فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال هشتم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۴

بررسی ترمیم و مطالعه کاریوتایپ در پلاناریای گونه *Schmidtea mediterranea*

آتوسا فلاحی [۱،۲]، مانا احمدراجی [۱]، نجمه سادات مسعودی[۱]، مهناز آذرنیا [۲]، سیده نفیسه حسنی* [۱]

[۱] پژوهشگاه رویان،گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران.

[۲] دانشگاه آزاد اسلامی واحدتهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی، تهران، ایران.

E-mail: nafiseh.hassani@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۲۴

چکیده

از دیرباز توانایی ترمیم نامحدود بافت های از دست رفته در نتیجه پیری و آسیب مورد توجه و بررسی بوده است. بیش از ۲۵۰ سال است که پلاناریا به دلیل داشتن توانایی خارق‌العاده درترمیم و بازسازی اندام‌ها و بافت‌های ازدست‌رفته به‌وسیله یک جمعیت از سلول‌های بنیادی پرتوان به نام نئوبلاست مورد توجه می‌باشد. از ویژگی‌های کلیدی نئوبلاست‌ها داشتن ظرفیت نامحدود برای خود تجدیدی، قدرت پرتوانی و توانایی سلول‌های حاصل برای تفسیر پیام‌های تمایزی است تا بتواند پاسخ صحیحی در جایگزین کردن ساختارهای ازدست‌رفته ایجاد کند. در این مطالعه، بررسی روند ترمیمی و تعداد کروموزومی در پلاناریا در گونه مدیترانیا موردبررسی قرار می‌گیرد. در این تحقیق، بعد از یک هفته گرسنگی، پلاناریاها به قطعات سری، تنه‌ای و دمی تقسیم‌شدند و در ظروف ۶ خانه‌ای حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط اختصاصی پلاناریا قرارگرفتند و به مدت دو هفته موردبررسی و مطالعه قرار گرفتند. با توجه به این‌که دو نوع ترمیم اپی‌مورفوزیس و مورفولاکسیس در پلاناریا در طول ۱۴ روز رخ می‌دهد، تمام‌اندام‌ها و بافت‌ها به‌طور کامل جایگزین و بازسازی شدند.در مرحله بعد با استفاده از دستورالعمل کاریوتایپ که در پژوهشگاه رویان بر اساس این تحقیق انجام شده است، ۸ جفت کروموزوم در این گونه شناسایی شد. پلاناریا به دلیل داشتن سلول‌های بنیادی پرتوان می‌تواند در طول‌ترمیم ساختارهای ازدست‌رفته به دلیل قطع و یا آسیب‌های بافتی را بازسازی کند. این روند ترمیمی که حاصل از تمایز سلول‌های اولیه و تمایزیافته است، می‌تواند پیش‌نیاز کارهای آینده در درمان انواعی از بیماری‌ها در چشم‌انداز پزشکی ترمیمی باشد.

کلیدواژه‌ها: پلاناریا، ترمیم، کاریوتایپ ، نئوبلاست، *Schmidtea mediterranea*

مقدمه

امروزه پزشکی ترمیمی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است به همین جهت تحقیقات گسترده‌ای به‌منظور دست‌کاری سلول‌های بنیادی و استفاده آن‌ها در آسیب‌های بافتی و درمان بیماری‌های انسانی از قبیل بیماری‌های قلبی، عصبی، استخوانی و غضروفی انجام می‌شود. هرچند که درک کافی درباره مکانیسم ترمیم و عدم وجود ترمیم در موجودات مختلف به‌طور کامل مشخص نشده است، در شاخه متازوآ گونه‌های

مختلفی وجود دارند که توانایی ترمیمی متفاوتی نسبت به هم دارند[۲].

در میان موجوداتی که دارای تقارن دو طرفی هستند، پلاناریاها جز قدرتمندترین موجودات از لحاظ ترمیم به‌حساب می‌آیند. در پلاناریا انواع سلول‌ها توسط یک جمعیت از سلول‌های بنیادی پرتوان بالغ به نام نئوبلاست‌ها جایگزین می‌شوند [۲۷، ۱۴، ۴].این اصطلاح را هریت راندولف در سال ۱۸۹۲ به سلول‌های مشابه جنینی تمایز نیافته که در طول شکل‌گیری مزودرم جدید پس از شکافت در کرم‌های خاکی ایجاد می‌شود، اشاره کرده است [۲۴]. پلاناریاها اعضای آزاد زیر راسته Seriata از رده Turbellaria از همین شاخه هستند [۲۹] و نام عمومی اعمال شده به گونه‌ای از راسته Tricladida و از شاخه کرم‌های پهن است [۱۲]. پلاناریا دارای سه لایه جنینی و فاقد حفره است. در طبیعت تولیدمثل آن‌ها به دو صورت جنسی و غیرجنسی است [۷]. این موجودات فاقد گردش خون، سیستم تنفسی و ساختار اسکلتی هستند و یک توده محکم از بافت، به نام مزانشیم یا پارانشیم، فضای بین اپیدرم و روده را پرکرده است [۲۷]. بدن آن‌ها دارای سیستم گوارشی، دفعی، مغز، سیستم پاسخ به نور، سیستم عصبی و یک حلق است. نئوبلاست‌ها ۳۰-۲۰٪ بدن یک کرم بالغ را تشکیل می‌دهند که به‌عنوان تنها سلول‌های تکثیر شونده در بدن تعریف شده‌اند. توزیع این سلول‌ها در طول مزانشیم صورت گرفته است و در ناحیه حلق و مناطق مقابل گیرنده سری وجود ندارند [۳, ۱۷]. تولید سلول‌های جدید و جایگزینی آن‌ها با سلول‌های از دست‌رفته و یا قدیمی می‌تواند مقابله با شرایط نامناسب و بی‌غذایی را برای رشد و یا عدم رشد و حفظ هوموستازی فراهم کند [۲۲, ۳۰].

ترمیم مستلزم دریافت پیام درنتیجه از دست دادن اندام‌ها و ساختارهای پیچیده است که تکثیر و تمایز سلول‌های جدید، ساخت مجدد بخش‌های از دست‌رفته را القاء می‌کند، و سپس پیام‌ها و دستور العمل‌های خاص، الگوهای مناسب در بازسازی اندام‌ها و بافت‌های جدید را فراهم می‌کند. در آخر، بافت‌ها، اندام‌ها و ساختارهای جدید باید با بافت‌های قبلی در بازگرداندن عملکرد طبیعی هم مسیر می‌شوند [۱۳]. بازسازی در پلاناریا به دو نوع ترمیم اپی‌مورفوزیس ومورفولاکسیس تقسیم می‌شوند [۲۰]. در ترمیم اپی‌مورفوزیس تکثیر سلول از تکوین بخش جدید پیشی می‌گیرد و پدیده تشکیل بلاستما- جوانه فاقد رنگ‌دانه با منشأ مزانشیمی- درترمیم رخ می‌دهد. در ترمیم مورفولاکسیس بخشی از اندام به طور مستقیم به اندام جدید و یا بخشی از اندام جدید تغییر شکل می‌دهد و این عمل بدون تکثیر سلولی در سطح بریدگی اتفاق می‌افتد [۵].

در بررسی ترمیم به نظر می‌رسد که محرک بازسازی در پلاناریا ایجاد آسیب است و قطع عضو موجب یک سری از پاسخ‌ها می‌شود که هدف آن‌ها به حداقل رساندن از دست دادن بافت‌ها است . در ابتدا، بخش آسیب‌دیده پلاناریا نسبت به زخم عکس‌العمل نشان می‌دهد و انقباض ماهیچه‌ای قوی در محل زخم در عرض چند ثانیه رخ می‌دهد تا جایی که مساحت سطح به حداقل می‌رسد [۲۰]. سپس، سلول‌های رابدیت به‌عنوان سلول‌های حفاظتی در محل زخم با ترشح مخاط یک پوشش ایجاد می‌کنند[۲۶]. فرآیند انتشار سلولی به‌جای تکثیر سلولی، لایه‌نازک اپیتلیوم زخم را در مدت ۳۰ دقیقه

می‌پوشاند. زمانی که فعالیت میتوزی در پلاناریای دارای بریدگی بررسی می‌شود، تکثیری ناگهانی و وسیع سلول‌ها در نزدیکی مکان آسیب مشاهده می‌شود که منجر به تولید یک جوانه بدون رنگ در اثر برهمکنش سلول‌های پوششی با مزانشیم زیرین خود می‌شود و از آن تحت عنوان بلاستمای ترمیم نام برده می‌شود [۱۹]. برخلاف بافت اسکار که در انسان ایجاد می‌شود، در پلاناریا بلاستما تشکیل می‌شود. بنابراین در پلاناریا در مکان بریدگی، بافت پوششی در تماس مستقیم با بافت‌های دیگر است [۴]. در آخرین مرحله از بازسازی پلاناریا درنتیجه تمایز سلول‌های ترمیمی در پاسخ به نور عکس‌العمل دارد که نشان دهنده کامل شدن ترمیم است [۶]. پلاناریا یک مدل ترمیمی بسیار قوی در شرایط *In vivo* است، در این تحقیق بررسی کاریوتایپ صورت گرفته است به دلیل استفاده از بلاستما، ناحیه بی رنگ که حاصل از روند ترمیمی بوده و مملو از سلول‌های در حال تقسیم میتوزی در این مدل دستورالعمل کاریوتایپ بررسی و انجام شد به علت اینکه پروتکل جامعی را برای گونه های دیگر ارائه دهیم. به همین دلیل در اینجا روند ترمیمی در ناحیه آسیب دیده و کاریوتایپ گونه غیرجنسی پلاناریای مدیترانیا مورد بررسی قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها

شرایط نگهداری پلاناریا

در این تحقیق از پلاناریای غیرجنسی کلون شده گونه *Schmidtea mediterranea* که در پژوهشگاه رویان نگهداری می‌شود، استفاده‌شده است. به‌منظور نگهداری پلاناریا از محیط اختصاصی (PAM)[1] با pH= ۶/۸–۷/۲ استفاده شد که در دمای ۲۰–۱۶ درجه سانتی‌گرادو در تاریکی درون ظروف شیشه‌ایی پلاستیکی نگهداری می‌شود. برای تغذیه پلاناریاها از کبد گوساله استفاده شد. کبد را به قطعات کوچک ۲ سانتی‌متری تقسیم نموده، در ظروف ریخته و بعد از سه ساعت باقیمانده کبد را از محیط خارج و پلاناریاها به ظروف جدید با محیط اختصاصی تازه منتقل شدند.

جدول۱. ترکیب شیمیایی محیط اختصاصی پلاناریا

ردیف	نام ماده	غلظت موردنیاز (میلی مولار/۱ لیتر)
۱	سدیم کلرید	۱/۶
۲	کلسیم کلرید	۱/۰
۳	منیزیم سولفات	۱/۰
۴	منیزیم کلرید	۰/۱
۵	پتاسیم کلرید	۰/۱
۶	سدیم بیکربنات	۱/۲

قطعه‌قطعه کردن پلاناریا

برای قطعه‌قطعه کردن پلاناریاها در شرایط آزمایشگاهی، به مدت یک هفته به پلاناریاها غذا داده نمی‌شد و سپس با استفاده از تیغ جراحی در پتری دیش‌های شیشه‌ای بزرگ آن‌ها به ۳ یا ۵ قطعه تقسیم می‌شدند.

بررسی روند ترمیمی

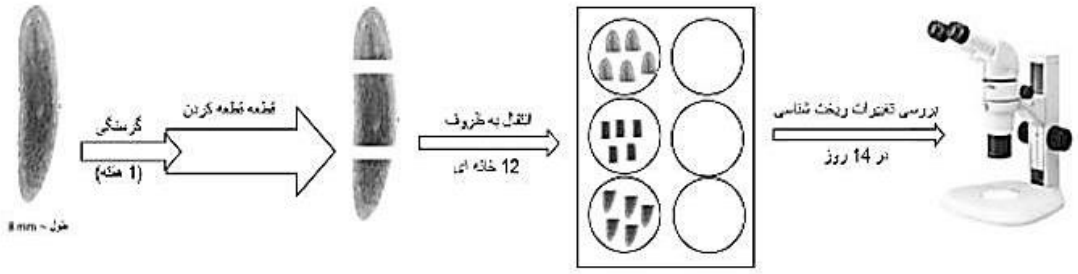
بعد از یک هفته شرایط گرسنگی، بدن ۵ عدد پلاناریا به سه قطعه سر، تنه و دم تقسیم شدند. قطعات در ظروف ۶ خانه‌ای قرار داده شدند که هر چاهک حاوی ۵ میلی‌لیتر از محیط اختصاصیPAM بود. سه قطعه بدن پلاناریا به مدت ۱۴ روز بررسی شدند و در طی این مدت تحت عکس‌برداری و فیلم‌برداری قرار گرفتند (شکل۱).

[1] Planarian Artificial Medium

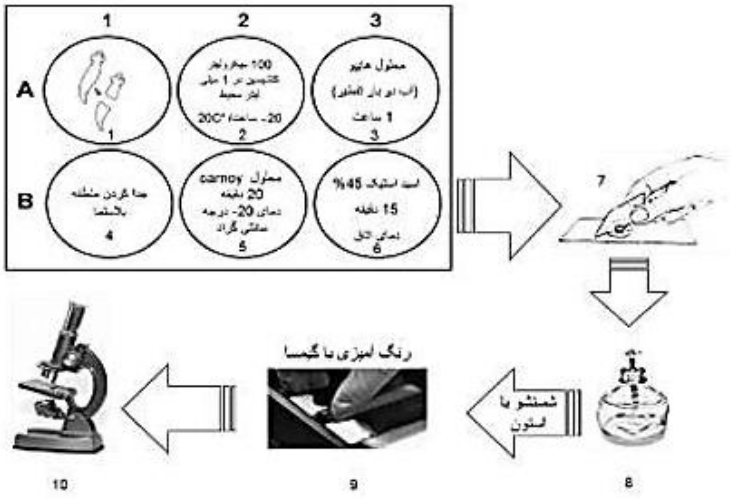
بررسی کاریوتایپ

برای انجام کاریوتایپ (شکل۲)، پلاناریاها بعد از یک هفته گرسنگی به قطعات بسیار کوچک تقسیم شدند. قطعات پلاناریا در ظروف ۶ خانه‌ای در یک میلی‌لیتر محیط به همراه ۲۰۰ ماکرو لیتر کلشی سین به مدت ۱۶-۲۰ ساعت در دمای ۲۲ قرار گرفتند. سپس این کرم‌های پهن به مدت ۱ تا ۲ ساعت در محلول هایپو (آب دو بار تقطیر) در دمای اتاق قرار داده شدند (بعد از این مرحله ترجیحاً منطقه بلاستما جدا می‌شد).

با استفاده از محلول Carnoy (اتانول ۱۰۰٪ و استیک اسید ۱۰۰٪ به نسبت ۳ به ۱) در دمای ۲۰- به مدت ۲۰ دقیقه نمونه‌ها فیکس شدند. پلاناریاها به مدت ۱۵ دقیقه در استیک اسید ۴۵٪ قرار داده شدند. در مرحله لام گیری از روش لام گرم استفاده شد و نمونه‌ها را بین لام و لامل له کرده تا یک‌لایه بسیار نازک از سلول‌ها بر روی لام قرار گیرد. بعد از جدا کردن لامل‌ها، لام‌ها با استون شستشو داده شدند. در آخر رنگ‌آمیزی لام‌ها با رنگ گیمسا انجام شد.



شکل ۱. شکل شماتیک از روش بررسی روند ترمیم پلاناریا. پلاناریا را بعد از یک هفته گرسنگی قطعه قطعه کرده و در ظروف شش خانه ای قرار داده و به مدت ۱۴ روز روند ترمیمی را مورد بررسی قرار داده ایم.



شکل۲. شماتیک مراحل انجام دستورالعمل کاریوتایپ. ۱. قطعه قطعه کردن ۲. کلشیسین ۳. محلول هایپو ۴. جدا کردن بلاستما ۵. محلول Carnoy ۶. استیک اسید ۴۵٪ ۷و۸.لام گرم ۹.رنگ آمیزی با گیمسا ۱۰.بررسی

نتایج:

- **ارزیابی روندترمیم**

با توجه به اینکه نمونه‌ها به سه قسمت سر، تنه و دم تقسیم شده بودند به‌صورت جداگانه در چاهک‌ها

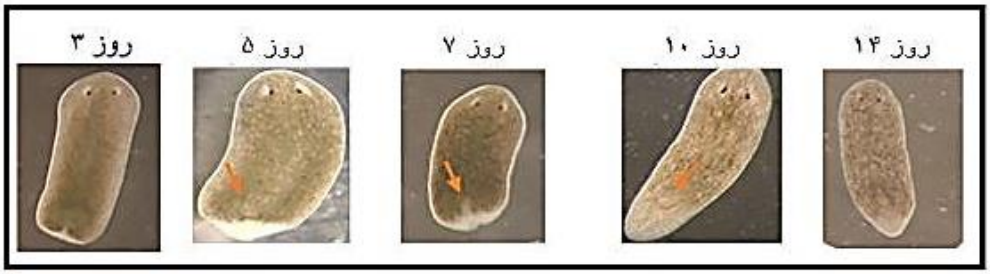
قرار داده شدند و در طی ۱۴ روز بررسی شدند که مورفولوژی آن‌ها در روزهای ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۴ در شکل آورده شده است (شکل۵ و ۴، ۳). به‌محض ایجاد برش، تقسیم میتوزی در سلول‌های این ناحیه منجر به بسته شدن زخم و تشکیل بلاستما در ۳۰ دقیقه اول می‌شود. ناحیه ازدست‌رفته در ۷ روز اول تحت ترمیم اپی‌مورفوزیز ترمیم می‌شود که با تشکیل بلاستما همراه بوده و روند تکثیر و رشد سلولی به‌طور کامل انجام می‌شود [۲۰]. از روز هفتم تا چهاردهم ترمیم از نوع مورفولاکسیس است که در این حالت تکثیر سلولی وجود ندارد بلکه با ایجاد تناسب بین اعضا جدید و قدیم پلاناریا به شکل کامل یک پلاناریا بالغ دست می‌یابد [۵].

روند ترمیم در سر:

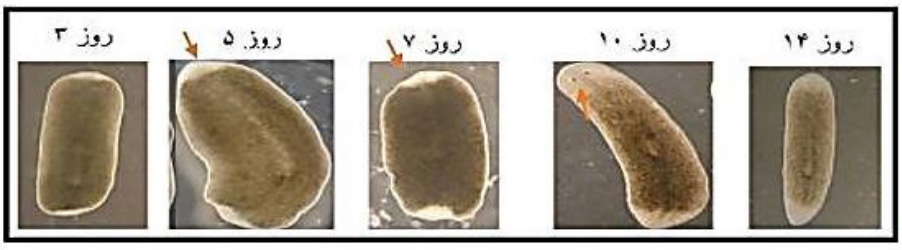
در این ناحیه بخش اعظم سیستم عصبی مرکزی ازجمله گانگلیون‌های مغزی، چشم‌ها و سیستم عصبی محیطی و ماهیچه‌ها وجود دارند. در بخش سری فقط حلق به‌صورت کامل وجود ندارد. در این ناحیه بعد از شکل‌گیری بلاستما در روز ۳ ادامه سیستم عصبی محیطی و ماهیچه‌ها شکل می‌گیرند و از روز پنجم به بعد حلق شروع به شکل‌گیری می‌کند (شکل۳).

روند ترمیم در تنه:

در قسمت جلویی بخش تنه که ناحیه سری ایجاد می‌شود انتظار می‌رود گانگلیون‌های مغزی، چشم‌ها و ادامه سیستم عصبی و در قسمت عقبی که ناحیه دمی ایجاد می‌شود انتظار می‌رود ادامه سیستم عصبی و ماهیچه‌ها در طی ترمیم تشکیل شود. در ناحیه تنه، حلق به‌طور کامل وجود دارد. در قسمت جلویی تنه، چشم‌ها از روز چهارم ۶ تشکیل می‌شوند (شکل۴).



شکل۳. روند ترمیم در قطعه سری پلاناریا. شکل‌گیری حلق در روز ۵، ۷ و ۱۰ قابل مشاهده است. از روز ۱۰ به بعد حلق کاملاًتشکیل‌شده است.



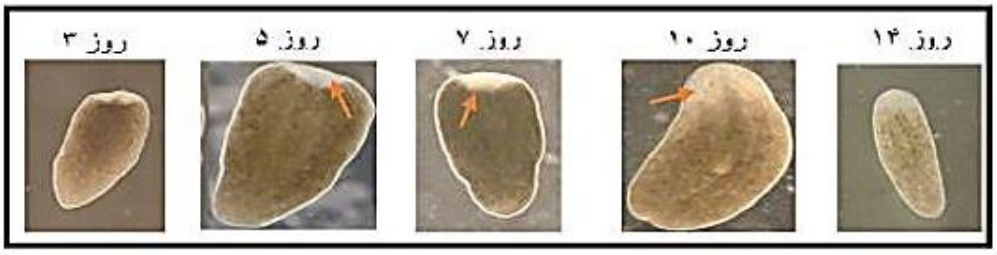
شکل۴. روند ترمیم در قطعه تنه ای در پلاناریا. شکل‌گیری چشم‌ها در روز ۵، ۷ قابل مشاهده می باشد و از روز ۱۰ به بعد به صورت کامل تشکیل شده و مشخص است.

روند ترمیم در دم:

در این ناحیه بخش اعظم سیستم عصبی مرکزی ازجمله گانگلیون‌های مغزی، چشم‌ها و سیستم عصبی محیطی و ماهیچه‌ها و حلق وجود ندارد. از روز ۴ چشم‌ها و روز ۵ حلق در طی ترمیم قابل‌مشاهده هستند (شکل ۵).

- **کاریوتایپ**

بررسی متافاز بر روی لام ها بر اساس روش له کردن بر روی لام گرم در گونه غیرجنسی پلاناریا نشان می‌دهد این گونه دارای ۸ جفت کروموزوم می‌باشد. سلول‌های در حال تقسیم در ناحیه بلاستمای ایجاد شده پس از قطعه قطعه کردن و آسیب بافتی در این تحقیق مورد استفاده قرارگرفته است که نشان دهنده قدرت ترمیمی بسیار بالا است. در اینجا بررسی تعداد کروموزومی بر اساس سلول‌هایی با قابلیت تقسیم و ترمیم مورد بررسی قرار گرفته است. شکل ۶ نشان دهنده تعداد کروموزوم‌ها و نحوه قرارگیری در گروه‌های مربوطه براساس اندازه می باشد [۲۰].



شکل۵ . روند ترمیم در قطعه دمی در پلاناریا. شکل‌گیری چشم‌ها در روز ۵، ۷ قابل مشاهده می‌باشد و از روز ۱۰ به بعد به صورت کامل تشکیل شده و مشخص است.

شکل۶. کروموزوم‌ها در گونه مدیترانیا .الف) تمای کلی از کروموزوم ها در گونه مدیترانیاکه دارای ۸ جفت کروموزوم(۸=2n) است. ب) فلش‌ها نشان‌دهنده ناحیه جابجاشدگی در گونه غیرجنسی پلاناریا گونه مدیترانیا می‌باشند.

بحث و نتیجه گیری:

بازسازی یک پدیده گسترده در سراسر قلمرو حیوانات است، اما تغییرات آن از بی‌مهرگان تا انسان

کاملاً متفاوت بوده است. در میان بی‌مهرگان پلاناریا به دلیل داشتن سلول‌های بنیادی پرتوان، پتانسیل ترمیم خارق‌العاده و ژن‌های مشترک با مهره‌داران ازجمله انسان مشابه می‌باشد به همین دلیل موردتوجه ویژه و روزافزون محققین قرار گرفته است [۱۵]. بیش از ۲۵۰ سال است که توانایی‌ترمیم در پلاناریا موردبررسی قرارگرفته است و پالاس اولین بار در قرن ۱۸، توانایی ترمیم یک قطعه بریده‌شدهسری را در یک پلاناریای کامل توضیح داد [۲۰]. پلاناریا می‌تواند به‌عنوان مدلی مناسب جهت مطالعه رفتار سلول‌های بنیادی بالغ در حالت In vivo مورداستفاده قرار گیرد [۱۶].

ژنوم پلاناریا گونه *Schmidtea mediterranea* به‌طور کامل توالی‌یابی شده است و امکان مطالعات مولکولی و ژنتیکی را فراهم می‌سازد [۱۱]. مکانیسم‌های مولکولی تنظیم‌کننده پرتوانی در پلاناریا، سلول‌های بنیادی جنینی و زاینده پستانداران در طول تکامل کاملاً حفظ‌شده و مشترک می‌باشنددرنتیجه پلاناریا می‌تواند مدل مناسبی جهت مطالعات سلول‌های بنیادی انسانی مورداستفاده قرار گیرد [۲۰, ۲۲, ۲۱]. بسیاری از پروتئین‌های پلاناریا مشابه پروتئین‌های انسانی هستند و بسیاری از ژن‌های پلاناریا شناخته‌شده‌اند که با بیماری‌های انسان مرتبط هستند [۱۶]. به عنوان مثال باوجود درجه نسبتاً بالای حفاظت‌شدگی بین پروتئین‌های عصبی در پلاناریا و مهره‌داران، پژوهش در مورد پلاناریا می‌تواند منتج به فعال نمودن ترمیم شبکه‌های عصبی پستانداران گردد که توانایی‌ترمیم بسیار محدودی دارند [۲۱, ۱۸]. امید بر آن است با استفاده از این شباهت‌ها در ژن‌ها و پروتئین‌ها در آینده‌ای نه چندان دور راه‌حل مناسبی جهت درمان بیماری‌ها ارائه شود. تکنیک‌های مختلفی از جمله RNAi، فن Brdu، ایجاد تداخل ژنی با واسطه RNA دو رشته‌ای و هیبریداسیون درجا برای مطالعه عملکرد ژنی در پلاناریا وجود دارد [۲۸].

با توجه به این‌که صدها گونه ازپلاناریاها وجود دارند، انتخاب هرگونه تنها به‌عنوان یک مدل برای تجزیه‌وتحلیل تکنیک‌های مولکولی با مشکلات زیادی همراه است. در حالت ایده آل، انتخاب یک‌گونه بر اساس چند ویژگی ازجمله سهولت نسبی پرورش در آزمایشگاه، رشد و نمو (وجود انواع جنسی و غیرجنسی)، ژنوم دیپلوئید و اندازه کوچک، قابل‌مقایسه است. بیشتر گونه‌های شناسایی‌شدهدر پلاناریا به‌عنوانمیکسوپلوئیدو یا پلیپلوئید معرفی و بررسی شده‌اند [۲۶]. برای مثال، بررسی و مطالعه ژن Hox به دلیل اینکه در گونه‌های Girardiatigrina (۲n=۱۶) [۱۰] و Dugesia japonica (۳n=۲۴) [۹] به‌صورت میکسوپلوئیدی هستند، مختل شده است. برخلاف گونه‌های فوق، مدیترانیا یک دیپلوئید پایدار (۲n=۸) با یک ژنوم هاپلوئید ۷x۱۰۸ ~ است [۸, ۱۲]. به دلیل همین ثبات است که این‌گونه مدل جهانی شده است.

با توجه به قوی بودن ترمیم در این‌گونه تمایز نئوبلاست ها و تشکیل بلاستما در پلاناریا به‌عنوان یک مدل *In vivo* مورد توجه قرار گرفته است [۴]. به همین دلیل با استفاده از سلول‌های در حال تقسیم، فاز متافازی کروموزوم‌ها در این‌گونه بررسی شده است. روش‌های متفاوتی برای بررسی کاریوتایپ در گونه‌های مختلف انجام شده است که این روش نیز در پژوهشگاه رویان بر اساس تحقیق انجام شده بر روی گونه *Scmidtea mediterranea* بررسی شده است. بررسی این‌گونه از پلاناریا شرایط لازم برای بررسی روند ترمیمی و بررسی کروموزومی در گونه‌های دیگری از پلاناریا را برای ما فراهم می‌کند. امید

می‌رود بـا اسـتفاده از روش‌هـای انجـام‌شـده در ایـن تحقیق، شرایط لازم را برای معرفی گونه‌های جدیـد و مقایسه آن‌ها با گونه مدیترانیا نیز فراهم کند.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های انجام این طرح از سوی پژوهشگاه رویان تأمین شده است.

منابع:

[1] Aboobaker, A. A. and D. Kao (2012). "A lack of commitment for over 500 million years: conserved animal stem cell pluripotency." The EMBO journal **31**(12): 2747-2749.

[2] Agata, K. (2003). "Regeneration and gene regulation in planarians." Current opinion in genetics & development **13**(5): 492-496.

[3] Agata, K., T. Tanaka, C. Kobayashi, K. Kato and Y. Saitoh (2003). "Intercalary regeneration in planarians." Developmental dynamics **226** (2): 308-316.

[4] Alvarado, A. S. (2004). "Planarians." Current Biology **14**(18): R737-R738.

[5] Alvarado, A. S., P. A. Newmark, S. M. Robb and R. Juste (2002). "The Schmidtea mediterranea database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration." Development **129** (24): 5659-5665.

[6] Alvarado, A. S. and P. A. Tsonis (2006). "Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models." Nature Reviews Genetics**7**(11): 873-884.

[7] Baguñà, J. (2012). "The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes." International Journal of Developmental Biology **56** (1-2-3): 19-37.

[8] Baguñà, J., S. Carranza, M. Pala, C. Ribera, G. Giribet, M. A. Arnedo, M. Ribas and M. Riutort (1999). "From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to Professor Mario Benazzi."

[9] Bayascas, J., E. Castillo, A. Munoz-Marmol and E. Salo (1997). "Planarian Hox genes: novel patterns of expression during regeneration." Development **124**(1): 141-148.

[10] Benazzi, M. and G. Benazzi-Lentati (1976). "Animal Cytogenetics, vol. 1." Platyhelminthes. Gebr. Borntraeger, Berlin and Stuttgart.

[11] Cantarel, B. L., I. Korf, S. M. Robb, G. Parra, E. Ross, B. Moore, C. Holt, A. S. Alvarado and M. Yandell (2008). "MAKER: an easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes." Genome research **18** (1): 188-196.

[12] Carranza, S., J. Baguna and M. Riutort (1997). "Are the Platyhelminthes a monophyletic primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences." Molecular Biology and Evolution **14** (5): 485-497.

[13] Cebrià, F., T. Adell and E. Saló (2010). "Regenerative medicine: lessons from planarians." Stem cell, regenerative medicine and cancer. Nova Science Publisher, Hauppauge, NY: 29-68.

[14] Forsthoefel, D. J. and P. A. Newmark (2009). "Emerging patterns in planarian regeneration." Current opinion in genetics & development **19** (4): 412-420.

[15] Forsthoefel, D. J., A. E. Park and P. A. Newmark (2011). "Stem cell-based growth, regeneration, and remodeling of the planarian intestine." Developmental biology **356** (2): 445-459.

[16] Gentile, L., F. Cebrià and K. Bartscherer (2011). "The planarian flatworm: an in vivo model for stem cell biology and nervous system regeneration." Disease Models and Mechanisms **4** (1): 12-19.

[17] Handberg-Thorsager, M., E. Fernández and E. Salo (2008). "1. Abstract 2. Stem cells and regeneration 2.1. Stem cells 2.2. Regeneration across the animal kingdom 2.3. Making use of regeneration 3. Planaria, a real regenerating model system 3.1. Historical overview." Frontiers in Bioscience **13**: 6374-6394.

[18] Mineta, K., M. Nakazawa, F. Cebrià, K. Ikeo, K. Agata and T. Gojobori (2003). "Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by comparative genomics analysis of planarian ESTs." Proceedings of the National Academy of Sciences **100** (13): 7666-7671.

[19] Newmark, P. A. and A. S. Alvarado (2001). Regeneration in planaria, Wiley Online Library.

[20] Newmark, P. A. and A. S. Alvarado (2002). "Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics." Nature Reviews Genetics **3** (3): 210-219.

[21] Önal, P., D. Grün, C. Adamidi, A. Rybak, J. Solana, G. Mastrobuoni, Y. Wang, H. P. Rahn, W. Chen and S. Kempa (2012). "Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells." The EMBO journal **31** (12): 2755-2769.

[22] Oviedo, N. J., P. A. Newmark and A. Sánchez Alvarado (2003). "Allometric scaling and proportion regulation in the freshwater

Developmental dynamics **226** (2): 326-333.
[23] PRATS, J. (1991). "Analisi del contingut de DNA a planaria d'aigües dolces per citometria de flux i citoespectrofotmetria." Universitat de Barcelona.
[24] Randolph, H. (1892). "The regeneration of the tail in Lumbriculus." Journal of Morphology **7** (3): 317-344.
[25] Reddien, P. W. and A. S. Alvarado (2004). "Fundamentals of planarian regeneration." Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **20**: 725-757.
[26] Reisinger, E. and S. Kelbetz (1964). "[FINE STRUCTURE AND DISCHARGE MECHANISM OF RHABDITES.]." Zeitschrift fur wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik **65**: 472-508.
[27] Saló, E. (2006). "The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarian Schmidtea mediterranea." planarians (Platyhelminthes)." Bioessays **28** (5): 546-559.
[28] Saló, E. and J. Baguna (2002). "Regeneration in planarians and other worms: new findings, new tools, and new perspectives." Journal of Experimental Zoology **292** (6): 528-539.
[29] Sluys, R., M. Kawakatsu, M. Riutort and J. Baguna (2009). "A new higher classification of planarian flatworms (Platyhelminthes, Tricladida)." Journal of Natural History **43** (29-30): 1763-1777.
[30] Takeda, H., K. Nishimura and K. Agata (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): 805-813.