

LA PROTEINA VERDE FLUORESCENTE ILUMINA LA BIOCENCIA

MARIA INES PEREZ MILLAN, DAMASIA BECU-VILLALOBOS

Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME CONICET, Buenos Aires

Resumen La proteína verde fluorescente (o GFP, por sus siglas en inglés, *Green Fluorescent Protein*) es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria* que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. El gen que codifica esta proteína ha sido clonado y se utiliza habitualmente en biología molecular como marcador. Los descubrimientos relacionados a la GFP merecieron el Premio Nobel de Química 2008, en conjunto a los tres investigadores, Dres Shimomura, Chalfie y Tsien que participaron escalonadamente en dilucidar la estructura y función de la proteína. El Dr. Shimomura descubrió y estudió las propiedades de GFP, el Dr. Chalfie usando técnicas de biología molecular logró introducir el gen que codificaba para la GFP en el ADN del gusano transparente *C. elegans*, e inició la era de GFP como marcador de procesos en células y organismos. Finalmente el Dr. Tsien modificó la estructura de la proteína para producir moléculas que emiten luz a distintas longitudes de onda, extendiendo la paleta de colores de las proteínas. Las proteínas fluorescentes, entre las cuales se encuentra la GFP, son muy versátiles y se utilizan en diversos campos como la microbiología, ingeniería genética, fisiología, e ingeniería ambiental. Permiten ver procesos previamente invisibles, como el desarrollo de neuronas, cómo se diseminan las células cancerosas, o la contaminación de agua con arsénico, por mencionar algunos usos. Con la obtención de proteínas de muchos colores complejas redes biológicas pueden ser marcadas diferencialmente, lo que permite visualizar la biología celular en acción.

Palabras clave: GFP, bioluminiscencia, aequorina, Cre/LoxP

Abstract *The Green Fluorescent Protein that glows in Bioscience* Green fluorescent protein (GFP) is a protein produced by the jellyfish *Aequorea victoria*, that emits bioluminescence in the green zone of the visible spectrum. The GFP gene has been cloned and is used in molecular biology as a marker. The three researchers that participated independently in elucidating the structure and function of this and its related proteins, Drs. Shimomura, Chalfie and Tsien were awarded the Nobel Prize in Chemistry 2008. Dr. Shimomura discovered and studied the properties of GFP. Using molecular biological techniques, Chalfie succeeded in introducing the GFP gene into the DNA of the small, almost transparent worm *C. elegans*, and initiated an era in which GFP would be used as a glowing marker for cellular biology. Finally, Dr. Tsien found precisely how GFP's structure produces the observed green fluorescence, and succeeded in modifying the structure to generate molecules that emit light at slightly different wavelengths, which gave tags of different colors. Fluorescent proteins are very versatile and are being used in many areas, such as microbiology, biotechnology, physiology, environmental engineering, development, etc. They can, for example, illuminate growing cancer tumours; show the development of Alzheimer's disease, or detect arsenic traces in water. Finding the key to how a marine organism produces light unexpectedly ended up providing researchers with a powerful array of tools with which to visualize cell biology in action.

Key words: GFP, bioluminescence, aequorin, Cre/LoxP

La proteína verde fluorescente (o GFP, por sus siglas en inglés, *Green Fluorescent Protein*) es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria*, que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. El gen que codifica esta proteína, que ya ha sido clonado, se utiliza habitualmente en biología molecular como marcador¹. El descubrimiento y estudio de GFP representó un enorme avance para los investigadores, amplía la

capacidad del microscopio óptico, y otorga una nueva dimensión visible al ojo humano.

Los descubrimientos relacionados a la GFP de Osamu Shimomura, Martin Chalfie, y Roger Y. Tsien merecieron el Premio Nobel de Química 2008, otorgado en partes iguales a los tres, "por el descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente, GFP". Los investigadores que participaron escalonadamente en dilucidar la estructura y función de la proteína, nunca colaboraron directamente entre ellos, ni siquiera el estudio de la GFP era el principal foco de sus carreras científicas, sin embargo, de las contribuciones de los tres surgió el uso de esta proteína que sinergizó con los trabajos de miles de científicos.

Recibido: 25-III-2009

Aceptado: 7-IV-2009

Dirección postal: Dra. Damasia Becu-Villalobos, IBYME, Vuelta de Obligado 2490, 1428 Buenos Aires
Fax: (54-11) 4783-2864 e-mail: dbecu@dna.uba.ar

El financiamiento fue a veces difícil, ya que los estudios de ciencia básica de organismos como las medusas no era un tema atractivo ni prometedor para las agencias de financiamiento, por lo que el premio otorgado refuerza el reconocimiento a la importancia de la ciencia básica como el fundamento para beneficios prácticos tanto para la salud como la economía.

A pesar que la llamada química “verde” está de moda en la comunidad de químicos, ningún esfuerzo de los mismos ha podido igualar las reacciones que coordina un solo gen de esta medusa. La activación de este gen activa 238 condensaciones, una ciclización, y una oxidación; en pocos minutos en agua aireada, con un solo producto lateral tóxico, y con un rendimiento de 100% de un producto muy útil que fluoresce: la GFP². Los corales producen proteínas fluorescentes amarillas y rojas con una química parecida. Esto es importante en el contexto del equilibrio precario en que están los corales debido a la acidificación y calentamiento de los océanos.

Historia del descubrimiento

Los descubrimientos que merecieron el Premio Nobel en Química 2008 son un ejemplo de cómo la investigación básica en un área científica puede muchas veces conducir a aplicaciones en otra. En este caso, descifrar el mecanismo de producción de luz por parte de un organismo marino, proporcionó a los investigadores una poderosa variedad de herramientas con las cuales visualizar la biología celular en funcionamiento.

La historia comienza en los años sesenta cuando Osamu Shimomura, en la Universidad de Nagoya, Japón, investiga el fenómeno de bioluminiscencia, *i.e.* las reacciones químicas dentro de organismos vivos que producen luz. Años más tarde, en EE.UU, estudiando la medusa *Aequorea victoria* identificó los órganos de luz que eran responsables de la fluorescencia azul que emitía, y junto a Frank Johnson, de la Universidad de Washington, aisló una proteína bioluminiscente dependiente del calcio, a la que llamaron aequorina, nombre derivado de la medusa con la que trabajaban^{3, 4}. Esta proteína emite fluorescencia en la zona azul del espectro, pero en la medusa emitía luz verde. Profundizando estos estudios, Shimomura logró descubrir que la luz azul emitida por aequorina era absorbida por una segunda proteína (más tarde llamada proteína verde fluorescente o GFP), la que a su vez re-emitía luz verde². Esta capacidad de la GFP era intrínseca a su estructura, y ocurría sin necesidad de factores adicionales.

Shimomura, nacido en Kyoto en 1928, trabajó desde 1980 hasta su jubilación, en 2001, en el Laboratorio de Biología Marina en Woods Hole, Massachusetts, donde es profesor emérito. Siempre mantuvo su ciudadanía japonesa.

En 1988 Martín Chalfie, de la Universidad de Columbia, Nueva York, tomó conocimiento de la existencia de GFP y comprendió que su capacidad para fluorescer en forma independiente podría convertirla en un marcador celular ideal para el estudio de los organismos que él realizaba. Usando técnicas de biología molecular logró introducir el gen que codificaba para la GFP en el ADN del gusano transparente *Caenorhabditis elegans*⁵. De esta forma las células de los gusanos producían GFP y emitían luz verde, sin necesidad del agregado de componentes adicionales, y sin daño para el gusano. Este fue el primer paso, a partir de entonces se comprendió que se podría fusionar el gen que codificaba para la GFP a genes de otras proteínas en estudio, abriendo de este modo enormes posibilidades para el seguimiento de la localización de proteínas específicas en organismos vivos^{2, 6}.

La GFP como herramienta en biología celular fue rápidamente incorporada por muchos investigadores. Roger Y. Tsien, investigador de origen chino y profesor en la Universidad de California, en San Diego, vislumbró la posibilidad de extender la paleta de colores de las proteínas. Tsien estudió cómo la estructura de la GFP producía la fluorescencia verde, y luego modificó dicha estructura para producir moléculas que emitían luz a distintas longitudes de onda, y produjo marcadores de distintos colores⁷. Por otro lado, con su grupo agregaron nuevas moléculas fluorescentes provenientes de otras fuentes naturales a su colección de marcadores que continúa en expansión.

Avances en la tecnología para obtener nuevas proteínas fluorescentes

Con el reconocimiento de los beneficios y la potencialidad de las proteínas fluorescentes ha comenzado una carrera para producir versiones nuevas, más brillantes, que cubran un amplio rango del espectro, con foto-estabilidad aumentada, reducida oligodimerización, e insensibilidad a los cambios de pH⁸. La GFP salvaje fue rápidamente modificada para producir variantes que emiten en regiones del azul (BFP), ciano (CFP) y amarillo (YFP)^{2, 9-10}, pero las regiones naranja y roja del espectro no se han podido lograr con la GFP de la *Aequorea*, y fueron sorprendentemente elusivas hasta el descubrimiento de la primera proteína fluorescente roja en un coral no bioluminiscente, la llamada DsRED (por *Desired RED protein*)¹¹. El grupo de Tsien desarrolló proteínas más pequeñas a partir de ésta, y luego una serie de proteínas con nombres de frutos, como la *mPlum*, *mCherry*, *mStrawberry*, *mOrange* y *mCitrine* de acuerdo al color de su brillo¹². Posteriormente otros investigadores y compañías han contribuido con nuevos colores a esta resplandeciente gama.

Por otro lado, las proteínas originales han sido modificadas para mejorar su funcionamiento⁸. Uno de los re-

sultados de estas mejoras es la GFP mejorada (o EGFP, por sus siglas en inglés, *Enhanced Green Fluorescent Protein*). Con tan amplia paleta, complejas redes biológicas se marcan con distintos colores, permitiendo observar procesos múltiples, circunstancia impensable hasta no hace mucho.

Estructura y espectro de emisión

La estructura de la proteína verde fluorescente es de 238 aminoácidos, que forman once cadenas beta, cuyo conjunto forma un cilindro, en el centro del cual se encuentra una hélice alfa¹³. Contiene un cromóforo especial (constituido por los aminoácidos 65, 66 y 67), un grupo químico que absorbe y emite luz. Cuando la luz UV o luz azul impacta sobre el cromóforo, éste toma la energía de la luz y se excita. En la fase siguiente, el cromóforo se libera de la energía emitiendo luz en longitud de onda verde.

Una característica importante es que la GFP no necesita aditivos para brillar, en contraste con la aequorina y otras proteínas bioluminiscentes. Si así fuera, moléculas energéticas deberían ser inyectadas en las células en forma constante. En cambio, es suficiente con irradiar la GFP con luz UV o azul para que emita fluorescencia.

La GFP original de la medusa posee dos picos de excitación: uno menor, a 475 nm, y uno mayor, a 395 nm. Su pico de emisión está a 509 nm, en la zona verde del espectro.

La DsRED es más grande y más pesada que la GFP. Consiste de cuatro cadenas aminoácidas en lugar de una, y no es tan versátil como marcador de procesos biológicos. El grupo de investigación de Tsien resolvió este problema rediseñando la DsRED de forma de lograr proteínas estables, fluorescentes y de una sola cadena de aminoácidos¹⁴.

Usos

Las proteínas fluorescentes, entre las cuales se encuentra la GFP, son muy versátiles y se utilizan en diversos campos como la microbiología, ingeniería genética y fisiología. Permiten ver procesos previamente invisibles, como el desarrollo de neuronas, cómo se diseminan las células cancerosas, el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, el crecimiento de bacterias patogénicas, la proliferación del virus del SIDA, entre otros.

Por ejemplo, células cancerosas que expresan DsRED pueden implantarse en ratones salvajes, o transgénicos con expresión de GFP en todas las células. Cuando los ratones son iluminados con luz azul las células cancerosas pueden ser fácilmente detectadas y seguidas (en los ratones verdes o normales) permitiendo la localización de las metástasis y el fenómeno de angiogénesis en tumores en proliferación. Por otro lado, el modelo permite

seguir la evolución comparativa de las metástasis en presencia o ausencia de distintos fármacos. Esto sería sólo uno de los múltiples usos que se le están asignando a estas proteínas.

La GFP también tiene una importancia especial en la biología del desarrollo: si se introduce en un estadio temprano de un embrión, se puede seguir la evolución de las primeras células, estructuras y órganos.

Por otro lado, la GFP y proteínas similares tienen aplicaciones biotecnológicas, incluyendo la detección de arsénico en los pozos de agua. Por ejemplo, en partes del sudeste asiático el arsénico presente naturalmente en el agua está envenenando a miles de personas. Los investigadores han modificado genéticamente bacterias resistentes al arsénico que fluorescen en presencia de arsénico^{15,16}. También se han modificado organismos que fluorescen en presencia de trinitrotolueno o metales pesados como el cadmio y zinc^{17,18}.

Ya se han generado monos, gusanos, algas, *Escherichia coli*, y cerdos con GFP en su genoma, que fluorescen¹⁹. Y hasta se han fabricado juguetes con GFP que brillan en la oscuridad.

El arco iris cerebral o *brainbow*

Tres de estas proteínas han sido usadas en un experimento espectacular. Fueron modificados genéticamente ratones para producir determinadas cantidades de proteínas con colores amarillo, cian y rojo en células nerviosas individuales del cerebro; combinación de colores semejante a la que usan las impresoras de computadoras. El resultado fue un cerebro que brillaba con noventa tonalidades diferentes. Los investigadores podían así seguir las fibras nerviosas de células individuales dentro de una densa red en el cerebro. Las imágenes fueron llamadas *brainbow*, el arco iris cerebral²⁰. Recorren internet con el mismo éxito que los videos de *YouTube*.

Nuestra experiencia usando transgénicos que expresan EGFP

Es interesante mencionar el uso de ratones marcadores, o biosensores, que validan escisiones de ADN, y que son utilizados mayormente en la generación de ratones transgénicos específicos por la tecnología de *Cre/LoxP*²¹. La técnica convencional de animales *knockout* ha sido muy útil para descifrar las bases moleculares y celulares de comportamientos, y genera animales que heredan deleciones génicas en todas las células del organismo²²⁻²⁴. Sin embargo, una deleción no restringida en tiempo o región, el *knockout* global, puede conducir a graves defectos en el desarrollo y muerte prematura, que impedirían el análisis de las funciones de los genes post desarrollo. Además, hace difícil la interpretación de fenotipos

anormales atribuyéndolos a un tipo particular de tejido o célula, ya que todas las células están mutadas. Por lo tanto, para mejorar la utilidad de la tecnología de animales *knockout*, se han desarrollado técnicas que imponen restricciones temporales o regionales, o ambas, a la delección génica: el *knockout* restringido. Una manera para lograrlo en un tipo de tejido o célula es aprovechar el sistema *Cre/loxP*, un sistema de recombinación sitio específica del fago P1, en el cual la enzima Cre recombinasa cataliza la recombinación de ADN al reconocer una secuencia específica llamada *loxP* de 34 pares de bases. Estas secuencias *loxP* pueden ser artificialmente insertadas en el genoma de células madre embrionarias por recombinación homóloga, de tal forma que flanqueen uno o más exones del gen de interés (llamado gen "floxeado"), lo que producirá una escisión precisa de ADN sin cortar otras partes del genoma. Se generan ratones transgénicos homocigotas para el gen "floxeado" por técnicas convencionales, y se cruzan con un segundo ratón transgénico que contiene el transgén *Cre* bajo el control de un promotor transcripcional, tejido o célula específico. En la progenie homocigota para el gen "floxeado" y que porte el transgen *Cre* simultáneamente, se producirá recombinación *Cre/LoxP*, y por lo tanto se delecionará el gen "floxeado", y esto sucederá solamente en aquellos tipos celulares en los cuales el promotor asociado a *Cre* sea activo. El desafío radica en la generación de ratones que expresen *Cre* bajo promotores específicos, y para ello un paso esencial es la validación de la actividad *in vivo* de la recombinasa *Cre*. Para ello se usan ratones reporteros. Uno de los más usados es el ratón ROSA-EGFP²⁵. Estos ratones tienen el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP) insertado en el locus Gt(ROSA)26Sor. La expresión de esta proteína está bloqueada por un fragmento STOP "floxeado" por secuencias *loxP* y ubicado entre la secuencia de EGFP y el promotor Gt (ROSA) 26Sor. Por lo tanto, EGFP sólo se expresará cuando actúe la recombinasa *Cre* cortando el fragmento de STOP. Al cruzar los ratones que expresan *Cre* bajo el promotor de prolactina con ratones ROSA-EGFP, hemos logrado que se produzca la recombinación homóloga de los genes "floxeados", la remoción del codón STOP y la expresión de la EGFP en aquellas crías positivas para ambos genes (*Cre+/-EGFP+*)²¹. La utilización de estos ratones reporteros fue un paso importante de validación de nuestro sistema, para la posterior obtención de un ratón con delección específica del receptor dopaminérgico D2²⁶.

Por otro lado, usando ratones transgénicos que expresan EGFP, en el INGEBI-CONICET se han estudiado procesos de neurogénesis en cerebro, y la regulación del apetito, entre otros. En 2004 se identificaron neuronas recién nacidas en el cerebro de un animal adulto y se siguió la evolución de células nerviosas durante sus primeras dos semanas de vida, el tiempo que demoran en madurar y convertirse en adultas²⁷. Las neuronas identi-

ficadas por la GFP eran células granulares, un tipo celular del hipocampo cerebral que forma muchas conexiones y que participa especialmente en procesos de memoria, más que nada de memoria espacial. El modelo confirmó dos cuestiones características de la neurogénesis adulta: que ésta disminuye con la edad (es decir, los ratones más jóvenes tienen más neuronas jóvenes) y que cuanto más actividad física desarrolla el animal de laboratorio más neurogénesis se produce. El hallazgo abonaría la idea que un mayor nivel de actividad motora aumenta la producción de neuronas, a diferencia del sedentarismo. Al contrario, el estrés traumático disminuye la neurogénesis y eso desmejoraría la capacidad de aprender.

Por otro lado, la creación de un ratón transgénico que expresa EGFP en neuronas relacionadas al circuito del apetito, realizada en colaboración entre el INGEBI-CONICET y el Dr. Malcolm Low, de Portland, Oregon, permitió dilucidar aspectos del mecanismo de la obesidad²⁸.

Cuando se ingiere un alimento, el cerebro recibe un mensaje a través de una hormona llamada leptina, luego de una serie de procesos: absorción, metabolización, síntesis de proteínas, etcétera. La metodología biotecnológica logró la identificación de las moléculas del cerebro que son liberadas por la leptina. Se sabía que el tejido adiposo secreta la leptina, de allí entra en la circulación sanguínea, y que el hambre y la saciedad están gobernadas por el cerebro. Por lo tanto, la hormona periférica tenía que entrar al cerebro y dar cierta información. No se sabía bien cómo ocurría esto. El ratón creado expresa EGFP en neuronas cuando el gen de melanocortinas es activado. Las melanocortinas son unos potentes péptidos anorexígenos. Este ratón permitió identificar neuronas que tienen receptores para leptina y que, cuando son activados por dicha hormona liberan melanocortinas, que inducen inmediatamente saciedad.

Patentes

Shimomura, Chalfie y Tsien patentaron las proteínas por ellos descubiertas y desarrolladas. Para los científicos que hacen investigación básica su uso es gratuito, no así para las empresas farmacéuticas. Por lo tanto, para los tres galardonados, en particular para el Dr. Tsien, el descubrimiento también tuvo un rédito económico.

En relación a la constante creación de ratones transgénicos que expresan GFP, es importante destacar que estos ratones no pueden patentarse, porque se utiliza la GFP que ya posee patente por *Clonetech*. Los nuevos transgénicos pueden ser licenciados por el investigador que los genera, de forma que si alguna empresa quisiera usarlos, pueda hacerlo mediante el pago de la licencia.

En conclusión, desde la primera publicación del GFP, hace 46 años, se han conseguido proteínas similares a la GFP, que brillan con los colores del arco iris. Los usos en biología molecular, biotecnología, y medicina se han multiplicado. Y una simple proteína que ha existido en la tierra por más de 160 millones de años saltó a la fama, porque una de sus propiedades más especiales es que los resultados se pueden "ver". Las páginas en Internet con ilustraciones que emplean la GFP son quizás más atractivas que aquellas que utilizan otras metodologías más complejas. El manejo de estas proteínas no ha sido sencillo, ni usarlas es tan sencillo aún, pero el Premio Nobel es bien merecido. Terminamos citando las palabras del Dr. Tsien en su conferencia del banquete del Premio Nobel: "Agradecemos tanto a corales como a medusas, y deseamos que siempre tengan *habitats* intactos para brillar en la posteridad"²⁹.

Bibliografía

- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992; 111: 229-33.
- Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509-44.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962; 59: 223-39.
- Shimomura O. A short story of aequorin. *Biol Bull* 1995; 189: 1-5.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; 263: 802-5.
- Inouye S, Tsuji FI. *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994; 341: 277-80.
- Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 906-18.
- Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* 2007; 120: 4247-60.
- Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12501-4.
- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, et al. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 1996; 273: 1392-5.
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 969-73.
- Shu X, Shaner NC, Yarbrough CA, Tsien RY, Remington SJ. Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry* 2006; 45: 9639-47.
- Prendergast FG, Mann KG. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*. *Biochemistry* 1978; 17: 3448-53.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1567-72.
- Liao VH, Ou KL. Development and testing of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for measuring bioavailable arsenic in contaminated groundwater samples. *Environ Toxicol Chem* 2005; 24: 1624-31.
- Stocker J, Balluch D, Gsell M, et al. Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environ Sci Technol* 2003; 37: 4743-50.
- Yagi K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 73: 1251-8.
- March JC, Rao G, Bentley WE. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 62: 303-15.
- Zimmer M. Green Fluorescent protein. 2009; En: <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>. Consultado 17/02/2009.
- Livet J, Weissman TA, Kang H, et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 2007; 450: 56-62.
- Pérez-Millán MI, Luque G, Becu-Villalobos D, Rubinstein M. Generación de un ratón transgénico promotor de prolactina-Cre. *Medicina (Buenos Aires)* 2007; 67, Supl. III1: 155.
- Diaz-Torga G, Feierstein C, Libertun C, et al. Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH and IGF-I secretion and causes dwarfism in male mice. *Endocrinology* 2002; 143: 1270-9.
- Cristina C, Diaz-Torga G, Baldi A, et al. Increased pituitary vascular endothelial growth factor-A in dopaminergic D2 receptor knockout female mice. *Endocrinology* 2005; 146: 2952-62.
- Cristina C, Diaz-Torga GS, Goya RG, et al. PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes. *Mol Cancer* 2007; 6: 4.
- Mao X, Fujiwara Y, Chapdelaine A, Yang H, Orkin SH. Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood* 2001; 97: 324-6.
- Pérez-Millán MI, Luque G, Ornstein AM, Becu-Villalobos D, Rubinstein M. Nuevo modelo para el estudio de prolactinomas: ratón *knockout* para el RD2 tejido específico. Reunión de la Sociedad Argentina de Biología. Diciembre 2008, Bs As, Argentina. Publicado en Biocell, 2008. *Biocell* 2008; En prensa.
- Overstreet LS, Hentges ST, Bumachny VF, et al. A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci* 2004; 24: 3251-9.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001; 411: 480-4.
- Tsien RY. Banquet speech. The Nobel Prize 2008 Award ceremony. 2008; En: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/tsien-speech.html. Consultado 17/02/2009.