

Artículo original

Caracterización de la regeneración del brazo del equinodermo *Ophiothrix lineata* (Lyman, 1860)

Yomalt Estrella Alarcón-Reyes,* Eduardo Zarza-Meza,* Pablo San Martín Del Angel,* Rosa Idalia Hernández-Herrera,* Rodrigo Cuervo*

* Laboratorio de Evolución y Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana.

Dirección para correspondencia:
 Dr. Rodrigo Cuervo
 Laboratorio de Evolución y Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Carretera Tuxpan-Tampico Km 7.5, 92860, Tuxpan, Ver. México.
 E-mail: rodcuervo@uv.mx

Recibido: 5 de agosto de 2013.
 Aceptado: 29 de agosto de 2013.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
<http://www.medicographic.com/rid>

Resumen

La capacidad de regeneración corporal es frecuente en todos los protostomados pero se restringe en los deuterostomados. El filum *Echinodermata* comparte un ancestro común con el filum *Chordata*, por ello son importantes para entender el origen de la regeneración en el superfilum de los deuterostomados. Los equinodermos tienen una gran capacidad para regenerar estructuras y tejidos derivados de las tres capas germinales. En el presente trabajo caracterizamos el proceso de regeneración del brazo de la ofiura *Ophiothrix lineata*. El brazo fue amputado desde la primera vértebra en el área de inserción con el disco. La intención de realizar la amputación completa fue inducir la recapitulación de todo el desarrollo del brazo. Nos enfocamos en el análisis de las etapas iniciales de la regeneración hasta las etapas de diferenciación y funcionalidad mecánica. La medición del crecimiento del nuevo brazo fue realizada a intervalos de cinco días durante un mes y se caracterizaron histológicamente los primeros ocho días posteriores a la amputación. Los resultados demostraron un crecimiento promedio de 0.23 mm por día. La regeneración tiene cuatro fases principales: reepitelización del disco, formación de un blastema regenerativo, elongación del blastema con segmentación y diferenciación celular con funcionalidad mecánica del brazo. Destaca en esta especie la rápida formación del blastema y los primeros indicios de morfogénesis, así como la presencia del nervio radial a partir del sexto día de la regeneración.

Abstract

*Body regeneration is a common ability in most protostomate species, opposite to the lack of such ability in deuterostomates. Regeneration in *Echinodermata* species is important to understand regeneration in some exceptional chordate species. *Echinodermata* species have a great ability to regenerate anatomical structures from their three germinal layers. In present study, an arm was cut at its insertion in disc, at the first vertebra in *Ophiothrix lineata*, which is a deuterostome echinoderm in search for its regeneration ability by recording periodical stages in such a potential ability, since the very starting of a bud until the whole functional differentiation. Records were taken every five days during a one-month span. Histological examinations were performed through the first eight days after amputation. Results demonstrated a growth of 0.23 mm per day. Regeneration process was observed in four stages as follows: first, re-epithelialization of hurt disc, second, the formation of a regenerative blastema, third, lengthening and segmentation of blastema, and fourth, cellular differentiation and mechanical function of regenerated arm. It is remarkable the rapid formation of blastema as well as the presence of radial nerve at sixth day after amputation.*

Palabras clave: Ofiura, regeneración, blastema, *Ophiothrix lineata*.

Key words: Brittlestar, regeneration, blastema, *Ophiothrix lineata*.

Introducción

La regeneración es un fenómeno muy común en los organismos simples que se va restringiendo en los organismos con mayor complejidad. Es el remplazo de partes del cuerpo o de órganos perdidos después de mutilaciones autoinducidas o causadas por algún trauma; en varios filums incluso puede ser parte de la reproducción asexual.¹ Puede ocurrir en etapas embrionarias, larvarias y en organismos adultos e implica procesos de división celular, diferenciación y morfogénesis, por lo que recapitula en buena medida los procesos embrionarios y evolutivos.² La regeneración está condicionada por diversos factores como la etapa de desarrollo, la edad y las condiciones fisiológicas y ambientales en las que se lleva a cabo. Uno de los principales eventos después de la pérdida de una estructura es estimular la producción de células adicionales capaces de reconstruir la parte amputada. Las nuevas células generadas en el sitio de la lesión forman una estructura denominada blastema de regeneración compuesta por células indiferenciadas; la formación del blastema da inicio al proceso de morfogénesis, diferenciación y crecimiento.

Por su relación filogenética cercana a los vertebrados y sus capacidades regenerativas, los equinodermos son un atractivo modelo para determinar cuáles son los procesos celulares y moleculares que se requieren para lograr una regeneración de manera exitosa y al mismo tiempo entender el origen evolutivo de la regeneración en los deuterostomados.³ Se sabe que cerca del 70% de los genes del erizo de mar son compartidos con el ser humano.⁴ La clase *Ophiuroidea* es la más abundante con aproximadamente 2,064 especies.⁵ Las ofiuras, como los demás equinodermos, son organismos exclusivamente marinos cuyas estructuras y órganos se han simplificado drásticamente. Tienen un esqueleto de carbonato de calcio (calcita) y un sistema vascular acuífero y están constituidos por un disco central pentarradial en cuya parte inferior está la boca que conecta al sistema digestivo. Generalmente tienen cinco brazos segmentados que usan para la locomoción y captura de alimentos y llevan a cabo el proceso de regeneración de sus brazos en un periodo muy corto y de manera muy efectiva. Por ello representan un modelo animal que ha sido utilizado para el estudio de este fenómeno.⁶

Por lo regular, la regeneración en los ofiuroideos se da como consecuencia de la autotomía. Este es un fenómeno autoinducido con el que logran desprenderse de una parte del brazo y que puede ocurrir gracias a que poseen un tejido conectivo variable, el cual puede

ser rígido o flexible y que es controlado a voluntad por el organismo. Cuando esto ocurre, se produce una rápida despolimerización de proteínas en el punto de fractura acompañada de contracciones musculares que conducen al desprendimiento del brazo.⁷ La regeneración es un fenómeno esencial en el ciclo de vida de los ofiuroideos relacionada con una amplia gama de aspectos biológicos y ecológicos: poder sacrificar uno o varios brazos aumenta el potencial de supervivencia y el éxito evolutivo.⁸ Es un hecho que la regeneración no es un fenómeno aislado en el ciclo de vida de los ofiuroideos; está presente de manera significativa en las poblaciones estudiadas en su hábitat natural donde existe una alta tasa de organismos con signos de regeneración a causa de diversos factores como la depredación y el oleaje.⁹

En el presente trabajo se analizó el tiempo de regeneración del brazo completo de la especie *Ophiothrix lineata* hasta etapas en que es funcional y está completamente diferenciado. Los estudios histológicos del proceso mostraron una rápida formación de blastema regenerativo y una rápida morfogénesis. La diferenciación comenzó alrededor del día ocho cuando es evidente la formación de células musculares y la presencia de un cordón nervioso, lo que permite que el brazo adquiera movilidad desde esa etapa.

Material y métodos

Área de colecta: las ofiuras se recolectaron en el arrecife ubicado dentro del sistema arrecifal Tuxpan (SAT) a 14 kilómetros de la desembocadura del río Tuxpan en el Golfo de México. Los organismos seleccionados ($n = 30$) se colectaron en mayo de 2012 y fueron encontrados a una profundidad de entre 1 y 2 metros; posteriormente fueron transportados al Laboratorio de Evolución y Embriología de la Universidad Veracruzana. Los acuarios donde se mantuvieron se acondicionaron previamente con agua, sedimento y roca viva obtenidos del mismo arrecife y un espumador. Los parámetros del agua fueron monitoreados con regularidad con un medidor multiparamétrico (Hanna HI9828) y un densímetro. Se mantuvo la temperatura del agua a 26 °C con un equipo enfriador de agua automatizado y se realizaron cambios regulares con agua del arrecife para mantener en buenas condiciones el agua de los acuarios. Previo a la experimentación, las ofiuras se mantuvieron durante una semana en estado de aclimatación y fueron alimentadas con nauplios de artemias tres veces por semana.

Para la medición del crecimiento del brazo post-autotomía se seleccionaron organismos que tenían

un diámetro de disco de 5 a 7 milímetros. A todas las ofiuras se les desprendió uno de los cinco brazos elegidos al azar con la ayuda de una pinza de disección bajo un microscopio estereoscópico. Se hizo presión en la base del brazo para que la ofiura lo liberara por sí misma desde la primera vértebra y los restos fueron quitados con pinzas de disección, logrando así la extracción completa del brazo. Para llevar a cabo las mediciones y el análisis de la regeneración se utilizaron 24 ofiuras; los brazos en regeneración fueron fotografiados y medidos los días 5, 11, 16, 21, 26 y 31 post-autotomía. La medición se realizó con ayuda del Software Motic Images Plus 2.0 ML que permite mediciones muy precisas. Para correlacionar el tamaño del brazo regenerado, con el tiempo se utilizó la correlación lineal de Pearson como análisis estadístico con la ayuda del Programa Statistica 7.

Para la histología se utilizaron cinco ofiuras que fueron fijadas los días 1, 2, 4, 6 y 8 posterior a la inducción de la autotomía de uno de los brazos. La fijación de cada una de las ofiuras se realizó con para-formaldehído al 4% en amortiguador fosfato-salino durante 24 horas. Posteriormente se descalcificaron con quelante de calcio EDTA al 10% durante ocho días. Una vez descalcificadas, las muestras fueron impregnadas en sacarosa al 15% y después al 30% durante 10 minutos c/u. A continuación se incluyeron en gel para cortes en congelación (Tissue-Tek OCT compound) durante toda la noche para que se impregnaran los tejidos. Los cortes histológicos se realizaron en un criostato (Microm HM 520) a una temperatura de -25 °C. Se realizaron cortes de 10 µm de grosor que fueron puestos en portaobjetos previamente recubiertos de poli-L-lisina. La orientación de los cortes se realizó de manera transversal al disco y fueron recolectados aquellos cortes que pasaban por la parte media a la altura del brazo desprendido. Posteriormente se procesaron con la tinción tricrómica de Masson.

Resultados

La regeneración del brazo fue medida por un periodo de 31 días tomándose como día 0 cuando se da el desprendimiento por autotomía. En este lapso, la regeneración ocurrió de manera rápida y constante. Los datos de las mediciones los ajustamos a un modelo lineal para describir la relación entre la longitud regenerada y el tiempo transcurrido (*Figura 1*). Los promedios de crecimiento mostraron que el brazo en regeneración aumentó 1.15 milímetros de longitud cada cinco días. La ecuación fue continua, lo que permitió realizar una predicción: la regeneración y el

crecimiento completo del brazo que llegó a alcanzar hasta su tamaño original de 3 a 4 cm como ocurriría entre los días 131 a 176. El coeficiente de correlación ($R = 0.8928$) indica una fuerte correlación positiva entre el tiempo y la longitud regenerada del brazo o una covarianza positiva. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.7970$) indica que el tiempo, considerado como variable independiente, explica el 79% de la variabilidad de la longitud regenerada.

Morfología del proceso de regeneración. Día 0, el brazo fue retirado desde la primera vértebra y deja una cavidad grande en el disco, el cual adquiere una forma cóncava en esa zona (*Figuras 2A y 2B*). A pesar del extenso daño es sorprendente la capacidad de recuperación y viabilidad de estos organismos. En el día 2 la herida ya se había epitelizado y es más notoria la concavidad y se observa una pequeña aglomeración de tejido conectivo y epitelial, lo que pudiera ser un pseudoblastema (*Figura 2B*). Día 3, es evidente el nuevo epitelio que cubre toda la herida y es clara la presencia de un blastema más pronunciado con respecto al día anterior (*Figura 2C y D*). En el día 4, el blastema crece de manera longitudinal y se engrosa en la base adoptando una forma cónica. Comienza la diferenciación morfológica y se desarrollan los primordios de un par de espinas en el área basal (*Figura 2E*). Para el día 5, el brazo ha adquirido mayor longitud y se ensancha en el área basal; además son visibles tres primordios de espinas, lo que prefigura la segmentación de las vértebras del brazo (*Figura 2F*). El crecimiento continúa y aumentan secuencialmente el número de segmentos y hacia el día 11 el nuevo

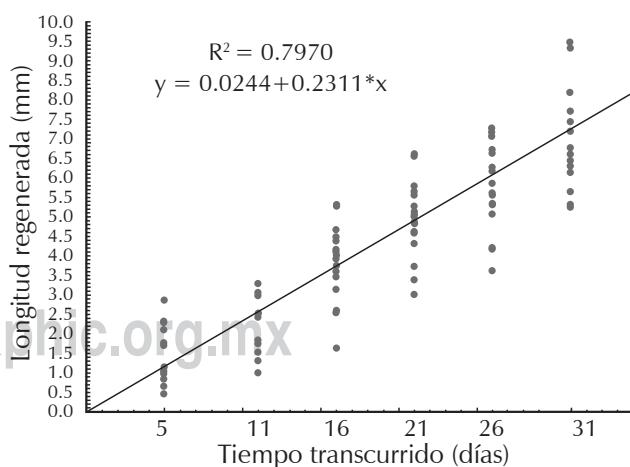


Figura 1. Promedio estándar de regeneración del brazo. Relación entre el tiempo (en días) y la longitud regenerada del brazo (en mm).

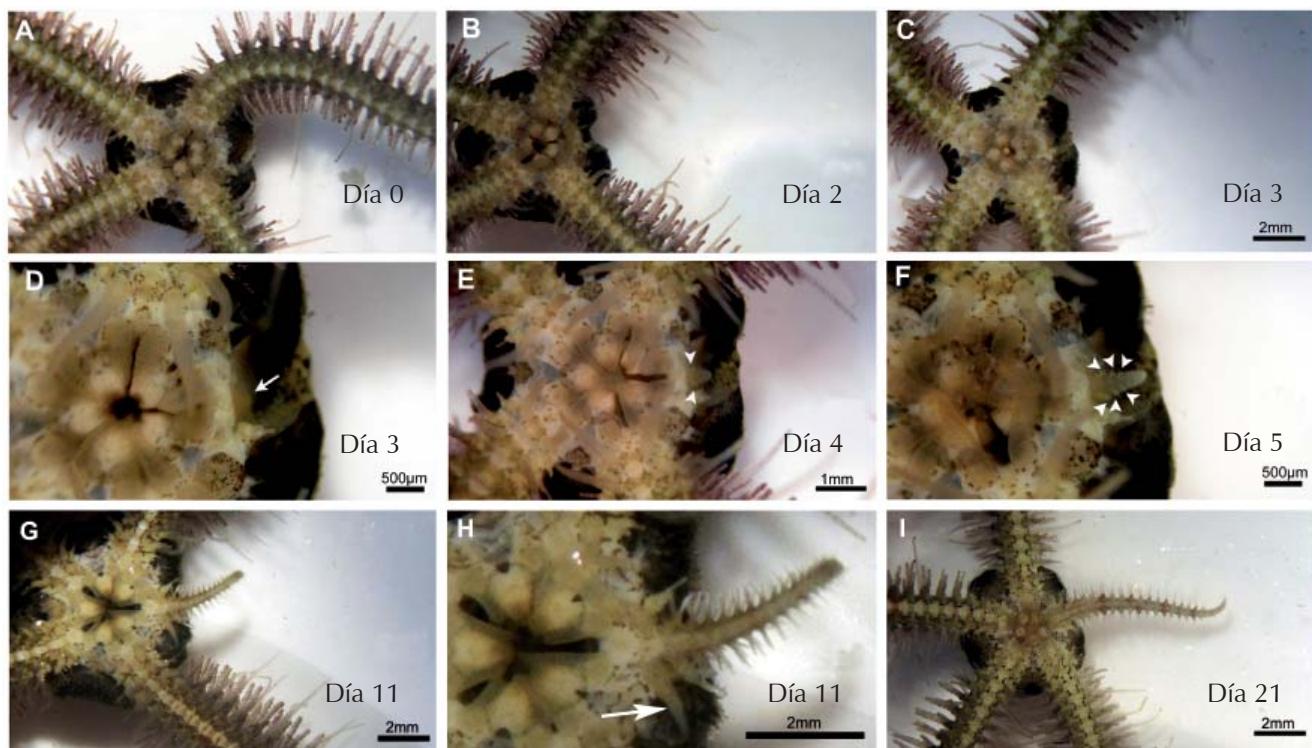


Figura 2. Vista oral del mismo organismo a diferentes tiempos postamputación del brazo. **A** Aspecto de la ofiura después de la amputación completa del brazo. **B** Al día 2 se observa una hendidura en el disco en el sitio de la amputación. **C** Despues del día 3 la hendidura desaparece y **D** una imagen a mayor aumento muestra claramente un blastema en formación (flecha). **E** Al día 4 el blastema adquiere una forma piramidal y empieza la diferenciación morfológica de dos espinas en la base (cabezas de flecha). **F** En el día 5 es notoria la elongación, segmentación y diferenciación del blastema que tiene tres espinas en la zona proximal a la base (cabezas de flecha). **G** Despues de 11 días se ha formado un pequeño brazo **H** con podios y espinas bien diferenciados (flecha). Al día 21, el brazo es completamente funcional y sólo resta que alcance la longitud original.

brazo se encuentra diferenciado por completo con placas, espinas y podios bien definidos; comienza a pigmentarse y ha adquirido plena movilidad (*Figura 2G y H*). Para el día 21 continúa el crecimiento longitudinal y engrosamiento del área basal del brazo, el cual ya tiene total funcionalidad; de hecho, registramos que la ofiura lo utiliza para atrapar nauplios de artemia que desplaza con los podios hacia la boca (*Figura 2I*). El día 31 fue el último en el que se analizó la regeneración del brazo pues es claro que la morfogénesis ya se ha completado y ha adquirido la total funcionalidad y sólo resta la elongación de los elementos ya diferenciados.

El análisis de los cortes histológicos mostró una notoria y rápida reparación del área afectada mediante el cerrado de las cavidades celómicas y la reepitelización de la superficie expuesta pocas horas después de la autotomía. Las características observadas durante este periodo se describen a continuación: día 1, la

superficie donde estaba el brazo toma una forma cóncava y está cubierta por una capa celular delgada. La reepitelización todavía no es completa y la capa subyacente cicatricial está constituida por células migratorias dispersas entre tejido conectivo pero sin conformar un epitelio estratificado bien definido (*Figura 3A*). En el día 2 de regeneración, la superficie del disco se encuentra recubierta por una capa gruesa cicatricial. En este día se observa la acumulación de una masa de células indiferenciadas distribuidas entre una malla densa de fibras de tejido conectivo; estas células indiferenciadas representan la primera formación del posible blastema regenerativo o pseudoblastema (*Figura 3B*). En el día 4 de regeneración se observa claramente el crecimiento del blastema regenerativo que adquiere una forma segmentada que prefigura las futuras vértebras. Hay una estructura histológica más definida y las células indiferenciadas son homogéneas en forma,

tamaño y densidad (*Figura 3C*). Para el día 6 el brazo ha crecido notoriamente y se observa la presencia del nervio radial, característico por su aspecto hialino, el cual se proyecta longitudinalmente a lo largo del lado oral del brazo (*Figura 3D*). Las células que conforman la mayor parte del brazo continúan indiferenciadas y

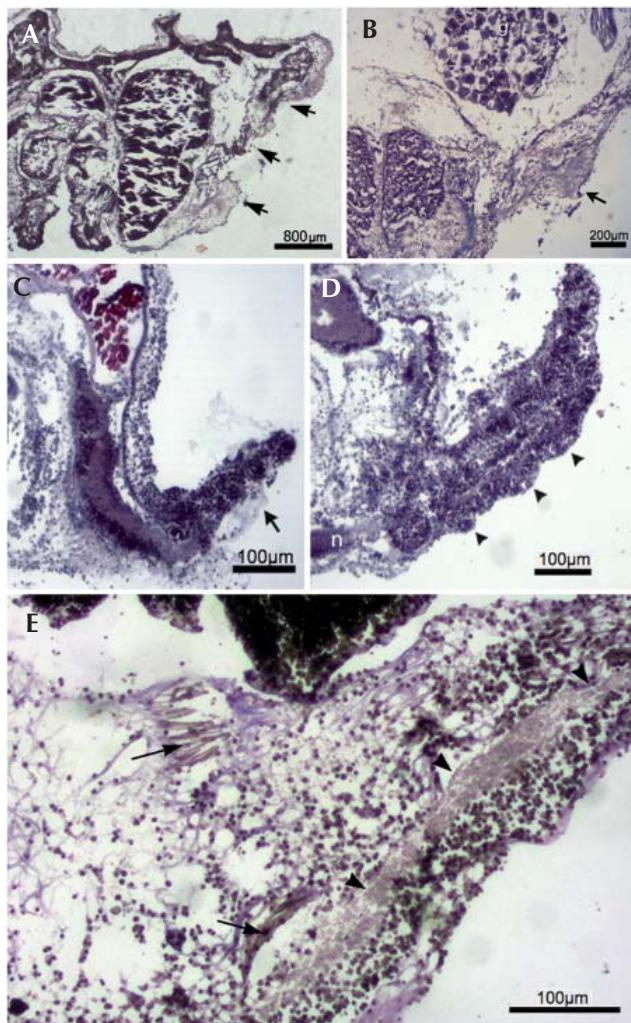


Figura 3. Histología de las primeras etapas de regeneración del brazo. **A** Despues de un día de la amputación la abertura en el disco es cubierta con tejido conectivo y células epiteliales (flechas). **B** Al día 2 el tejido cicatricial conectivo se engrosa con más células epiteliales (flecha). **C** En el día 4 se observa claramente un blastema en crecimiento (flecha). **D** Despues de los seis días, el blastema se elonga y segmenta (cabezas de flecha) prefigurando los cuerpos vertebrales articulados. **E** Hacia el día 8 postamputación, un pequeño brazo se ha formado con algunas células musculares diferenciadas (flechas) y se nota claramente el nervio radial (cabezas de flecha).

se observan algunos primordios de podios hacia el lado oral del brazo en donde podemos observar un epitelio simple bien definido. Hacia el día 8 se observa el crecimiento y engrosamiento del brazo, el cordón nervioso es de mayor grosor y más definido y en las zonas intervertebrales aparecen células musculares o miocitos que interconectan las nuevas vértebras del brazo (*Figura 3E*). Los miocitos son las primeras células claramente diferenciadas pero en el resto del brazo las células siguen indiferenciadas aunque están más dispersas, lo cual es indicativo de una mayor producción de matriz extracelular y movimientos celulares.

Discusión

La rapidez con que crecen y diferencian los brazos de los ofiuroides puede variar significativamente entre las diferentes especies; sin embargo, se sabe que la regeneración histológica es muy parecida entre ellas y es comparable aún con la regeneración de los brazos de los crinoideos.^{10,11} En el presente trabajo, los brazos de *Ophiothrix lineata* fueron medidos a intervalos de cinco días por considerarse éste un lapso de tiempo adecuado para cuantificar la longitud regenerada sin causar un alto estrés, lo que pudiera resultar en la pérdida de los otros brazos y en la consecuente alteración en la capacidad para alimentarse y desplazarse. Por lo general, las ofiuras no presentan dimorfismo sexual y en *Ophiothrix lineata* el tamaño de las hembras y los machos es similar. El brazo experimental fue elegido al azar, ya que se sabe que todos poseen las mismas capacidades de regeneración si se cortan a la misma distancia con respecto al disco central.¹² Por ello consideramos que la regeneración y el crecimiento del brazo no estuvieron influenciados significativamente por estas dos variables: el sexo y el brazo elegido.

Las mediciones del brazo experimental las realizamos hasta el día 31 postautotomía porque en ese momento claramente ha concluido la diferenciación del brazo y es completamente funcional. Con los resultados obtenidos podemos calcular que el tiempo en el que se completaría el crecimiento del brazo hasta su tamaño original de 3 a 4 cm a 26 °C ocurriría entre los días 131 a 176. Nuestros resultados mostraron que el crecimiento promedio de los brazos en esta especie es de 1.61 mm por semana, el cual es casi la mitad del crecimiento reportado para *Amphiura filiformis*, que es de 3.3 mm por semana.¹² El grupo de Dupont demostró con una serie de experimentos algunos fenómenos muy interesantes: por ejemplo, que la regeneración es más rápida cuanto más cerca del disco se corta el brazo, aunque la diferenciación y

por lo tanto la funcionalidad del brazo es más lenta. Se ha reportado que la *Ophioderma longicaudatum* tiene un rango de regeneración de 0.17 mm por semana, velocidad muy inferior a la que observamos en el presente trabajo.¹³ Estos comparativos nos demuestran variaciones muy acentuadas en la velocidad de regeneración; se sabe que estas variaciones están asociadas a la capacidad intrínseca de cada especie para autotomizar. Las especies que autotomizan con dificultad y que requieren estímulos más fuertes para hacerlo tienden a regenerar más lentamente y viceversa. Por ejemplo, la especie que utilizamos tiende a autotomizar con facilidad, al igual que la *Macrophiothrix longipeda*, la cual regenera poco más de 5 mm por semana en promedio.¹⁴ Otro factor relacionado con la regeneración y crecimiento de los brazos es la temperatura. Los organismos que llevan a cabo este proceso en ambientes cálidos regeneran con mayor rapidez que los que lo hacen en ambientes fríos; por ejemplo, las especies que comienzan el proceso de regeneración en los meses de verano a otoño (10-11 °C) llevan a cabo la regeneración y crecimiento de manera más rápida, mientras que las que lo hacen en invierno (7.6 °C) tienen una tasa de crecimiento 75% más lenta. Se sabe por trabajos realizados que en la Antártida hay temperaturas alrededor de 0 °C y que la regeneración es muy lenta por tratarse de organismo ectotérmicos. A una temperatura de -0.5 ± 0.4 °C la *Ophionotus victoriae* regenera 0.22-0.68 mm/semana¹⁵, y la *Ophiura crassa* 0.16 mm/semana.¹⁶

Las etapas de la regeneración en la *Ophiothrix lineata* ocurrieron de manera muy similar a las reportadas en la *Ophioderma longicaudum* y la *Amphiura filiformis*, con una fase de cicatrización y formación del blastema regenerativo, crecimiento del blastema y finalmente diferenciación y elongación del brazo. Las características de este proceso de regeneración permiten decir que es de tipo epimórfico.¹ Aunque las etapas de regeneración, formación de blastema y diferenciación son iguales, los tiempos en que ocurren son muy distintos; por ejemplo: en la *Amphiura filiformis* la aparición del blastema regenerativo ocurrió hacia el día cuatro, muy semejante a lo que observamos nosotros;¹² sin embargo, en la *Ophioderma longicaudum* ocurrió hasta la segunda semana.¹³ La diferenciación del blastema en la *Amphiura filiformis* ocurrió hacia el día ocho y en la *Ophioderma longicaudum* hasta después de las cinco semanas,¹³ mientras que nosotros observamos los primeros indicios de morfogénesis en *Ophiothrix lineata* desde el día cuatro de regeneración. El análisis histológico muestra que muy pronto se estructura el nervio radial a lo largo del nuevo brazo. Este

cordón nervioso se forma por proyecciones provenientes del anillo nervioso del disco; se considera que es una fuente de factores de crecimiento y que funciona como un inductor y regulador del proceso regenerativo.⁸ Estudios realizados con otros modelos de regeneración, como los anfibios urodelos, han demostrado la importancia de las terminaciones nerviosas para que ocurra la regeneración de manera correcta y se sabe que algunos factores de crecimiento tipo FGF (factor de crecimiento fibroblástico) son producidos por los nervios y favorecen la división celular necesaria para que el proceso ocurra.

Finalmente, cabe mencionar que esta especie fue colectada en una zona donde hay una extensa actividad petrolera y un acentuado tráfico marítimo. Uno de los aspectos útiles de la caracterización que realizamos es usar a la *Ophiothrix lineata* como organismo bioindicador,¹⁷ pues se sabe que la regeneración se puede alterar o inhibir por compuestos tóxicos y derivados del petróleo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto PROMEP-PUV-PTC 438 del Programa «Apoyo a la incorporación de nuevos profesores de tiempo completo». También agradecemos a la SAGARPA por el permiso de pesca de fomento No. DGOPA.04516.030512.1224 para la colecta de las ofiuras.

Referencias

1. Sánchez-Alvarado A. Regeneration in the metazoans: why does it happen? *Bioessays*. 2000; 22: 578-590.
2. Cuervo R, Hernández-Martínez R, Chimal-Monroy J, Merchant-Larios H, Covarrubias L. Full regeneration of the tribasal *Polypterus fin.* *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: 3838-3843.
3. García-Arrarás JE, Domaltov IY. Echinoderms: potential model systems for studies on muscle regeneration. *Curr Pharm Des*. 2010; 16: 942-955.
4. Sodergren E et al. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*. 2006; 314: 941-952.
5. Stöhr S, O'Hara TD, Thuy B. Global Diversity of Brittle Stars (*Echinodermata: Ophiuroidea*). *PLoS One*. 2012; 7: e31940.
6. Candia-Carnevali MD, Thorndyke MC, Matranga V. Regenerating echinoderms: a promise to understand stem cells potential. In: Rinkevich B, Matranga V. *Stem cells in Marine Organisms*. 2009: pp. 165-184.
7. Candia-Carnevali MD, Bonasoro F. Introduction to the biology of regeneration in echinoderms. *Microsc Res Tech*. 2001; 55: 365-368.

8. Candia-Carnevali MD. Regeneration in echinoderms: repair, regrowth, cloning. *Invertebrate Survival Journal*. 2006; 3: 64-76.
9. Yokoyama LQ, Amaral AC. Arm regeneration in two populations of *Ophionereis reticulata* (*Echinodermata, Ophiuroidea*). *Iheringia, Série Zoologia*. 2010; 100: 123-127.
10. Candia-Carnevali MD, Bonasoro F, Patruno M, Thorndyke MC. Cellular and molecular mechanisms of arm regeneration in crinoids echinoderms: the potential of arm explants. *Dev Genes Evol*. 1998; 208: 421-430.
11. Kondo M, Akasaka K. Regeneration in crinoids. *Dev Growth Diff*. 2010; 52: 57-68.
12. Dupont S, Thorndyke MC. Growth or differentiation? Adaptive regeneration in the brittlestar *Amphiura filiformis*. *J Exp Biol*. 2006; 209: 3873-3881.
13. Biressi AC, Zou T, Dupont S, Dahlberg C, Di Benedetto C, Bonasoro F et al. Wound healing and arm regeneration in *Ophioderma longicaudum* and *Amphiura filiformis* (*Ophiuroidea, Echinodermata*): Comparative morphogenesis and histogenesis. *Zoomorphology*. 2010; 129: 1-19.
14. Chinn S. 2006. Habitat distribution and comparison of brittlestar (*Echinodermata: Ophiuroidea*) arm regeneration on Moorea, French Polynesia. UCB Moorea Class: Biology and Geomorphology of Tropical Islands UC Berkeley. Disponible en: <http://www.escholarship.org/uc/item/9jm2351g>
15. Clark MS, Dupont S, Rossetti H, Burn G, Thorndyke MC, Peck LS. Delayed arm regeneration in the Antarctic brittle star (*Ophionotus victoriae*). *Aquatic Biology*. 2007; 1: 45-53.
16. Clark MS, Souster T. Slow arm regeneration in the Antarctic brittlestar *Ophiura crassa* (*Echinodermata: Ophiuroidea*). *Aquatic Biology*. 2012; 16: 105-113.
17. Candia-Carnevali M, Galassi S, Bonasoro F, Patruno M, Thorndyke MC. Regenerative response and endocrine disruptors in crinoid echinoderms: arm regeneration in *Antedon mediterranea* after experimental exposure to Polychlorinated biphenyls. *J Exp Biol*. 2001; 204: 835-842.