mortalidad total de los mismos, en promedio a los 15 días post-amputación. 17 °C la caída en la supervivencia se da en los primeros 6 días post-amputación, posterior a esto el número de sobrevivientes se mantiene constante por el resto del tiempo de observación. 4 °C también presenta una caída en la supervivencia en los primeros 6 días y posteriormente el número de sobrevivientes se mantiene constante hasta alcanzar el día 18 donde se registró fisión espontanea de algunos fragmentos que resulta en la muerte de los mismos en los días siguientes.

A



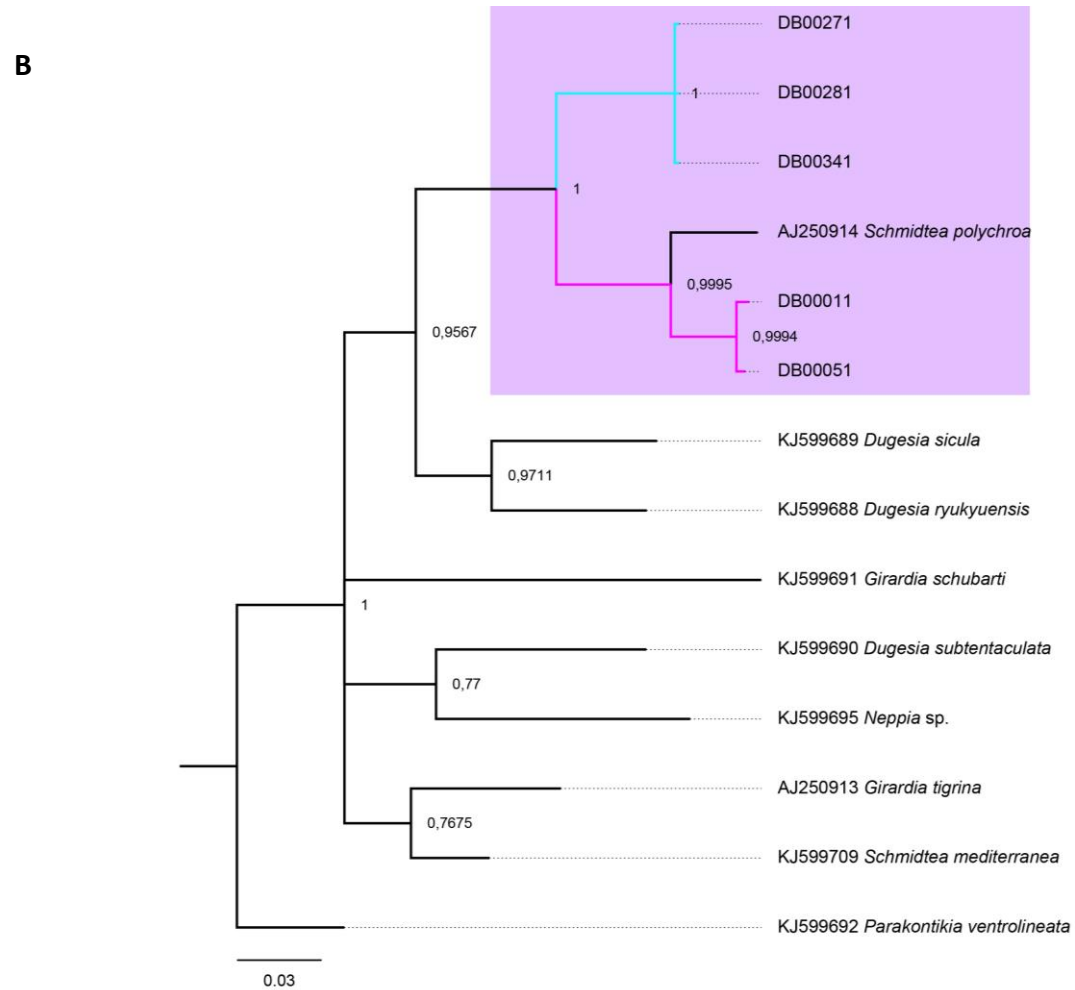


**Figura 12.** La población de planarias de páramo se encuentra formando un clado separado de la población de bosque montano (*Girardia* sp.) tanto en el gen mitocondrial COI y el gen nuclear EF 1- $\alpha$ . Árboles de máxima verosimilitud (ML), los valores en los nodos representan el valor de bootstrap. El recuadro violeta muestra las relaciones entre individuos de la población de páramo (rama cian) y la población de páramo (rama magenta) del Río Pita. **A.** EF 1- $\alpha$ . **B.** COI.

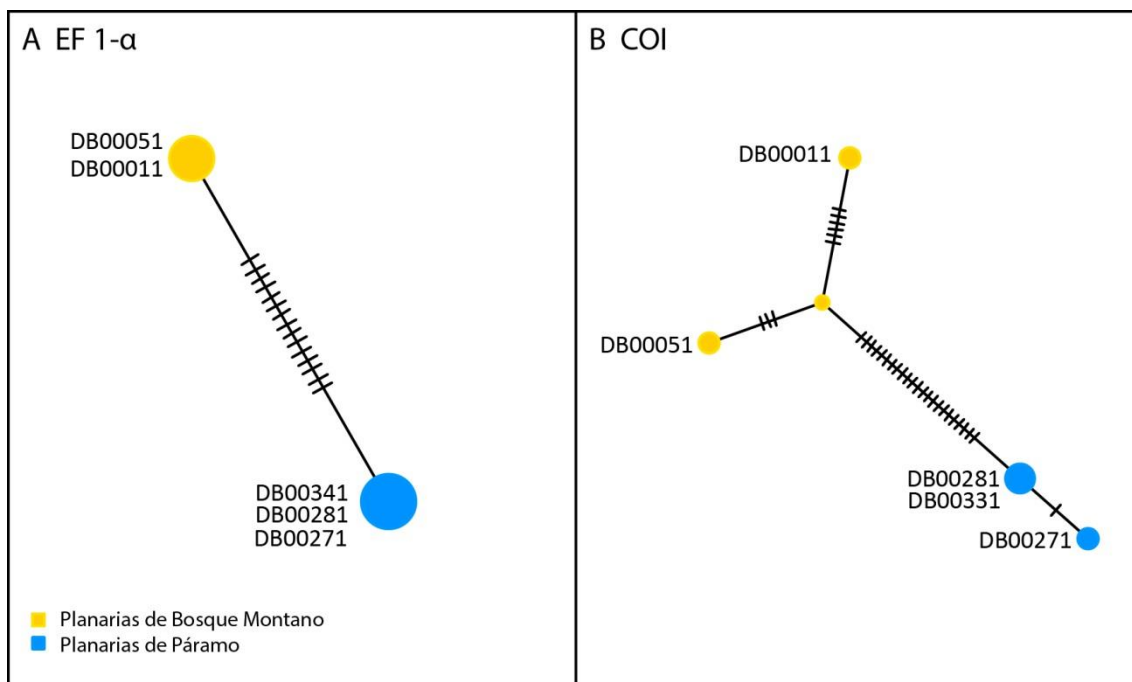
A



0.07



**Figura 13.** La población de planarias de páramo se encuentra formando un clado separado de la población de bosque montano (*Girardia* sp.) tanto en el gen mitocondrial COI y el gen nuclear EF 1- $\alpha$ . Árboles de inferencia bayesiana (IB), los valores en los nodos representan el valor de las probabilidades posteriores. El recuadro violeta muestra las relaciones entre individuos de la población de páramo (rama cyan) y la población de páramo (rama magenta) del Río Pita. **A.** EF 1- $\alpha$ . **B.** COI.



**Figura 14.** Las planarias de la población de páramo forman haplotipos separados de los haplotipos de la población de bosque montano. COI posee más diferencias en los nucleótidos que EF 1- $\alpha$ . (A) Red de haplotipos para EF 1- $\alpha$ , se muestran dos haplotipos, uno para la población de páramo y otro para la población de bosque montano con 15 nucleótidos variables. (B) Red de haplotipos para COI, se muestran dos haplotipos para la población de páramo y dos haplotipos para la población de bosque montano. Existen 22 nucleótidos variables entre ambas poblaciones.

## TABLAS

**Tabla 1.** Distancias genéticas entre individuos de la población de páramo y la población de bosque montano para el gen COI.

<b>Identificación</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b> DB00271 Páramo					
<b>2</b> DB00281 Páramo	5%				
<b>3</b> DB00331 Páramo	5%	0%			
<b>4</b> DB00051 B. montano	17%	17%	17%		
<b>5</b> DB00011 B. montano	19%	23%	23%	6%	
<b>6</b> <i>Girardia dorocephala</i>	24%	29%	29%	17%	13%

**Tabla 2.** Distancias genéticas entre individuos de la población de páramo y la población de bosque montano para el gen EF 1- $\alpha$ .

<b>Identificación</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b> <i>Schmidtea polychroa</i>					
<b>2</b> DB00341 Páramo	10%				
<b>3</b> DB00271 Páramo	10%	0%			
<b>4</b> DB00281 Páramo	12%	0%	0%		
<b>5</b> DB00051 B. montano	7%	9%	9%	9%	
<b>6</b> DB00011 B. montano	6%	10%	10%	10%	0%