

Síntesi proteica i expressió gènica durant la regeneració a la planària  
Dugesia (G) tigrina.

Collet, Joan i Baguñà, Jaume.  
Departament de Genètica, Facultat de Biologia, U.B.  
Diagonal 645, 08028 BARCELONA

Patterns of Protein Synthesis and expression during regeneration in the planarian  
Dugesia (G) tigrina.

Protein patterns and temporal profile of protein synthesis have been studied during cephalic regeneration in the planarian Dugesia(G) tigrina. The temporal analysis of uptake and incorporation of labelled aminoacids during regeneration show three main periods of synthetic activity: 1) 4-8 hours of regeneration, probably related to wound healing processes and early blastema formation; 2) 30-36 hours, when growth is at maximum and early signs of differentiation begins; and 3) 7 days of regeneration, when terminal differentiation and cephalization occur. In each period tested, protein synthesis is always higher in blastema and postblastema areas than in regions far from the wound.

The pattern of protein contents at different periods, analyzed by 2-dimensional electrophoresis (IEF + PAGE), show that differences are mainly quantitative. Up to now, 790 polypeptides have been detected; of these, 660 are present in all periods of regeneration. The rest (130 polypeptides) are first detected at 4-8 hours in regions near the wound and later on in regions far from it. A small group, but very specific, only appears at 6-7 days of regeneration when blastema cells are engaged in terminal differentiation.

These results are discussed in terms of temporal and spatial differential gene expression as related to cell proliferation, cell differentiation and pattern formation.

Introducció

Dugesia (G) tigrina, com la majoria de les planàries, és capaç de restituir les estructures perdudes després d'una amputació. Ja que el procés resulta en el re-establiment de la morfologia normal i la distribució asimètrica original de les cèl.lules, la regeneració de planària ha estat un model per l'estudi de la proliferació i diferenciació cel.lular i de la formació del patró (Baguñà, 1974; Pedersen, 1972; Saló i Baguñà, 1984; Saló i Baguñà, 1986).

Fins fa poc es disposava de molt poca informació sobre els canvis bioquímics i d'expressió gènica que ocorren durant la regeneració a planàries. Martelly i col. (1981) demostraren que és en les primeres hores quan hi ha una forta activitat sintètica, tan de DNA (a les 12 hores) com de RNA (al voltant de les 16 hores). Encara que varen establir també el patró de síntesi proteica, un estudi comparatiu i diferencial de les diferents regions de l'organisme respecte a la zona d'amputació no ha estat realitzat.



En la majoria d'estudis referents al moment d'aparició i síntesi de proteïnes durant el desenvolupament s'han emprat sistemes embrionaris (Van Blerkom i col., 1982; Bédard i Brandhorst, 1983; Lovell-Badge i col., 1985). Són rars aquests tipus d'estudis en sistemes de regeneració. Cal esmentar el treball de Slack (1982) a la regeneració de l'extremitat de l'axolot on trobà que el patró proteic variava poc fins el moment de la diferenciació del cartíleg i múscle. A la regeneració de *Hydra*, Lesh-Laurie i col (1986) trobàren en canvis qualitius apreciables, sobretot precedint la formació del primer parell de tentacles.

En aquest treball hem examinat el contingut proteic de diferents regions de l'organisme (blastema + post-blastema, i regió llunyana de la ferida) durant la regeneració cefàlica, sometent els extractes proteics a electroforesi bidimensional (SDS-2D PAGE) (O'Farrell, 1975). Els resultats indiquen que la majoria (85 %) de les proteïnes es mantenen constants mentre que les diferències són sobretot de tipus quantitatiu, concentrades principalment en dos períodes: durant les primeres hores de regeneració i durant la formació i diferenciació de les estructures cefàliques.

#### Material i mètodes

**Animals:** Els especimens usats foren *Dugesia (G) tigrina*, recolectades al riu Calders (Barcelona). Totes les decapitacions eren fetes per sota les aurícules i els individus es deixaven regenerar durant diferents temps (0 h, 4 h, 8 h, 16 h, 20 h, 24 h, 36 h, 48 h, 3 d, 5 d, 7 d, 9 d, 15 d i 25 d) a 17°C en solució salina estèril en presència de gentamicina (25 µg/ml; Sigma, London).

**Incorporació de  $^{14}\text{C}$ -aminoàcids a proteïna:** Grups de 15 animals (8-10 mm. de llargada) a un determinat temps de regeneració cefàlica eren incubats en 300 µl de 10 µCi/ml de  $^{14}\text{C}$ -aminoàcis (U- $^{14}\text{C}$  algal Proteinhydrolysate 57 mCi/mmol, Amersham) en solució salina estèril + 75 µg/ml de gentamicina durant 4 hores a 17°C. Es netejàren 5 cops en solució salina estèril i cada animal es tallava en tres trossos: blastema + post-blastema, regió central i cua (veure fig.1.). Es juntaven totes les mateixes regions de cada estadi de regeneració i s'homogeneitzaren en solució TITX (50 mM tris-HCl, pH 8.0 (Sigma)/ 5mM EDTA/ 150 mM NaCl/ 0.02 %  $\text{NaN}_3$  (Merck)/ 0.05 % britó x 100 (Loch Ligth Ltd.)/ 4 mM Benzamidina (Sigma)).

El posterior processament de la mostra i la mesura de la radioactivitat associada a la fracció TCA-soluble (FS: aminoàcids que s'incorporen al "pool" intracel.lular) i a la TCA-insoluble (FI: aminoàcids que s'incorporen a la proteïna) es fa d'acord a Collet i Baguñà (1986).

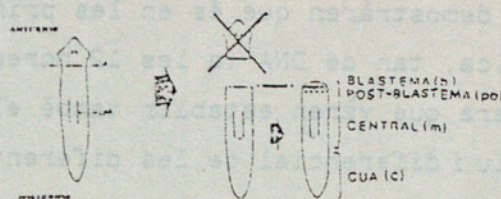


Fig. 1. Vista dorsal de *Dugesia tigrina* amb indicació del nivell d'amputació i de les diferents regions en un regne- cant posterior: blastema (b), post-blastema (pb), regió cen- tral (m) i cua (c); pl: farings.



Extracció proteica per a 2D-PAGE: Les mostres proteiques es preparaven d'acord a Tracy i Young (1984) a partir de les regions blastema + post-blastema i regions llunyanes de la ferida (veure fig. 1.) d'animals en els mateixos estadis de regeneració que els de l'apartat anterior. La quantificació del contingut proteic es feu pel mètode de Bradford (1975).

Electroforesi bidimensional (2D-PAGE): Els extractes protèics (75-100  $\mu\text{g/gel}$ ) es separaven segons la tècnica d'O'Farrell (1975) modificada per Bravo (1984). Els polipèptids es detectaven mitjançant la tinció d' $\text{Ag}^+$  descrita per Collet i Baguña (1986). La comparació dels gels es va fer com descriuen Collet i col. (1984).

### Resultats:

#### Patró de síntesi proteica durant la regeneració cefàlica:

L'examinació del patró de síntesi proteica durant la regeneració cefàlica de la planària ens permetrà identificar els períodes de major activitat sintètica, els quals podran ésser correlacionats amb els d'altres macromolècules (per exemple, DNA i RNA) i amb esdeveniments morfogènètics.

Les dades promig de 5 experiments independents es mostren a la fig.2b. Cada interval de marcatge és designat com un temps singular, aquell del final de l'interval: és a dir, animals marcats entre, per exemple, 16 i 20 h. després de l'amputació són referits com regenerants de 20 h.. Les activitats específiques (dpm/mg proteïna) de cada període en un experiment donat eren referides com tant per 1 de l'activitat específica en l'animal intacte. Aquest procediment elimina les diferències entre experiments que resultaven dels canvis en l'estat dels individus emprats.

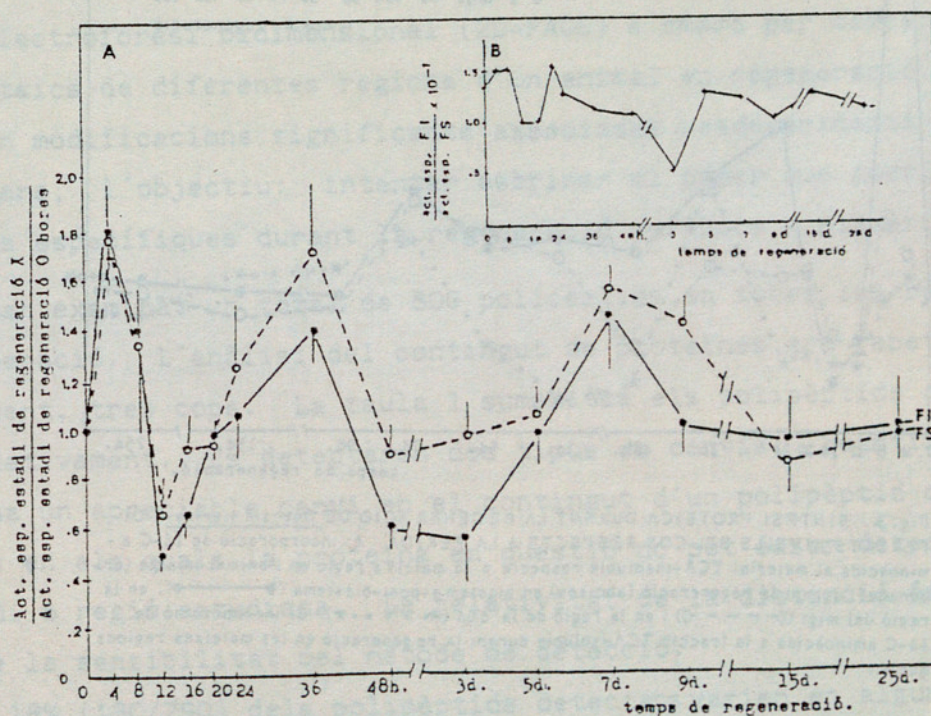


Fig. 2. ENTRADA D'AMINOACIDS I LLUR INCORPORACIO A PROTEINES DURANT LA REGENERACIO CEFALICA DE *Dugesia ligirina*. A: entrada (O—O) (fracció TCA-soluble) i incorporació (•—•) (fracció TCA-insoluble) relatives (eix de les ordenades) durant diferents períodes de la regeneració (eix de les abscises); B: taxa d'incorporació a proteïnes (FI) referida al "pool" intracel·lular d'aminoàcids (FS) (eix ordenades) durant la regeneració (eix de les abscises).



El patró de la incorporació de  $^{14}\text{C}$ -aminoàcids a proteïnes (índex de síntesi proteica) mostra un perfil trifàssic. A un pic inicial màxim (a les 4-8 h. de regeneració), que és altament significatiu ( $P < .005$ ) en un anàlisi de la variança, el segueix un període de poca activitat (amb nivells per sota dels d'un animal intacte). Un segon pic d'activitat sintètica, menor, però de més amplitud que el primer, es situa entre 24 h. - 36 h. de regeneració. Després es perd la sincronia cel.lular (Saló i Baguñà, 1984; Martelly i col., 1981), i els pics d'incorporació que apareixen en cada experiment no arriben a concretar-se quan es fa el promig d'ells en tots els experiments, a excepció del pic del 7è dia que coincideix amb importants esdeveniments morfogènètics.

La fig.2b mostra, també, que el perfil d'entrada d'aminoàcids al "pool" intracel.lular és molt semblant al de la síntesi. La major disponibilitat d'aminoàcids marcats no és motiu d'una major incorporació d'ells a proteïna; si fos així, el perfil de la fig.2b, que relaciona la taxa d'entrada d'aminoàcids amb l'activitat sintètica, mostraria un perfil planer.

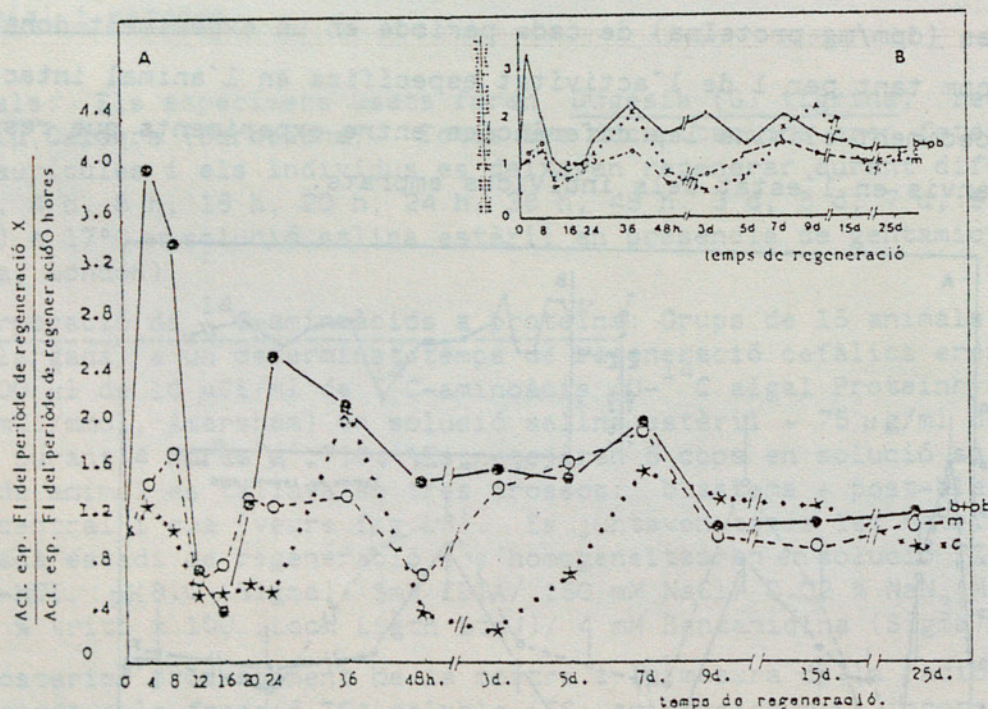


Fig. 3. SÍNTESI PROTEICA DURANT LA REGENERACIÓ DE *Dugesia tigrina*. A: DIFERENTS NIVELLS DEL COS RESPECTE A LA FERIDA. A: incorporació de  $^{14}\text{C}$ -aminoàcids al material TCA-insoluble respecte a la mateixa regió en l'animal intacte (ordenades) durant la regeneració (abscises) en blastema+post-blastema (●—●), en la regió del migi (○—○) i en la regió de la cua (★—★). B: incorporació de  $^{14}\text{C}$ -aminoàcids a la fracció TCA-soluble durant la regeneració en les mateixes regions que A.

La fig. 3 és un desglossament del patró de síntesi proteica de tot l'animal (fig. 2) per regions, prenent com a referència el lloc d'amputació; així,



blastema + post-blastema defineix la regió a prop de la ferida, a continuació vindria la regió central i després, a l'extrem més llunyà de la ferida, la regió cua. S'observa que hi ha tres pics, estadísticament significatius, en totes les regions encara que no exactament en els mateixos períodes de regeneració: hi ha un desfassament entre la síntesi en el blastema + post-blastema i la resta del cos durant les primeres hores de regeneració (pics a les 4 i 24 h. per la regió propera a la ferida i a les 8 h. i 36 h. per les altres dues). El primer pic (4 h. - 8 h.) és màxim a la regió del blastema + post-blastema i hi ha una gradació de llur alçada a mesura que la regió analitzada s'allunya de la ferida. Pel segon pic (24 h. - 36 h.), més baix, les diferències són menys entre regions. En el tercer pic aquestes no són significatives.

També és interessant observar en la regió blastema + post-blastema que l'activitat sintètica es va fent menor a mesura que avança la regeneració. Aquesta gradual disminució és menys palesa en les altres regions.

La fig. 3b. ens mostra que els perfils d'entrada d'aminoàcids dins del "pool" intracel·lular segueix les mateixes funcions que els de l'activitat sintètica: en uns primers moments de regeneració és molt més alta en la regió propera a la ferida però a mesura que avança la regeneració es va equiparant a la de les altres regions.

#### Patró del contingut proteic en animals intactes i regenerants:

L'electroforèsi bidimensional (2D-PAGE) s'emprà per comparar els continguts proteics de diferents regions d'un animal en regeneració, i determinar si hi han modificacions significants associades a esdeveniments regeneratius particulars; l'objectiu: intentar esbrinar el paper que podrien jugar les proteïnes específiques durant la regeneració cefàlica a planària.

S'han examinat un total de 800 polipèptids en totes les regions i temps de regeneració. L'anàlisi del contingut de proteïnes era repetit, de forma independent, tres cops. La taula 1 sumaritza els polipèptids que varien més significativament. Es detectàren dos tipus de canvis: quantitius, en els que hi ha un apreciable canvi en el contingut d'un polipèptid concret, i qualitius en els quals la proteïna en qüestió no pot ésser detectada en almenys un estadi o regió estudiada. La relativitat de la distinció és òbvia ja que depèn de la sensibilitat del mètode de detecció.

El 18% (130/790) dels polipèptids detectats varien en algun moment de la regeneració, encara que nosaltres senyalem 44 com a més significatius. Trobem que les diferències segons el pes molecular són a l'atzar però no així se-



gons el pI: les proteïnes bàsiques presenten més variabilitat.

La freqüència de les diferències en els primers estadis de regeneració és la més alta (veure fig.4): un 47 % del total de les diferències observades. Un altre període important és cap al 7è dia (21 %) on és de destacar l'increment de síntesi de polipèptids específics de la regió cefàlica; en concret, el 7B3 coincideix amb el polipèptid 11 detectat en un treball anterior (Collet i Baguña; 1986).

El contingut proteic de la regió del blastema + post-blastema presenta molta més variabilitat, maximitzant-se en les primeres 12 hores de regeneració, que la cua. A mesura que la regeneració avança, la variabilitat detectada baixa ostensiblement, equiparant-se en les dues regions. L'excepció és als 5-7 dies on la major part de la variabilitat d'un animal en aquest període de regeneració es concentra en la regió del blastema i post-blastema, coincidint temporalment amb el desenvolupament dels ganglis cerebrals i l'aparició dels ulls (Spielgeman i Dudley, 1973).

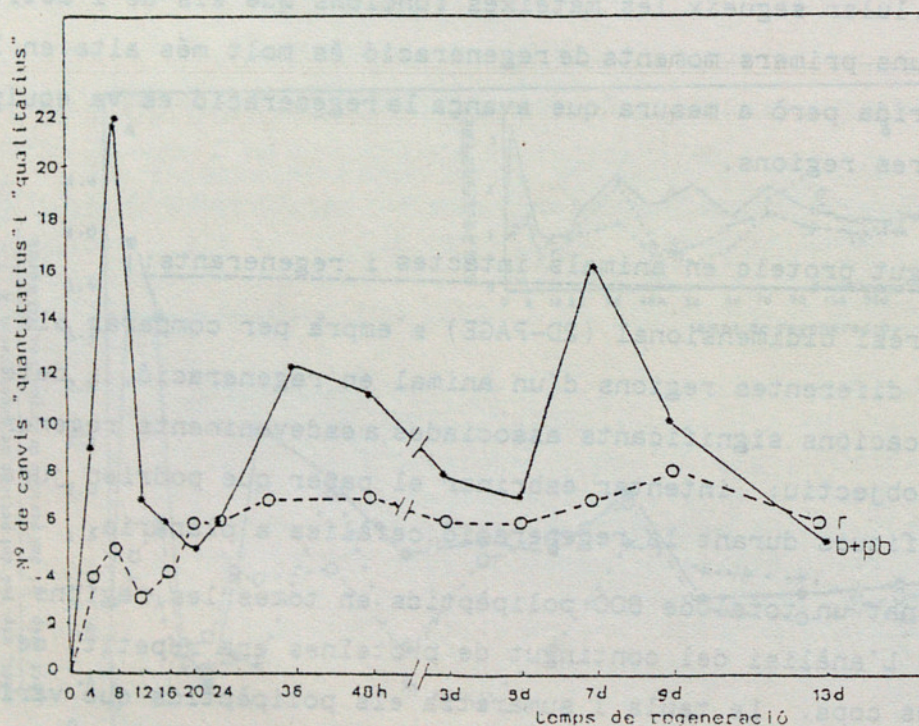


Fig.4. CANVIS EN EL CONTINGUT PROTEIC DURANT LA REGENERACIÓ DE PLANÀRIA. Cada punt representa el n.º. de canvis "qualitatius" i/o "ostensiblement quantitativs" detectats en un seleccionat moment, quan es compara amb el precedent, a la mateixa regió. b+pb: blastema i post-blastema; r: regió llunhana de la ferida.

### Discussió:

Abans de discutir qualsevol significància de les dades obtingudes, és essencial fer una breu revisió de la metodologia emprada per la mesura de la



síntesi proteica. Pendre la taxa d'incorporació d'aminoàcids marcats a proteïna com una mesura de la activitat sintètica, tot i haver estat amplísimament utilitzat a altres sistemes, té unes certes limitacions quan s'aplica a animals sencers. Entre elles incloum les alteracions en les taxes d'entrada, la lenta incorporació i equilibració dels "pools" intracel·lulars, i els canvis en l'activitat específica deguts a canvis en la taxa de biosíntesi dels precursors endògens (per exemple, aminoacil-tRNAs). S'ha demostrat que en un animal intacte l'entrada d'aminoàcids es manté relativament constant per al menys 24 hores (Collet i Baguñà, en preparació). El possible problema que s'originaria pels canvis en el "pool" dels precursors ha estat atenuat per l'ús d'una barreja de tots els aminoàcids marcats uniformament com a precursor radioactiu. Més encara, el patró obtingut emprant  $^3\text{H}$ -leucina no varia significativament del presentat en aquest article (Collet i Saló, 1983), coincidència que podem esgrimir en contra de que aquests patrons són artefactes de les fluctuacions del "pool" dels aminoàcids.

Un altre problema associat al marcatge "in vivo" per immersió de l'animal en una solució radioactiva és que molta de la radioactivitat mesurada estaria directament relacionada amb contaminació bacteriana (David, 1983). La gentamicina s'ha revelat com un potent antibiòtic, i llur administració és imprescindible per a una correcta interpretació de les dades.

El patró temporal de síntesi de proteïnes durant la regeneració cefàlica a Dugesia tigrina és basicament similar al trobat a Polycelis tenuis (Martelly i LeMoigne, 81): un primer pic a les 4-8 hores, un mínim relatiu seguit d'un segon pic, més llarg, cap a les 30-40 hores, i, a partir d'ací, uns nivells de síntesi més alts que els basals sense arribar però a definir cap pic fora d'un entre 5 i 7 dies de regeneració. El patró obtingut es correspon temporalment als obtinguts anteriorment per a la síntesi de DNA (Martelly i col., 1981; Collet i Saló, 1984), RNA (Martelly i LeMoigne, 1980) i índex mitòtic (Saló i Baguñà, 1984).

El patró regional de síntesi proteica durant la regeneració ens mostra que la regió aprop de la ferida (blastema+post-blastema) presenta una activitat traduccional (i transcripcional; Collet, treball en curs) notable. Al pic inicial el segueixen dos més (24-36 h i 5-7 d.). A les altres regions també es dona aquest patró en línies generals, però amb dues matitzacions: tenen uns nivells sintètics més







baixos i, en el dos primers pics, hi ha un desfase temporal respecte al blastema+post-blastema. Aquesta darrera observació és difícil de casar amb la hipòtesi de l'existència d'un mecanisme de comunicació cel·lular, humoral o neurohumoral, molt ràpid i sensible a estímuls externs com l'alimentació i l'amputació (Baguñà, 1974; Saló i Baguñà, 1984).

L'entrada d'aminoàcids del medi al llarg de la regeneració mostra un patró molt similar al de la incorporació d'aminoàcids a proteïnes. Les dades suggereixen que no hi ha cap mena de relació causal entre els dos processos ja que la síntesi proteïca no guarda cap linialitat amb el tamany del "pool" d'aminoacil-tRNA intracel·lular.

Durant la regeneració l'entrada d'aminoàcids és preferencialment a través de la ferida (sobretot al començament de la regeneració, quan la membrana basal no està formada. Aquesta conclusió està d'acord amb que, a un animal intacte, l'entrada és transepidermal, i no per la faringe (Calow i Read, 1981; Collet i Baguñà, 1986).

Encara que hem d'acceptar que a partir dels patrons electroforètics del contingut proteic no es pot inferir, sense preveure un marge d'error gran, les taxes de síntesi proteïca dels diferents polipèptids, ens aporten dades que recolzen les anteriors. A les primeres hores de regeneració apareix un important nombre de canvis, principalment quantitativus, quasi exclusius de la regió aprop de la ferida. En regions llunyanes, la resposta al traumatisme és més atenuada i la taxa d'aparició de canvis en les espècies proteïques es manté relativament constant amb dos punts notables: les primeres 8 hores i entre 16 i 24 hores de regeneració. Per contra la zona del blastema+post-blastema té un comportament més cíclic: després del mínim que segueix al pic inicial, hi ha un petit augment (entre les 24 i 48 hores) per seguir a nivells més baixos que, posteriorment, es veuen perturbats per un increment molt representatiu de les estructures cefàliques (al voltant dels 5-7 dies de post-amputació).

A la llum de totes les dades obtingudes i amb el concurs de les existents, es pot completar la seqüència bioquímica-cel·lular de la regeneració cefàlica a la planària D. tigrina.

L'animal respon al traumatisme de l'amputació amb un tancament molt ràpid de la ferida per estirament lateral de les cèl·lules epidèrmiques fins formar una capa fina i contínua de cèl·lules per sobre el



parènquima danyat. Apareixen espais extracel·lulars importants com a conseqüència de la lisi de les cèl·lules danyades i/o de l'eliminació selectiva de determinats tipus cel·lulars (Bowen i col., 1982). Aquestes dades de caire morfològic estan recolçades, dèu d'un punt de vista bioquímico, per un detectable alta activitat de les fosfatases àcides (Bowen i col., 1982). El fort increment de síntesi protèica, en general, i de determinades proteïnes, en concret, ha d'estar relacionat amb els processos de cicatrització i mort cel·lular. Per altre costat, Saló i Baguñà (1984) trobaren un marcat increment del nombre de mitosi deguda a una masiva entrada de cèl·lules en  $G_2$  i S-terminal a profase (no es detecta síntesi de DNA en aquestes primeres hores de regeneració). Tots aquests esdeveniments estarien adscrits a l'estadi de cicatrització o estadi I (d'acord amb la terminologia de Spielgeman i Dudley, 1973).

Un cop l'animal ha reaccionat enfront a l'agressió, els teixits es re-organitzen i el blastema es forma i creix. A nivell cel·lular, l'increment de neoblastes en el blastema i en les zones properes és brusc. L'origen d'aquests neoblastes no està del tot clar. Saló i Baguñà (1984) demostraren que el nombre de neoblastes existents en les regions properes a la ferida ( $\sim 300 \mu m$ ) és suficient per explicar, per divisió i migració local, la formació i creixement del blastema. A nivell bioquímico entre 10-14 hores de regeneració hi ha un considerable augment de la síntesi de DNA (entrada sincrònica de les cèl·lules en  $G_1$ , presumiblement neoblastes, a S) que condiona el posterior increment de la síntesi de RNA (entre 14 i 18 hores) i llur traducció a proteïnes (cap a les 20-24 hores) (Martelly i col., 1981). El conseqüent pic mitòtic es fa palés entre 36 i 48 hores post-amputació (Saló i Baguñà, 1984). L'increment de síntesi protèica que s'observa en aquesta fase està relacionat amb la proliferació de les cèl·lules que formaran el blastema.

A partir del 4art. dia comença la diferenciació del blastema. Spielgeman i Dudley (1973) trobaren en blastemes de 100 hores que gran part de les cèl·lules presentaven inclusions i orgànuls típics de cèl·lules diferenciades. La síntesi protèica en la regió blastema i post-blastema, tot i essent més alta que la basal, tendeix a igualar-se amb la que presenten les zones llunyanes de la ferida. Les diferents espècies trobades a partir del 4art. dia (i sobretot en el 7é) al blastema+post-blastema i a la resta del cos estarien, probablement, relacionades amb processos diferents; amb la citodiferenciació, i en certa mesura amb la



proliferació, en la regió del blastema i post-blastema; i amb la reorganització homeostàtica (migració, proliferació,...) a la resta.

#### Agraïments:

Aquest treball ha estat portat finançat per un ajut de la CACYT (PB85-0094) a J.B.

#### Bibliografia:

- BAGUÑA, J. (1974). "Dramatic response in planarians after feeding, and a hypothesis for the control mechanism". J. exp. Zool. 190, 117-22.
- BOWEN, I.D.; den HOLLANDER, J.E. i LEWIS, G.H.J. (1982). "Cell Death and Acid Phosphatase Activity in the Regenerating Planarian Polycelis tenuis Iijima". Differentiation, 21, 160-7.
- BEDARD, P.-A. i BRANDHORST, B.P. (1983). "Patterns of Protein synthesis and metabolism during Sea Urchin Embryogenesis". Dev. Biol., 96, 74-83.
- BRADFORD, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Anal. Biochem., 72, 248-54.
- BRAVO, R. (1984). "Two-Dimensional Gel Electrophoresis: A Guide for the Beginner" en Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins: Methods and Applications. Celis, J. i Bravo, R., eds. Academic Press, Inc.
- CALOW, P. i READ, D.A. (1981). "Transepidermal uptake of amino acid leucine by freshwater triclads". Comp. Biochem. Physiol., 69A, 443-8.
- COLLET, J. i SALO, E. (1983). "Polyamine changes during planarian regeneration: regional content, and effects of polyamine inhibitors on polyamine biosynthesis and blastema growth and differentiation" Arch. Anat. Microsc. Morph. exper., 72, 214-5.
- COLLET, J.; AULADELL, MC. i BAGUÑA, J. (1984). "Specific Protein markers of neoblasts and differentiated cells in the planarian Dugesia (G) tigrina". J. Embryol. exp. Morph., 80, 280.
- COLLET, J. i BAGUÑA, J. (1986). "Anàlisi quantitativa i qualitativa del contingut proteic al llarg de l'eix antero-posterior de la planària Dugesia (G) tigrina" Biol. Develop., 4, 203-213.
- DAVID, Ch.N. (1983). "Incorporating (<sup>3</sup>H)-Thymidine into Hydra by Microinjection" en Hydra: Research and Methods, Lenhoff, H.M., ed. Plenum Press.
- LESH-LAURIE, G.E.; BROOKS, D.C. i HOOD, R.L. (1986). "Protein Patterns and Synthetic Profiles during Distal Regeneration in Hydra oligactis". Develop. Growth and Differentiation, 28 (1), 53-65.
- LOVELL-BADGE, H.; EVANS MARTIN, J. i BELLAIRS, R. (1985). "Protein synthetic patterns of tissues in the early chick-embryo". J. Embryol. exp. Morph., 85, 65-80.
- MARTELLY, I. i LEMOIGNE, A. (1980). "Ribonucleic acid metabolism during planarian regeneration". Reprod. Nutr. Dev., 20, 1527-37.
- MARTELLY I. i LEMOIGNE, A. (1981). "Planarian regeneration: quantitative differences in RNA and protein synthesis related to age". Int. J. Invertebr. Reprod., 4, 123-5.



- MARTELLY, I; REY, C. i LEMOIGNE, A. (1981) "Planarian regeneration : DNA metabolism i adults". Int. J. Invertebr. Reprod., 4, 107-21.
- O'FARRELL, P.H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins". J. Biol. Chem., 250, 4007-21.
- PEDERSEN, K.J. (1972). "Studies on regeneration blastemas of the planarian Dugesia tigrina with special reference to differentiation of muscle-connective tissue filament system". Wilhelm Roux's Arch. EntwMech. Org., 169, 134-69.
- SALO E. i BAGUÑA, J. (1984). " Regeneration and pattern formation in planarians: I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in Dugesia (G) tigrina, and a new proposal for blastema formation". J. Embryol. exp. Morph., 83, 63-80.
- SALO E. i BAGUÑA, J. (1986). "Stimulation of Cellular Proliferation and Differentiation in the intact and Regenerating Planarian Dugesia (G) tigrina by the Neuropeptide Substance P". J. exp. Zool., 237, 129-35.
- SLACK, J.M.W. (1982). " Protein synthesis during limb regeneration in the axolotl". J. Embryol. exp. Morph., 70, 241-60.
- SPIEGELMAN, M. i DUDLEY, D.L. (1973). "Morphological Stages of Regeneration in the Planaria Dugesia tigrina: A Ligth and Electron Microscopy study". J. Morph. 139, 155-84.
- TRACY, R.P. i YOUNG, D.S. (1984). "Clinical Applications of Two-Dimensional Gel Electrophoresis" en Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins: Methods and Applications. pp. 193-240. Celis, J. i Bravo, R., eds. Academic Press.
- VAN BLERKOM, J.; JANZEN, R. i RUNNER, M.N. (1982). "The patterns of Protein synthesis during foetal and neonatal organ development in the mouse are remarkably similars". J. Embryol. exp. Morph., 72, 97-116.