

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 11 / N° 12 / 2009 / 17–22

Aislamiento, clonado y expresión de la proteína recombinante para el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF-8) de *Rhinella* (= Bufo) *arenarum*

Enrique V. Paravani, María G. Acosta, Javier E. Díaz Zamboni, Víctor H. Casco.

Isolation, cloning and expression of the recombinant protein for the fibroblast growth factor 8 (FGF-8) of *Rhinella* (=Bufo) *arenarum*

ABSTRACT

Embryological studies have demonstrated that the origin of organs in vertebrates involves complex cellular interactions in different tissues. Biochemical and molecular evidence suggests that endogenous signal in the apical ectodermal ridge (AER) are exerted by Fibroblastic Growth Factor 8 (FGF-8). This Factor is essential in the initiation of the limb development processes in vertebrates. The main objective of the present work was to use molecular techniques to obtain a recombinant protein to FGF-8, from the isolation of the *Rhinella arenarum* toad gene, and to analyze their nucleotidic sequence using bioinformatic tools. It was possible to express the recombinant FGF-8 in a soluble form and also to study the evolutionary relationship with different vertebrate species. The results reflect a near evolutionary relation with other homologous vertebrates genes, especially with the amphibians. The obtention of the recombinant protein gave us the possibility of carrying out structural and physiological studies about the role of FGF-8 during the limb development in our experimental animal model (*R. arenarum*). A secondary objective was to produce specific polyclonal antibodies which allowed for the search of other possible locations and roles of this factor during vertebrate development.

KEY WORDS: Fibroblast Growth Factor 8 (FGF-8), Recombinant protein production, bioinformatics tools.

RESUMEN

Los estudios embriológicos han demostrado que el origen de los órganos de vertebrados involucra complejas interacciones celulares de diferentes tejidos. Las investigaciones bioquímicas y moleculares, sugieren que las señales endógenas en la cresta ectodérmica apical (AER) ejercidas por el Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 (FGF-8), son claves en los procesos de iniciación del desarrollo de los apéndices pares en vertebrados. El objetivo del presente trabajo fue obtener una proteína recombinante para el FGF-8 empleando técnicas moleculares, a partir del aislamiento del gen de *Rhinella arenarum* y analizar la secuencia nucleotídica con herramientas bioinformáticas. Los resultados reflejaron una estrecha relación evolutiva con genes homólogos de otros anfibios. La obtención de la proteína recombinante, nos brinda la posibilidad de llevar a cabo estudios estructurales y fisiológicos del FGF-8 durante el desarrollo de los miembros en nuestro modelo animal (*R. arenarum*). Un objetivo secundario fue producir anticuerpos policlonales para buscar otras posibles localizaciones y roles de este factor durante el desarrollo.

PALABRAS CLAVE: Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 (FGF-8) – Producción de una proteína recombinante – Herramientas de bioinformática.

INTRODUCCIÓN

La iniciación en el desarrollo de los miembros de vertebrados es uno de los mejores modelos para estudiar interacciones celulares durante los procesos de morfogénesis. Los estudios embriológicos han demostrado que el origen de los miembros involucra complejas interacciones celulares entre varios tejidos. Los estímulos iniciales para el desarrollo de los miembros aún no han sido identificados. Se ha propuesto que la posición de las células en el primordio del miembro es la responsable de especificar los tres ejes principales: próximo–distal, antero–posterior y dorso–ventral, como en un sistema de ejes cartesianos. El

primordio del miembro emerge como resultado de un engrosamiento de la capa somática de la lámina mesodérmica lateral, como consecuencia de la disminución selectiva de la proliferación en esta región [1]. Así, el crecimiento y la diferenciación dependerían de las interacciones inductivas que se dan entre la cresta ectodérmica apical (AER) y las células mesenquimáticas de las regiones presuntivas. La AER sería así la responsable de mantener a las células mesenquimáticas en un estado indiferenciado y proliferativo y como consecuencia de esto, se produciría la elongación del miembro [2, 3]. La AER expresa diferentes genes que parecen jugar un rol importante en el crecimiento; entre éstos se destacan algunos de los miembros de la familia de

los Factores de Crecimiento Fibroblásticos (FGFs) [4]. La aplicación exógena de FGF-8, FGF-4, o FGF-2 pueden rescatar el desarrollo del primordio del miembro cuando la AER ha sido removida experimentalmente [5]. A pesar de estas evidencias, los mecanismos de señalización de los FGFs en la cresta y su relación con la función de la zona de progreso (ZP) aún no han sido caracterizados en detalle. La inhibición de la expresión continua de FGF-8 durante la embriogénesis por infecciones virales, causa alteraciones en el desarrollo del esqueleto de los miembros anteriores y posteriores [6]. Estos resultados sugieren que el FGF-8 no sólo está involucrado en la iniciación, crecimiento y modelado del miembro, sino también en la formación del eje antero-posterior del organismo.

El objetivo del presente trabajo ha sido emplear técnicas moleculares para obtener una proteína recombinante para el FGF-8, aislando el gen de *Rhinella arenarum* y posteriormente analizar por medio de herramientas bioinformáticas su relación con otros miembros de esta familia de moléculas en vertebrados. Con este estudio se sientan las bases moleculares para llevar a cabo estudios estructurales y fisiológicos para comprender mejor el rol que cumpliría este factor en el desarrollo de los apéndices pares de vertebrados. Además nos brinda la posibilidad de obtener un anticuerpo policlonal heterólogo para emplear como herramienta de estudio en el desarrollo de los apéndices pares en la especie *Rhinella arenarum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los embriones de *Rhinella arenarum* fueron obtenidos por fertilización in vitro según los métodos descritos por Casco y col. (1992) [7]. Los distintos estadios se obtuvieron manteniéndolos en solución Holtfreter, en acuarios apropiados a 20 ± 2 °C, fotoperiodo de 12 hs. luz: 12 hs. oscuridad. La clasificación de los estadios embrionarios y larvales fue realizada conforme a la clasificación de Gosner (1960) [8].

Aislamiento y purificación de ARN total

El aislamiento de ARN total fue realizado tomando como base los protocolos de Sive y col. [9]. La concentración y calidad de la solución fue determinada midiendo la relación densidad óptica (DO) 260/280. El ARN fue almacenado como una solución acuosa a -80 °C hasta el momento de uso.

Obtención del ADN copia

La reacción fue llevada a cabo colocando simultáneamente 1 µl de las enzimas transcriptasa inversa y ADN polimerasa, junto con 1 µl de cada uno de los cebadores (*Ra*FGF-8*fo*: gAA TTC ATg AAC TAC ATC ACC TCC AT y *Ra*FGF-8*re*: AAg CTT CAT CCg AgA ACT TgA ATA TC; Biodynamics®); 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido; 1,5 mM de MgCl₂; solución *buffer* 10X; agua estéril y aceite mineral. Para el diseño de los cebadores, fue tomada la secuencia del ARN mensajero que codifica para el FGF8b de *Xenopus laevis* de la base de datos *Medline*. *Acc.* N° NM 001090435, a los que se les adicionaron en sus extremos 5' sitios de restricción *Eco* RI y *Hind* III respectivamente. (Biodynamics®). La reacción de síntesis de las primeras hebras del ADN copia a partir del ARN mensajero fue realizada durante 45 minutos a 48 °C; a continuación se realizó la *PCR* durante 32 ciclos. El programa seleccionado en el termociclador fue el siguiente: 1 minuto a 90 °C, 90 segundos a 65 °C y 2 minutos a 72 °C. Finalizada la reacción de amplificación, se realizó la separación electroforética en geles de agarosa al 1% para confirmar la presencia y calidad del producto amplificado. Una vez amplificado, el producto fue identificado, purificado y guardado a -20 °C hasta el momento de su uso.

Plásmidos empleados

Para el clonado del fragmento amplificado por *PCR* se utilizó el vector pCR-2.1 TOPO (Invitrogen®) y para la expresión de la proteína recombinante el vector pMAL-c2 (Biolabs®).

Transformación de las bacterias competentes

El proceso de transformación de las células competentes fue realizado según lo descrito por Chung y col. [10]. Las distintas transformaciones se hicieron realizando todos los controles correspondientes.

Clonado del fragmento de PCR en el vector pCR 2.1-TOPO

El fragmento de ADN amplificado por *PCR*, fue ligado al vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen®) para obtener la construcción [pCR 2.1-TOPO/*Ra*FGF-8]. Las construcciones fueron sembradas en una placa conteniendo LB-agar más ampicilina, X-Gal e IPTG. Las colonias blancas obtenidas fueron replicadas en una nueva placa numerada para identificar cada colonia transformada. Fueron elegidas 5 colonias blancas al azar y purificados los ADN plasmídicos correspondientes.

Construcción [pMal-c2/RaFGF-8]

Los plásmidos con la construcción [pCR 2.1-TOPO/RaFGF-8] fueron digeridos con las enzimas de restricción *Eco RI* y *Hind III* (Biodynamics®). Los productos de la mezcla de digestión fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%. El fragmento liberado de la colonia 6 fue purificado del gel de agarosa y ligado al vector pMal-c2 (Biolabs®) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

Expresión de la proteína recombinante

Bacterias *BL 21* (DE3) transformadas con la construcción [pMAL-c2/RaFGF-8] fueron cultivadas en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche a 37 °C en agitación a 180 g. El cultivo fue diluido a una concentración 1/100 e incubado en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO= 0,5 - 0,6. La expresión de la proteína fue inducida mediante el agregado de IPTG (concentración final 1mM), seguida de la incubación por 5 horas a 37 °C. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 5000 g durante 15 minutos. El pellet fue resuspendido en solución de sonicado (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM, EDTA 1mM). La ruptura celular fue llevada a cabo usando un procesador ultrasónico de TM alta intensidad Vibra-cell VCX-600 (Sonics & Materials Inc.) con pulsos de 2,5 - 10 segundos durante 1 minuto. Posteriormente fue centrifugada a 4 °C y 5000 g durante 15 minutos. Tanto el sobrenadante como los pellets fueron recolectados y almacenados a -20 °C hasta el momento de ser utilizados. La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) fue realizada según el método descrito por Laemmli U. K. [11], utilizando como soporte geles discontinuos de poliacrilamida al 15%.

Secuenciación del ADN y análisis Bioinformático

La secuenciación del ADN de la construcción [pCR 2.1 TOPO/RaFGF-8] colonia 6 fue realizada siguiendo el método de extensión de cebadores simples, empleando un Termociclador BigDye™, y el producto purificado por medio de etanol, fue secuenciado usando el equipo Secuenciador Automático 3730xl. [12] Para el análisis bioinformático de los resultados de la secuenciación del ADN se empleó un alineamiento heurístico simple con la herramienta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) del *NCBI*. Adicionalmente se realizó un análisis de alineamiento múltiple con el programa *ClustalX 2.0.11*, enfrentando la secuencia del gen traducida para el FGF-8 de *Rhinella arenarum* con proteínas para el mismo factor de otras especies de vertebrados cuyas secuencias se encuentran en la base

de datos del *NCBI*. Para realizar el análisis filogenético primero se realizó una búsqueda en la base de datos *GenBank* de secuencias proteicas para FGF-8 pertenecientes a diferentes especies (*Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*, *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*). Con estas secuencias se armó un único archivo FASTA que sirvió como entrada para el programa. En primer lugar, el programa realizó un alineamiento múltiple de las secuencias con el programa *MUSCLE*. Este alineamiento múltiple fue depurado mediante el programa *Gblocks* para preservar solamente los bloques conservados entre las secuencias, los que representaron las regiones con información útil para el análisis filogenético. Posteriormente fue construido el árbol filogenético. Para ello fue utilizado el programa *PhyML* que emplea el método de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*), usando cálculos probabilísticos para encontrar el árbol que mejor se ajusta a la variación observada de las secuencias. Como último paso, el árbol generado fue visualizado mediante el programa *TreeDyn*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación del fragmento que codifica el FGF-8 *Rhinella arenarum*

El gen que codifica para el Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 de *Rhinella arenarum* (RaFGF-8) fue amplificado por PCR usando como cebadores *RaFGF-8fo/RaFGF-8re* (Biodynamics®) a partir de ADN copia de *Rhinella arenarum*. En la Figura 1 se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% donde puede observarse el fragmento de ADN amplificado de 636 pb.

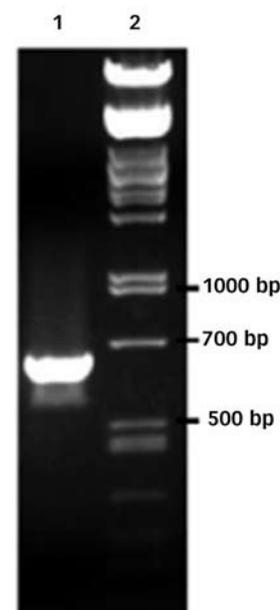


FIGURA 1: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1- Calle 1, producto de PCR utilizando los cebadores *FGF8fo/FGF8re*. 2- Calle 2, Marcador de Peso Molecular (DNA Ladder 1Kb Plus, Invitrogen®).

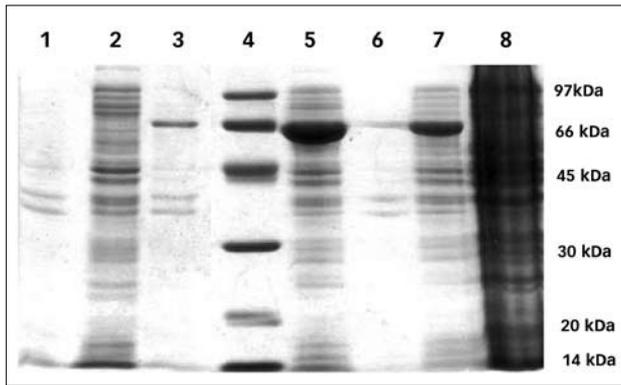


FIGURA 2: SDS-PAGE al 15 %: productos proteicos obtenidos en el sobrenadante y pellet de diferentes cultivos de bacterias *E. coli* Top 10 [pMal-c2/*Ba*FGF-8] inducidas. 1: Calle 1, pellet colonia 6. 1: Calle 2, sobrenadante colonia 6. 3: Calle 3, pellet colonia 8. 4: Calle 4, marcador de masa molecular (Pharmacia®). 5: Calle 5, sobrenadante colonia 8. 6: Calle 6, pellet colonia 4. 7: Calle 7, sobrenadante colonia 4. 8: Calle 8, lisado de células Top 10.

Expresión de FGF-8 a partir de *E. coli* BL21 (DE3) [pMal-c2/*Ra*FGF-8]

Para la expresión del FGF-8 se seleccionaron tres colonias transformantes al azar. (Figura 2) La masa molecular de la proteína de fusión fue estimada en 66 kDa, como era de esperar (43 kDa corresponden a la proteína de unión a la Maltosa (MBP) y 23 kDa a la FGF-8 de *Rhinella arenarum*). La colonia 8 expresó la proteína recombinante en forma soluble, por lo que fue la escogida para continuar con los estudios de purificación.

Secuenciación del ADN y análisis Bioinformático

La secuenciación del ADN de la construcción [pCR 2.1 TOPO/*Ra*FGF-8] colonia 6, confirma la identidad del gen



FIGURA 3: Análisis Bioinformático empleando el programa Nucleotide BLAST 2. Alineamiento entre el gen del FGF-8 de *Rhinella arenarum* obtenido en el presente trabajo y el gen FGF-8b de *Xenopus laevis* publicado por Fletcher y col., 2006.

FGF-8, el cual se publicó en la base de datos del PubMed cuyo número de acceso es FJ 225795. Del análisis del alineamiento realizado con la secuencia correspondiente a *Xenopus laevis* (Figura 3) se observó una identidad del 98%, esto implica que 625 nucleótidos se encuentran conservados y en la misma posición relativa con respecto a los 636 nucleótidos totales. El porcentaje de *gaps* a lo largo del alineamiento fue nulo y por tanto, el valor E fue de 0.0. Puede concluirse que el gen FGF-8 obtenido a partir de *Rhinella arenarum* posee un altísimo grado de identidad con el publicado por Fletcher y col. (2006) para *Xenopus laevis* [13].

Como muestra la Figura 4, fue posible observar que la secuencia de aminoácidos para el FGF-8 de *Rhinella arenarum* posee un alto grado de homología con secuencias de aminoácidos para el mismo factor de otras especies analizadas, demostrando que existe una relación evolutiva muy próxima con los genes analizados. El empleo de esta herramienta fue útil para construir un árbol filogenético (Figura 5).

El resultado obtenido fue un dendrograma que muestra la relación evolutiva entre las especies analizadas y una cierta probabilidad asociada a esa relación. Como se puede observar en la Figura 5, el gen de FGF-8 perteneciente a la especie analizada en este trabajo (*Rhinella arenarum*) mostró una estrecha relación con sus homólogos de *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*.

La actividad de FGF-8 está regulada por empalme alternativo y éste proceso se ha verificado en humanos, ratones, pollos y *Xenopus* (Fletcher y col., 2006 [13]; Crossley & Martin, 1995 [14]; Gemel y col., 1996 [15]; Ghosh y col., 1996 [16]; Haworth y col., 2005 [17]; MacArthur y col., 1995 [18]). El ARNm alternativamente empalmado, da origen a isoformas proteicas que difieren en la longitud

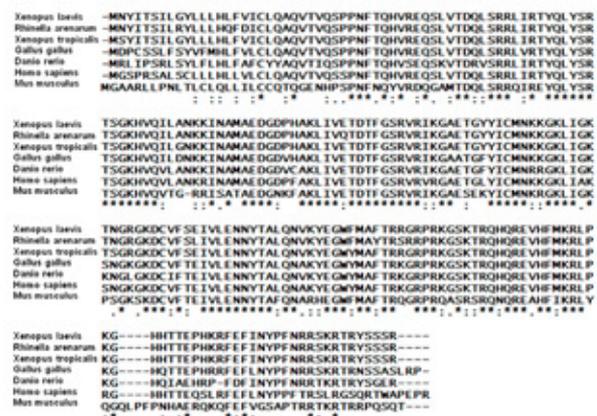


FIGURA 4: Análisis Bioinformático empleando el programa ClustalX 2.0.11. Alineamiento múltiple para los productos del gen FGF-8 de *Rhinella arenarum* (FJ225795) y distintos organismos cuyas secuencias de aminoácidos han sido publicadas previamente en el NCBI. *Xenopus laevis* (NM_001090435.1); *Xenopus tropicalis* (NM_001008162.1); *Gallus gallus* (NM_001012767.1); *Danio rerio* (NM_131281.2); *Homo sapiens* (NM_006119.3); *Mus musculus* (NM_008004.4). Referencias: (*) Indica residuos de aminoácidos idénticos completamente conservados; (.) Indica que existe una fuerte identidad entre grupos; (:) Indica que existe una débil identidad entre grupos.

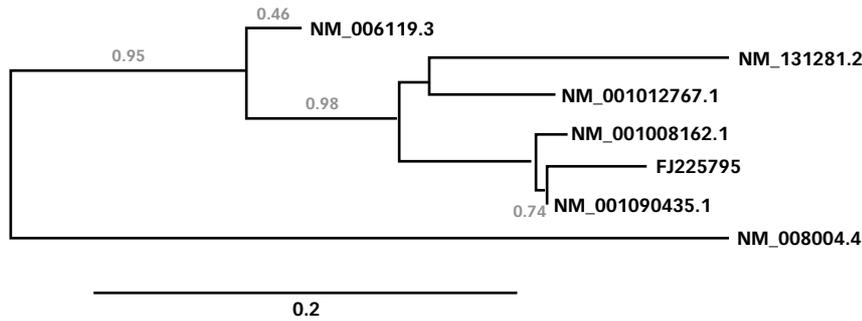


FIGURA 5: Dendrograma del árbol filogenético construido con el programa Phylogeny. Se pueden observar las estrechas relaciones evolutivas entre las diferentes especies analizadas y la probabilidad asociada a dicha relación. *Rhinella arenarum* (FJ225795); *Xenopus laevis* (NM_001090435.1); *Xenopus tropicalis* (NM_001008162.1); *Gallus gallus* (NM_001012767.1); *Danio rerio* (NM_131281.2); *Homo sapiens* (NM_006119.3); *Mus musculus* (NM_008004.4).

y/o secuencia del extremo N, algunos de los cuales *in vivo*, poseen actividades diferentes (Fletcher y col., 2006 [13]; MacArthur y col., 1995 [18]; Blunt y col., 1997 [19]; Olsen y col., 2006 [20]; Song y col., 2000 [21]). El uso de un pequeño número de modelos animales tradicionales es insuficiente para comprender la evolución de la diversidad morfológica por lo que resulta de sumo interés ampliar el uso de modelos alternativos, morfológicamente divergentes para dilucidar los mecanismos moleculares que subrayan las diferencias morfológicas entre las especies (Cretkos y col. 2007 [22]).

El alto grado de homología exhibida entre el gen que codifica para FGF-8 de *Xenopus laevis* y *Rhinella arenarum* permite sugerir que los mecanismos de regulación de su expresión serían muy semejantes, soportando la hipótesis que se trata de un gen altamente conservado en vertebrados y, de este modo, permitirá continuar nuestras investigaciones tendientes a dilucidar su rol específico durante el desarrollo de los miembros de vertebrados.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se ha logrado obtener, empleando herramientas clásicas de biología molecular, la proteína recombinante para el Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 de una especie de anfibios autóctonos (*Rhinella arenarum*) ampliamente usada en estudios de biología del desarrollo de vertebrados en nuestro país. La expresión de la proteína se obtuvo en forma soluble, lo que permite su purificación a partir de una columna de amilosa. Se pudo comprobar que dicho gen posee un alto grado de similitud de secuencia con los otros Factores de Crecimiento Fibroblástico publicados por diferentes autores en otras especies. Del análisis del dendrograma, se puede concluir que el gen codificante para el FGF-8 obtenido de *Rhinella arenarum* mostró una estrecha cercanía con sus homólogos de *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*, a pesar de que las relaciones evolutivas entre estos anfibios aparece muy distante. Con estos resultados, se pudo depositar la secuencia para el

FGF-8 de *Rhinella arenarum* en la base de datos NCBI, cuyo número de acceso es: FJ225795. Desde un punto tecnológico, resulta muy importante contar con esta proteína recombinante, ya que brinda la posibilidad de llevar a cabo estudios estructurales y fisiológicos tendientes a comprender mejor el rol que cumpliría el FGF-8 en el desarrollo de los apéndices pares de vertebrados. Adicionalmente a partir de ésta proteína recombinante, se intentará la obtención de anticuerpos policlonales heterólogos generados a partir de una secuencia génica de *Xenopus laevis* en una especie de interés biológico ecológico de amplia distribución en la región y que constituye uno de los principales modelos experimentales de vertebrados en nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SEARLS R. L. & JANNERS M. Y. (1971). *The initiation of limb bud outgrowth in the embryonic chick*. Dev. Biol. 24: 198–213.
- GLOBUS & VETHAMANY GLOBUS (1976). *An in vitro analogue of early chick limb bud outgrowth*. Differentiation 3: 91–96.
- REITER & SOLURSH (1982). *Mitogenic property of the apical ectodermal ridge*. Dev Biol. 93: 28–35.
- TICKLE C. & EICHELE G. (1994). *Vertebrate limb development*. Ann. Rev. Cell Biol.: 10. 121–152.
- NISWANDER L., TICKLE C., VOGEL A., BOOTH I., MARTIN G.R. (1993). *FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb*. Cell 5: 579–587.
- VOGEL A., RODRÍGUEZ C., IZPISÚA BELMONTE J. (1996). *Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb*. Development 122: 1737–1750
- CASCO V. H., PAZ D., RUIZ G., MALDONADO C., PISANO A. & AOKI, A. (1992). *Differentiation of endocrine myocardiocytes in the developing heart of the toad (Bufo arenarum, Hensel)*. Int. J. Dev. Biol. 36: 537–542.
- GOSNER K. L. (1960). *A simplified table for staging anuran embryos and larvae, with notes on identification*. Herpetologica 16: 183–190.

9. SIVE H. L., GRAINGER R. M., HARLAND R. M. (2000). *Early development of Xenopus laevis*. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 338 pp.
10. CHUNG C.T., NIEMELA S. L., MILLER R. H. (1989). *One-step preparation of competent Escherichia coli: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 2172–2175.
11. LAEMMLI U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4*. Nature 74: 680–685.
12. SANGER, F. & COULSON, A. R. (1975). *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. J. Mol. Biol. 94: 441–448.
13. FLETCHER R.B., BAKER, J.C., HARLAND, R.M. (2006) *FGF-8 spliceforms mediate early mesoderm and posterior neural tissue formation in Xenopus*. Journal Development 133: 1703–1714.
14. CROSSLEY P.H. & MARTIN G.R. (1995). *The mouse fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo*. Development 121: 439–451.
15. GEMEL J., GORRY, M., EHRLICH, G.D., MACARTHUR, C.A. (1996). *Structure and sequence of human fgf8*. Genomics 35: 253–257.
16. GHOSH A.K., SHANKAR D.B., SHACKLEFORD G.M., WU K., T'ANG A., MILLER G.J., ZHENG J., ROY BURMAN P. (1996). *Molecular cloning and characterization of human fgf8 alternative messenger RNA forms*. Cell Growth & Differentiation 7: 1425–1434.
17. HAWORTH K.E., HEALY C., SHARPE P.T. (2005). *Characterization of the genomic structure of chick fgf8*. DNA Sequence 16: 180–186.
18. MACARTHUR C.A., LAWSHE A., XU J., SANTOS OCAMPO S., HEIKINHEIMO M., CHELLAIAH A.T. ORNITZ D.M. (1995). *Fgf-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development*. Development 121: 3603–3613.
19. BLUNT A.G., LAWSHE A., CUNNINGHAM M.L., SETO M.L., ORNITZ D.M., MACARTHUR C.A. (1997). *Overlapping expression and redundant activation of mesenchymal fibroblast growth factor (fgf) receptors by alternatively spliced fgf-8 ligands*. J. Biol. Chem. 272: 3733–3738.
20. OLSEN S.K., LI J.Y., BROMLEIGH C., ELISEENKOVA A.V., IBRAHIMI O.A., LAO Z., ZHANG F., LINHARDT R.J., JOYNER A.L., MOHAMMADI M. (2006). *Structural basis by which alternative splicing modulates the organizer activity of fgf8 in the brain*. Genes Dev. 20: 185–198.
21. SONG Z., POWELL W.C., KASAHARA N., VAN BOKHOVEN A., MILLER G.J., ROY BURMAN P. (2000). *The effect of fibroblast growth factor 8, isoform b, on the biology of prostate carcinoma cells and their interaction with stromal cells*. Cancer Res. 60: 6730–6736.
22. CRETEKOS C.J., DENG J., GREEN E.D., NISC COMPARATIVE SEQUENCING PROGRAM, RASWEILER J.J. & BEHRINGER, R.R. (2007). *Isolation, genomic structure and developmental expression of Fgf8 in the short-tailed fruit bat, Carollia perspicillata*. Int. J. Dev. Biol. 51: 333–338.

Recibido: 17/03/09.

Aprobado: 05/08/09.

• Enrique V. Paravani^{1,2}

Licenciado en Biotecnología (UNL). Antecedentes laborales y/o en docencia: Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Biología Molecular y Celular (Depto. Biología) Facultad de Ingeniería (Bioingeniería-Bioinformática). Antecedentes en investigación: miembro del laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares.

• María G. Acosta²

Licenciada en Biotecnología (UNR). Antecedentes laborales y/o en docencia: Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Química General e Inorgánica (Depto. Físico-Química) Facultad de Ingeniería (Bioingeniería-Bioinformática). Antecedentes en investigación: becaria de CONICET tipo II. Miembro del Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares.

• Javier E. Diaz Zamboni²

Bioingeniero (UNER). Antecedentes Laborales y/o en Docencia: Prof. Adjunto Programación Avanzada (Depto. Informática) Facultad de Ingeniería (Bioingeniería-Bioinformática). Antecedentes en Investigación: miembro del Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares.

• Víctor H. Casco^{1,2}

Dr. en Cs. Biológicas (UNCor.). Antecedentes Laborales y/o en Docencia: Prof. Titular de la Cátedra de Biología Molecular y Celular (Depto. Biología) Facultad de Ingeniería (Bioingeniería-Bioinformática). Antecedentes en investigación: miembro del Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares.

1. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ingeniería. UNER. Ruta 11, Km 10.5, Oro Verde, Entre Ríos, (3101), Argentina. evparavani@bioingenieria.edu.ar.

2. Laboratorio de Microscopía. Facultad de Ingeniería. UNER. Ruta 11, Km 10.5, Oro Verde, Entre Ríos, (3101), Argentina. vcasco@bioingenieria.edu.ar.