



## Consanguinidad de tres poblaciones de ratas (*Rattus Norvegicus*) Sprague-Dawley de bioterio a través de tres polimorfismos de longitud de secuencias simples (SSLP)

### Consanguinity three populations of rats (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley biotherium through three length polymorphisms simple sequences (SSLP)

Mamani-Mayta Maria Eugenia<sup>1\*</sup>, Loza-Murguía Manuel Gregorio<sup>1,2,3</sup>, Torres-Tola Emma<sup>4</sup>, Luna-Barrón Rudy<sup>4</sup>, Arteaga-Voigt Daniela<sup>1,4</sup>

#### Datos del Artículo

<sup>1</sup> Universidad Católica Boliviana San Pablo-UCBSP, Unidad Académica Campesina Tiahuanaco UAC-T, Ingeniería Zootécnica, Km 74, Carretera Internacional La Paz-Desaguadero, Tel +591-2-2895100. La Paz, Bolivia.

<sup>2</sup> Universidad Católica Boliviana San Pablo-UCBSP, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP, Ingeniería Agronómica, Coroico-Nor Yungas-La Paz, Bolivia. +591(2)8781991.

<sup>3</sup> Departamento de Enseñanza e Investigación en Bioquímica & Microbiología-DEI&BM, Unidad Académica Campesina Carmen Pampa-UAC-CP.

<sup>4</sup> Centro de Investigación Genética (CINGEN), Instituto de Investigaciones Técnico Científicas, Universidad Policial (IITCUP), Dirección Nacional de Instrucción y Enseñanza (DNIE), Academia Nacional de Policía, Av. Hugo Ernst, # 7404, Bajo Seguencoma, La Paz Bolivia. Telf. +591-2-2786977 (int. 804). [dic@itcup.org](mailto:dic@itcup.org)

\*Dirección de contacto:  
Universidad Católica Boliviana San Pablo-UCBSP, Unidad Académica Campesina Tiahuanaco UAC-T, Ingeniería Zootécnica, Km 74, Carretera Internacional La Paz-Desaguadero, Tel 591-77297370. La Paz, Bolivia.

Maria Eugenia Mamani-Mayta  
E-mail address  
[marieem2011@hotmail.com](mailto:marieem2011@hotmail.com)

#### Palabras clave:

Consanguinidad,  
polimorfismo,  
bioterios,  
variabilidad genética.

*J. Selva Andina Anim Sci.*  
2016; 3(2):58-76.

#### Historial del artículo.

Recibido enero, 2016.  
Devuelto junio 2016  
Aceptado septiembre, 2016.  
Disponible en línea, octubre, 2016.

#### Resumen

En los últimos años una de las técnicas más utilizadas por los bioterios para realizar el control genético de estas poblaciones, el empleo de marcadores genéticos, particularmente los Polimorfismos de Longitud de Secuencias Simples (SSLP) permiten establecer el grado de consanguinidad, relaciones genéticas y la variabilidad genética de una población con una certeza estadística de un 99.9%. Es así que en el presente estudio se ha evaluado, el índice de consanguinidad de tres poblaciones de rata (*Rattus norvegicus*) de bioterio, a través de tres Polimorfismo de Longitud de Secuencias Simple, mediante PCR y electroforesis capilar, con el fin de determinar la variabilidad genética, la relaciones genéticas y el grado de consanguinidad, de manera que se muestre su utilidad en libros de registros de estas poblaciones. Se realizó la extracción del ADN genómico del total de ratas (90 ejemplares, que corresponden a las poblaciones: RJV, RF y RCM de *Rattus norvegicus* Sprague-Dawley de bioterio, las muestras tejido conectivo, se conservó en tubo eppendorf de 1.5 mL, que contenía etanol al 70%. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que las tres poblaciones de ratas, presentan una diversidad genética moderadamente baja con valores que se encuentran entre 0.44 y 0.48, siendo el locus D17Ratt115 el más polimórfico. El índice de consanguinidad obtenido a partir de la caracterización de tres locus en las poblaciones presento valores 0.22, 0.15 y 0.08 indicando un grado de consanguinidad bajo, resultados que coinciden con los estadísticos F los cuales determinaron que existe una diferencia poco significativa entre las tres poblaciones (FST), una reducción disminuida de heterocigotos (FIT) y un bajo grado de consanguinidad (FIS).

© 2016. *Journal of the Selva Andina Animal Science, Bolivia. Todos los derechos reservados.*

#### Abstract

In the last year's one of the techniques more used by the bioterios to carry out the genetic control of these populations, it is the employment of genetic markers, particularly polymorphisms of Longitude of Simple (SSLP) Sequences allows to establish the grade of consanguinity, genetic relationships and the genetic variability of a population with a statistical certainty of a 99.9%. It is so presently study it has been evaluated, the index of three populations' of bioterio rat (*Rattus norvegicus*) consanguinity, through three polymorphisms of Simple Longitude of Sequences, by means of PCR and capillary electrophoresis, with the purpose of determining the genetic variability, the genetic relationships and the grade

*Editado por:  
Selva Andina  
Research Society*

**Key words:**

Inbreeding,  
polymorphism,  
animals facilities,  
genetic variability.

of consanguinity, so that their utility is shown in books of these populations' registrations. It is so the results obtained study presently they indicate that the three populations of rats, present a genetic diversity moderately low with values of they are between 0.44 and 0.48, being the locus D17Ratt115 the more polymorphic. The index of consanguinity obtained starting from the characterization of three locus in the populations presents values 0.22; 0.15 and 0.08 indicating a low grade of consanguinity, results that those coincide with statistical F which determined that a not very significant difference exists among the three populations (FST), a diminished reduction of heterocigosis (FIT) and a low grade of consanguinity (FIS).

© 2016. *Journal of the Selva Andina Animal Science. Bolivia. All rights reserved.*

## Introducción

Los animales laboratorio en condición a ser utilizados para investigación se determinan por sus características morfo fisiológicas, bioquímicas u otras cualidades que definen su fenotipo, como resultado de la interacción entre su genotipo y el ambiente de los bioterios que debe estar rigurosamente controlado, siendo características fundamentales en su patrimonio genético, por lo que el control y la preservación de la calidad genética del animal de laboratorio deben ser prioritarios (Melby & Balk 1983).

En los últimos 30 años, se han publicado casos de líneas, colonias de ratones y ratas que han perdido sus características genéticas, conllevando a la desvalorización de los resultados obtenidos, pérdida de tiempo y de recursos (Benavides & Guenet 2003). De manera que se hace necesario crear controles genéticos, fenotípicos de los ratones, las ratas utilizadas en la experimentación, para garantizar que los resultados obtenidos en esta sean reproducibles y tengan importancia científica.

A partir de registros genéticos realizados por laboratorios, se considera a la rata albina Wistar y la *Sprague-Dawley* como poblaciones híbridas, proveniente este último de una población de ratas de laboratorio y un grupo silvestre (White & Lee 1998). *Sprague-Dawley* (SD) es una rata no consanguínea,

en primer lugar generada por Robert S. Dawley Durante la década de 1920 por la cría de ratas Wistar a los híbridos de laboratorio y derivados de las poblaciones silvestres. En 1950, Charles River Laboratories (CRL) adquirió los animales de cría y desarrolló una nueva línea con un mejor estado microbiano por derivación cesárea. White & Lee 1998. Los antecedentes genéticos son considerados como una variable de investigación intrínseca en la investigación biomédica (Fox *et al.* 2002). El diseño experimental toma en consideración adecuada de la especie, raza y sub-deformación, cuyo fondo genético es probable que tenga una influencia en el resultado experimental. Sobre la base de los antecedentes genéticos, los animales utilizados en la investigación se clasifican en términos generales en endogamia, no híbrida, híbridos, híbridos recombinantes, razas y animales de origen genético desconocido mixtos. Entre estos, líneas puras se utilizan ampliamente para proporcionar un fondo genético uniforme que garantiza la reproducibilidad con un pequeño número de animales no consanguíneos ofrecen un fondo genético variado que es probablemente debido a sus características genéticas menos rigurosa y control de calidad genética, a menudo carecen de la información genética completa en la cola a

nivel individual lo que puede conducir a una variación significativa no detectada genética dentro de la muestra, así como la deriva genética dentro de la población a través del tiempo (Chia *et al.* 2005, Festing 1999). Por lo tanto, el uso de no consanguínea aumenta la variabilidad fenotípica, angiografías poder estadístico del experimento y hace que la interpretación de los resultados experimentales más desafiantes (Hubrecht & Kirkwood 2010, Vallender & Miller 2013).

Las ratas *Sprague-Dawley* se utilizan ampliamente para desarrollar modelos animales de enfermedades humanas tales como la diabetes, la obesidad, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares Benson *et al.* 2007, Davidson *et al.* 2010, Klocke *et al.* 2007, Levin *et al.* 1997, Roomi *et al.* 2005, Shpilberg *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2003. Sin embargo, el uso de tales roedores genéticamente heterogéneos en el desarrollo de modelos animales de enfermedad humana puede introducir variaciones en manifestación de la enfermedad así como la respuesta a la intervención terapéutica. Estudios previos demostraron la superioridad de las ratas de Lewis consanguíneas más de las ratas SD no consanguíneas en un modelo quirúrgico de la insuficiencia cardíaca, con una mayor mortalidad tamaño del infarto predecible y mayor en las ratas Lewis. La diferencia se atribuyó a la ramificación y el posicionamiento de la arteria izquierda ascendente que mostró una mayor variación en SD (no consanguínea) en comparación con las ratas (consanguíneo) Lewis (Liu *et al.* 1997). Cuanto mayor sea la previsibilidad y la menor variabilidad puede atribuirse a los antecedentes genéticos uniforme de líneas puras. Además, la diferencia en las respuestas a infarto agudo de miocardio se demostró entre las ratas Wistar exogámicas obtenidos de diferentes fuentes (Naaijkens *et al.* 2014). Por lo anteriormente descrito, el objetivo de la pre-

sente investigación fue determinar el índice de consanguinidad en tres poblaciones de ratas (*Rattus novergicus*) *Sprague-Dawley* de bioterio a través de tres polimorfismos de longitud de secuencias simples (PLSS).

## Materiales y métodos

*Animales.* Se realizó la extracción del ADN genómico del total de ratas (90 ejemplares), *Sprague Dawley*, el trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación Genética (CINGEN) del Instituto de Investigación Técnico Científico de la Universidad Policial “Mcal José Antonio de Sucre” (IITCUP) del departamento de La Paz, Bolivia.

*Extracción de ADN.* Las muestras tejido conectivo (cola de rata), la conservación del tejido se realizó en tubo eppendorf de 1.5 mL, que contenía etanol al 70% que cubría toda la muestra.

*Descripción de la población en estudio.* Las 90 muestras corresponden a las poblaciones: RJV, RF y RCM de *Rattus novergicus Sprague-Dawley* de bioterio (Tabla 1).

Tabla 1 Datos y tamaño de la población en estudio

N°	Población	N° de muestras	Año de llegada
1	RJV	30	1992
2	RF	30	1997
3	RCM	30	2004

*Extracción del material genético ADN a partir de tejido cola de rata.* Antes de iniciar la extracción todos los materiales de laboratorio fueron tratados con mucho cuidado para evitar posibles contaminaciones de las muestras, para lo cual los mesones, micropipetas y todo el material de extracción de ADN fueron desinfectadas en primera instancia con

hipoclorito 8% y etanol al 70%, posteriormente el ambiente y todo el material se trató con luz UV durante 10 minutos.

La extracción del material genético se aplicó el método modificado de Miller *et al.* 1988 y con la ayuda de un Kit Purificación de ADN de la empresa PROMEGA, la extracción se realizó mediante un procedimiento de lisis química y mecánica, precipitación salina, purificación alcohólica.

Sobre una placa de vidrio con la ayuda de una pinza y una hoja de bisturí triturar y pesar 3 mg de tejido conectivo (cola de rata, misma que fue depositada en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Añadir 100 µL de buffer de lisis y 2 µL de proteinasa k (0.20 mg/ µL), mezclar enérgicamente.

Incubar a 65 °C durante 60 min, mezclar vigorosamente cada 30 min durante 20 seg. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Añadir 36 µL de buffer de precipitación, mezclar vigorosamente por 15 seg e incubar a -20 °C por 5 min., centrifugar a 14000 g por 5 min. Recuperar el sobrenadante a otro tubo. Adicionar 100 µL de isopropanol y homogenizar por inversión, incubar a -20 °C durante 5 min. Centrifugar a 14000 g por 2 min. Desechar el sobrenadante y añadir etanol al 70% homogenizar por inversión. Centrifugar a 14000 g por 2 min. Desechar el sobrenadante e invertir el tubo sobre un papel secante y secar a 65 °C durante 10 min. Anadir agua ultra pura 50 µL. Incubar a 65 °C durante 30 min.

Realizar la corrida electroforética en gel de agarosa al 1% y cuantificar.

*Determinación de la calidad y concentración del ADN extraído.* Los extractos obtenidos fueron revelados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL), la corrida electroforética se llevó a cabo a una corriente de 100 V durante 30 min los productos se visualizaron en un trasiluminador de luz UV llegando a observar la calidad de los extractos obtenidos. Así mismo el ADN obtenido de cada animal se cuantifico mediante un espectrofotómetro, en donde se midió la absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La calidad de los ADN's extraídos se evaluó mediante la relación (A260/A280) mismas que estuvieron en un rango aceptable de 1.7 y 2.2. La concentración se determinó mediante la siguiente fórmula:  $[A260 \times FD \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{L}]$  en este caso el FD (Factor de Dilución fue de 35).

*Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).* Los extractos obtenidos fueron amplificados mediante PCR en donde se utilizó cebadores específicos los cuales fueron desarrollados previamente por Serikawa *et al.* 1992. El tamaño de alelos reportados varía entre 190 a 246 pares de bases dependiendo del locus (Tabla 2).

**Tabla 2** Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para el análisis de los microsatélites de rata

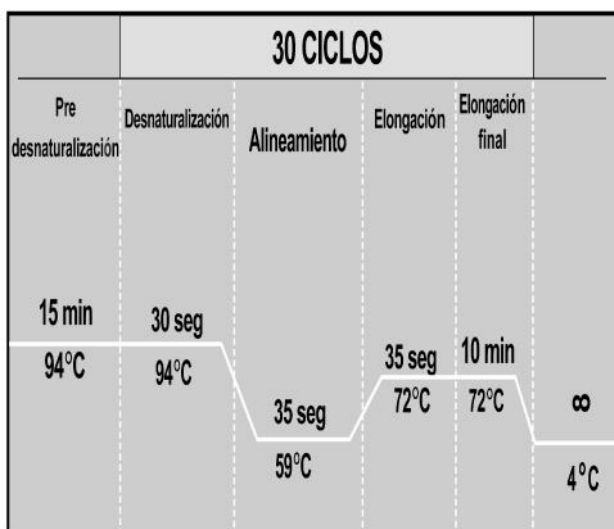
N°	Tamaño pb	N° de muestras
<b>D1 Mit17</b>	213	Adelante - 5'-GTGTATGTATGCGTGCGTGC- 3' Reversa - 5'-TGGAAAGGGTGGAGACAAATG- 3'
<b>D 17 Rat115</b>	220	Adelante: GTGTCTGCCTTTGCACCTTT Reversa: CTGCTGTCTTTCCATCCACA
<b>D14 Mit193</b>	249	Adelante: CTCTGGCTTCTAAACAAAACACTG Reversa: CATGTGGACGTGTGTATACATCC

*Amplificación por PCR Multiplex de los microsatélites seleccionados.* Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando un termociclador automático (Thermal cycler 9800 Fast Applied). El volumen final de amplificación fue de 20  $\mu$ L, el cual se llevó a cabo según el siguiente protocolo (tabla 3, figura 1)

**Tabla 3 Condiciones de PCR Multiplex**

Reactivos	C. Inicial
Hot Fire® Solis Taq	5X
Pool de primers ADN	10 $\mu$ m/ $\mu$ L 10ng/ $\mu$ L
Agua ultra pura	---

**Figura 1 Condiciones de amplificación de PCR Multiplex para los locus D1Mit17, D17Ratt115 y D14Mit 193**



Finalizada la reacción de amplificación, los productos de PCR fueron observados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2.5% aplicándose una corriente de 50 V durante 90 min, posteriormente se procedió a la tinción con bromuro de etidio (10 mg/mL) seguidamente los productos se visualizaron sobre un trasiluminador de luz ultra violeta (UV) modelo M15 USA. Llegando a corroborar de esta manera si la amplificación fue efectiva.

*Electroforesis capilar.* La electroforesis capilar es un método utilizado en genética molecular, es un analizador genético, el cual permite la separación de diferentes moléculas presentes en la disolución de acuerdo a la relación masa/carga dentro un campo eléctrico. Por ejemplo el ADN por su carga negativa gracias a su composición de fosfatos en su estructura migra hacia el lado positivo (ánodo) dentro de un campo eléctrico.

Esta técnica es más eficiente debido a que es mucho más sensible, permitiendo diferenciar entre alelos que se diferencian por pocos pares de bases y su análisis es de poco tiempo. El análisis de sus resultados se realiza mediante un software el cual evita interpretaciones equivocadas.

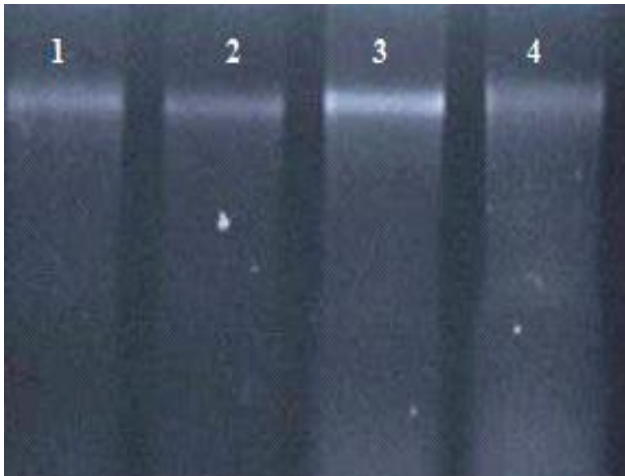
Los productos obtenidos de PCR fueron analizados mediante electroforesis capilar, en un analizador genético ABI Prism 3130 de Applied Biosystems. Posteriormente a través de un software GeneMapper V 3.7 se estableció los alelos para cada marcador.

*Análisis estadístico.* Los datos de genotipos se procesaron mediante el paquete estadístico Power Marker Versión 3.25 (Liu & Muse 2005), con el cual se estimaron los parámetros genéticos. La probabilidad de existencia de alelos nulos se estimó mediante el programa CERVUS 2.0 (Marshall *et al.* 1998). Se construyó un árbol de distancias genéticas utilizando las distancias genéticas DA y se representó gráficamente con el software TreeView (Page 1996). La dinámica de población de Lotka-Volterra y Nicholson-Bailey se utilizan junto con los demás utilizando Populus® de software 5.4 para analizar los resultados (Hopper 1987).

## Resultados

### Obtención del material genético

Figura 2 Electroforesis en gel de agarosa 1%, de los extractos de ADN obtenidos a partir de tejido cola de rata



1: Control positivo  
 2: RF32 6B1M5  
 3: RJV 2R2M4  
 4: RCM 2E2H5

Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, de PCR por separado y Multiplex para los locus D1Mit 17, D17Rat115 y D14Mit193

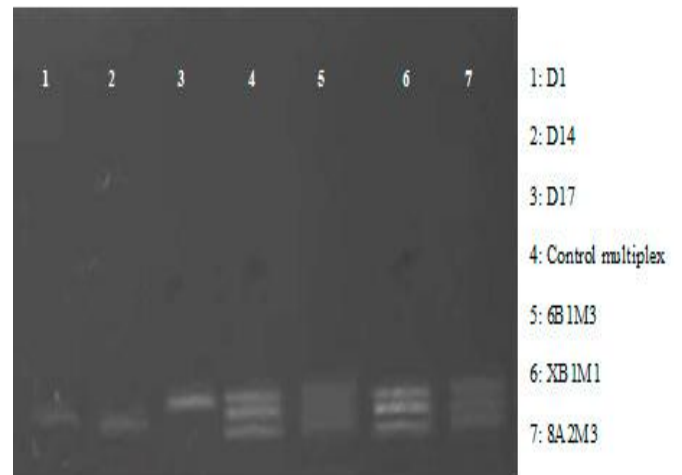


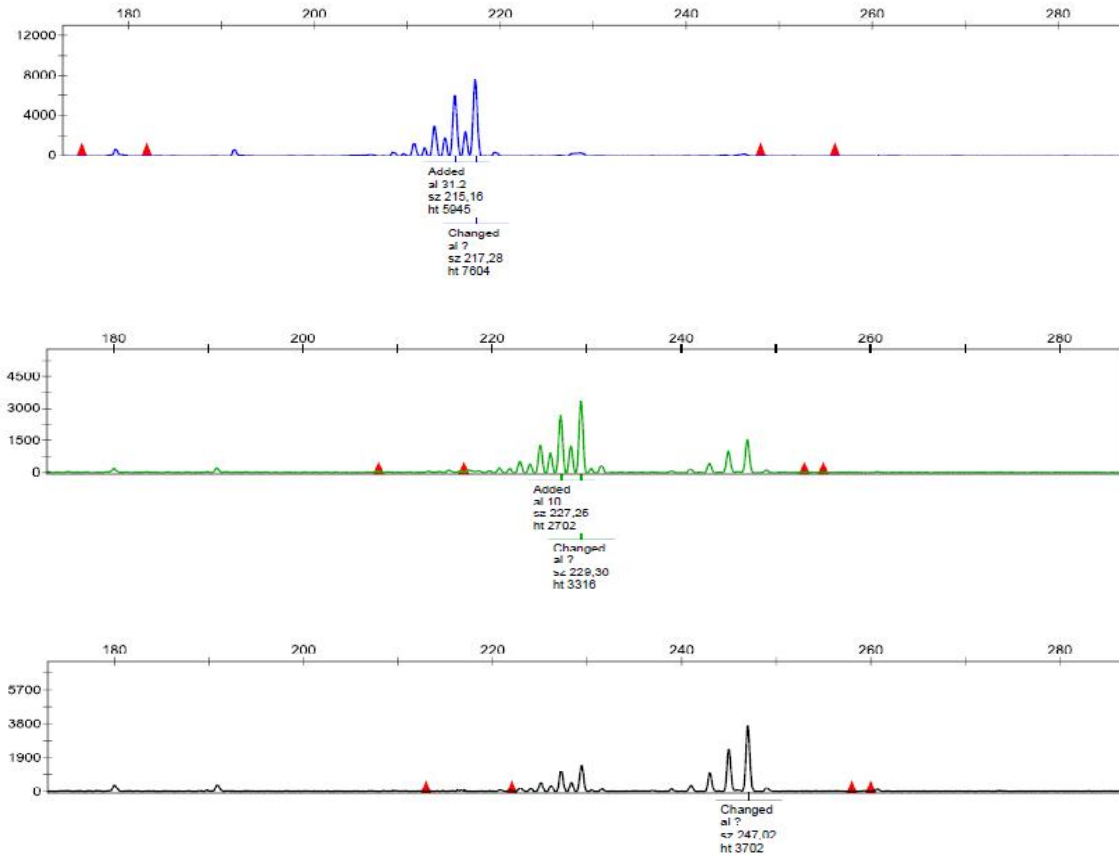
Tabla 4 Valor de densidad óptica, relación A260/A280 y las concentraciones obtenidas para cada muestra

ID/RJV	Relacion 260/280n	ADN (ng/uL)	ID/RF	Relacion 260/280n	ADN (ng/uL)	ID/RJV	Relacion 260/280n	ADN (ng/uL)
8R1H1	2	8	A1M2	1.9	33	1E1M1	2	25
IT2M1	1.9	12	XB2H2	1.6	15	2E1M1	1.7	20
2R2M2	1.8	17	X1M1	2.3	12	1U1M1	2	10
2R2M5	1.7	25	XB1H1	1.7	14	2I2M3	1.9	13
3T2H3	1.7	17	8A2M2	2.2	15	2U1M1	1.8	26

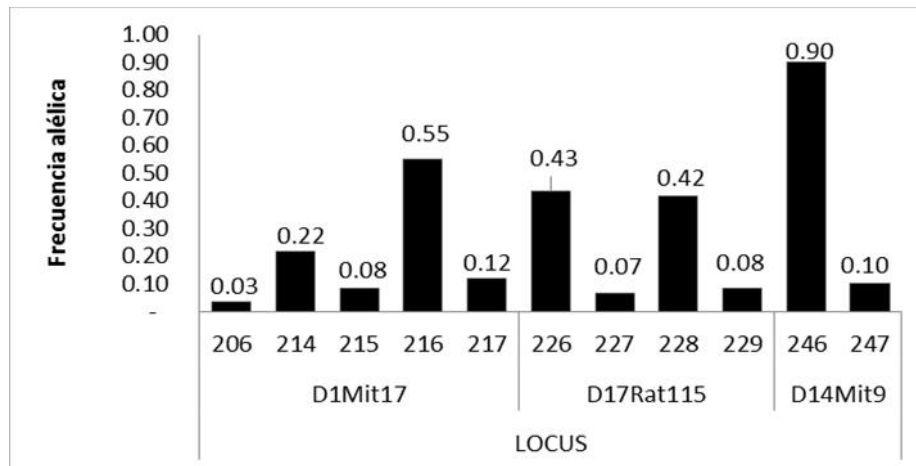
*Electroforesis capilar.* El análisis de las muestras se realizó con el programa GeneMapper, donde se procedió a la identificación de alelos por marcador, en la siguiente figura se observa picos de fluoroforo-

ros azul, verde y amarillo los que representan a los marcadores moleculares usados en estudio al cual denominamos electroferograma:

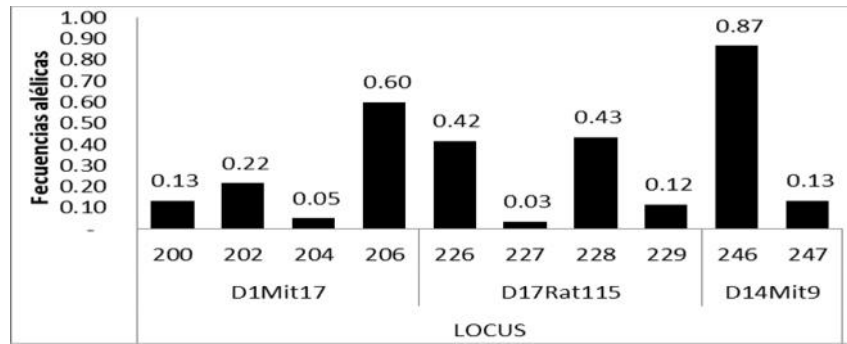
**Figura 4** Electroferograma en el que se observa los resultados obtenidos de un individuo de *Rattus novergicus*, *Sprague-Dawley*, para los locus D1Mit 17, D17Rat1 15 y D14Mit9 marcados con fluorocromos: azul, verde y negro



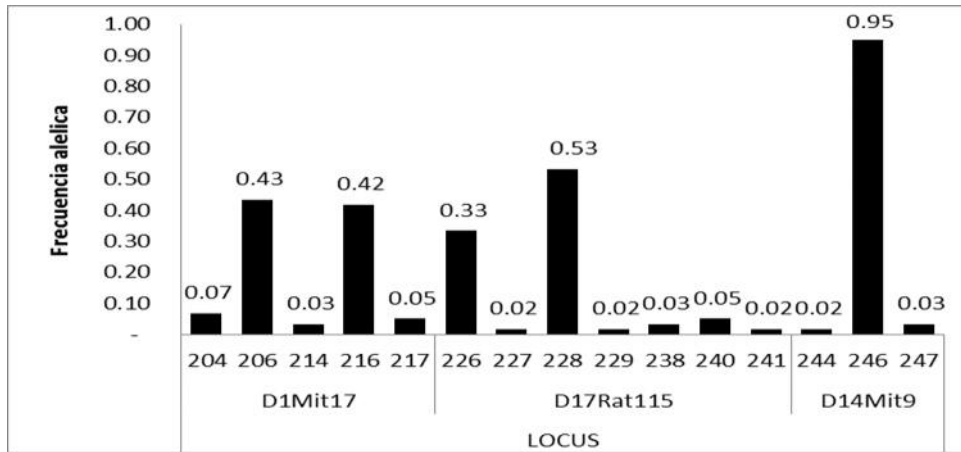
**Figura 5** Frecuencias alélicas de la población RJV (n=30), de los locus D1Mit 17, D17Rat115 y D14Mit9



**Figura 6 Frecuencia alélica de los locus estudiados en la población RF (n=30) de los locus D1Mit17, D17Rat115 y D14Mit9**



**Figura 7 Frecuencias alélicas de la población RCM (n=30) de los locus D1Mit17, D17Rat115 y D14Mit9**



**Figura 8 Frecuencia genotípica de la población RJV (n=30)**

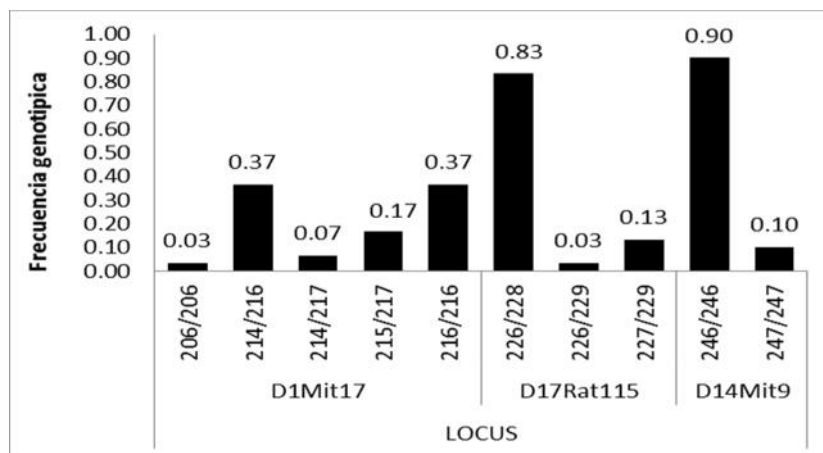




Figura 9 Frecuencia genotípica de la población RF (n=30)

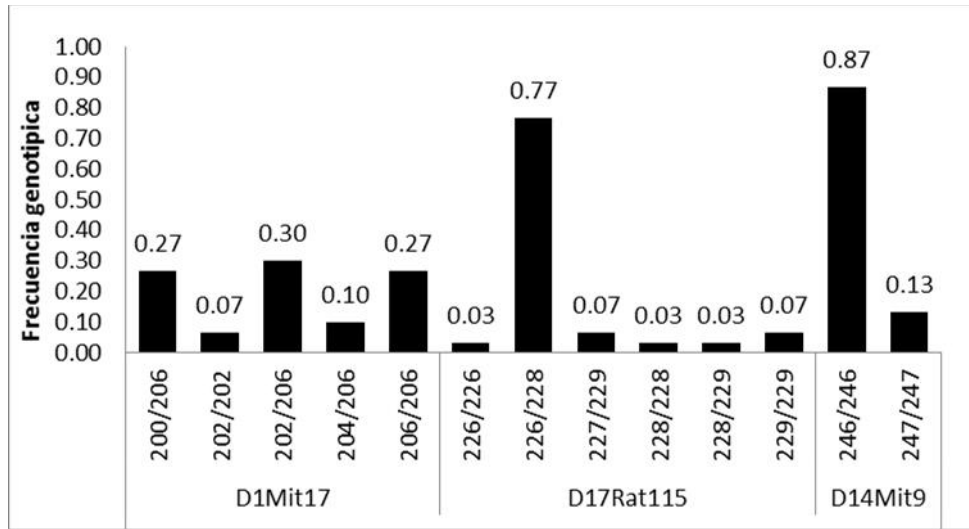


Figura 10 Frecuencia genotípica de la población RCM (n=30)

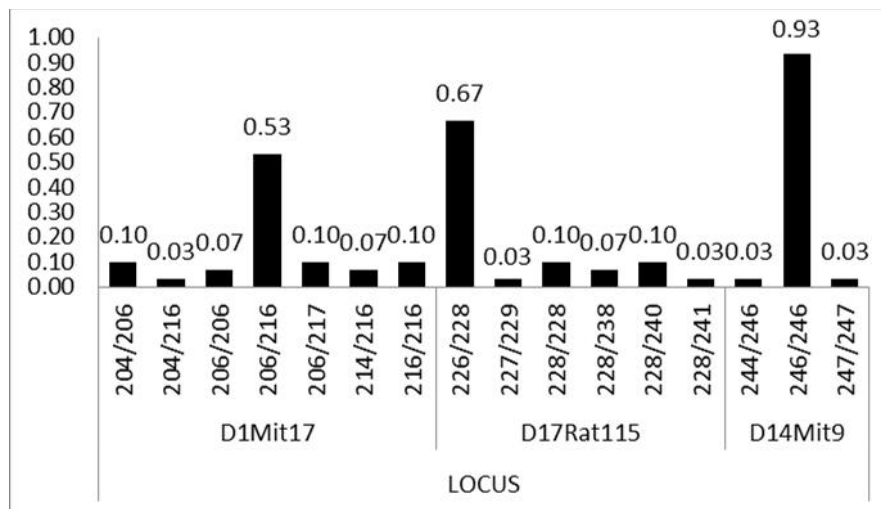


Tabla 5 Estadísticos de variación genética de tres poblaciones de rata (*Rattus-novergicus*) Sprague-Dawley para todos los locus

Población	N° Genotipo	N° Alelos	Diversidad génica	PIC	F
<b>RCM</b>	13	5	0.44	0.40	0.08
<b>RF</b>	11	4	0.48	0.42	0.15
<b>RJV</b>	8	3	0.48	0.43	0.22

PIC: Contenido de Información Polimórfico. F: Coeficiente de Consanguinidad

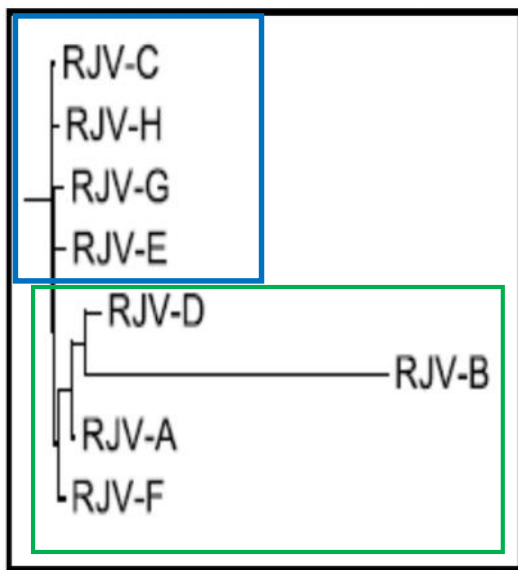
**Tabla 6** Análisis de heterocigosidad para las poblaciones RJV, RF y RCM. K= número de alelos en el locus, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada, PIC= Contenido de información polimórfico

LOCUS	K	RJV		RF		RCM		PIC
		Ho	He	Ho	He	Ho	He	
D1Mit17	5	0.60	0.60	0.66	0.64	0.68	0.65	0.62
D17Rat115	4	0.55	0.50	0.59	0.57	0.60	0.58	0.55
D14Mit9	2	1.00	0.25	1.00	0.30	0.03	0.15	0.16

**Tabla 7** Análisis estadístico intrapoblacional e inter poblacional de tres poblaciones de ratas (*Rattus norvegicus*) Estadísticos F

Estadístico		Valores
FST	Entre poblaciones	0.0972
FIS	Dentro la población (RCM)	0.0991
FIS	Dentro la población (RF32)	0.1424
FIS	Dentro la población (RJV32)	0.1370
FIT	Entre individuos de una misma población (RCM)	0.1867
FIT	Entre individuos de una misma población. (RF)	0.1652
FIT	Entre individuos de una misma población. (RJV32)	0.1724

**Figura 11** Árbol de parentesco construido con la diferenciación genética de Slatkin (1995), Neighbor Joining (NJ) de la población RJV



**Figura 12** Árbol de parentesco construido con la diferenciación genética de Slatkin (1995), Neighbor Joining (NJ) de la población RF

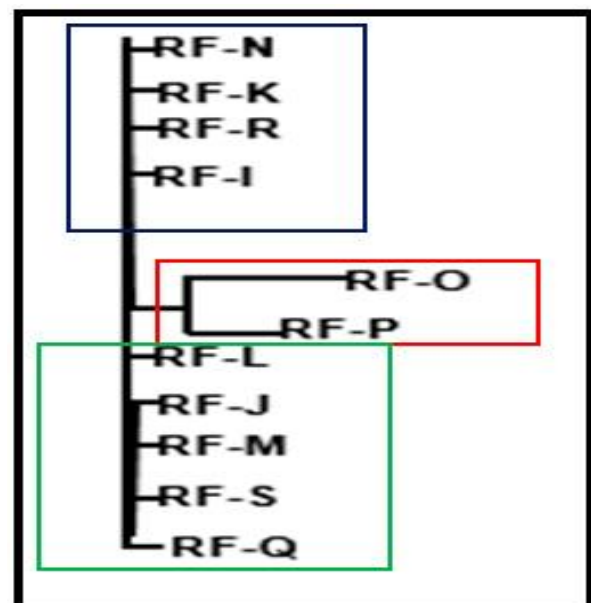


Figura 13 Árbol de parentesco construido a partir de la diferenciación genética de Slatkin (1995), Neighbor Joining (NJ) de la población RCM

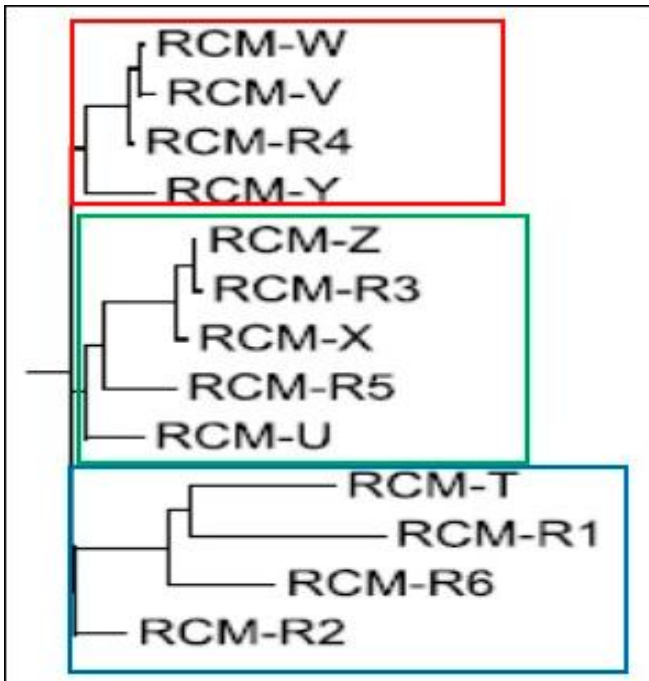
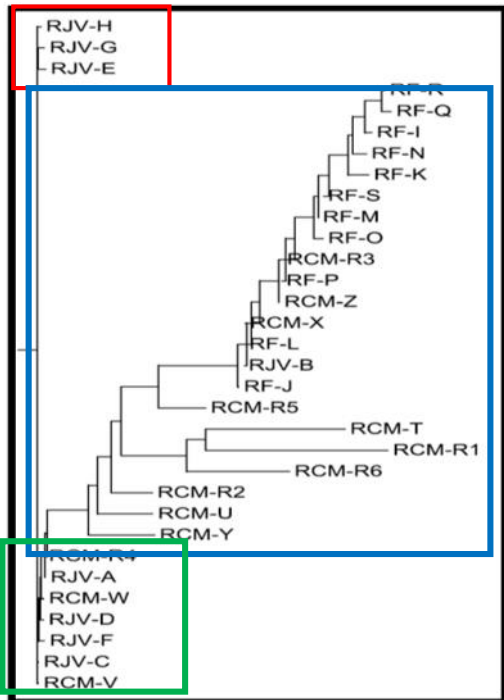


Figura 14 Árbol filogenético construido a partir de la diferenciación genética Slatkin (1995), Neighbor Joining (NJ) de las poblaciones RJV, RF y RCM



**Discusión**

En su inicio los roedores de laboratorio pertenecen a líneas no consanguíneas, caracterizándose por su alto grado de diversidad genética, empero, varias líneas no consanguíneas han sido mantenidas como colonias estrictamente cerradas durante largo tiempo, decreciendo su variabilidad genética (Kloting *et al.* 2003). El manejo reproductivo de las colonias no consanguíneas está dado por el apareamiento casual de los animales mantenidos en la colonia, que hace necesario establecer sistemas de cruce que eviten el aumento de los niveles de consanguinidad en el grupo (De Jesús & Torres 2006). Los sistemas usados intentan, por medio de cruces en rotación, realizar los apareamientos al azar en las poblaciones naturales y, de esta manera, mantener la variabilidad genética dentro de la colonia, entre estos sistemas se encuentran el de Poiley y el de Robertson, el primero, usado para colonias con grandes cantidades de parejas, y el segundo, para colonias con pocas parejas.

La calidad de ADN extraído de 90 individuos de *Rattus novergicus Sprague-Dawley*, se determinó en electroforesis en gel de agarosa y cuantificación espectrofotométrica, figura 2, las bandas definidas con un brillo intenso, resultados similares fueron obtenidos por De Jesús *et al.* 2005, extracción de ADN a partir de tejido auricular en ratones (*Mus músculos*) observando bandas integrales, mencionando obtener ADN, reporta que la presencia de bandas nítidas, corresponde a ADN 50 ng y que a partir de esta concentración puede ser utilizado para el análisis por PCR.

La cuantificación de ADN Tabla 4, se obtuvieron valores calculados de la relación A260/A280 que oscilan entre 1.7 y 2.3 con concentraciones menor o igual a 20 ng/μL, indicando que la pureza de ADN de las muestras es moderadamente bajas por lo que

se puede considerar que no se llegó a realizar una desproteinización completa, probablemente se deba a la cantidad y concentración de Proteinasa K que se utilizó en la extracción (2  $\mu$ L, 1 ng/ $\mu$ L). Sin embargo estos valores están en rangos aceptables, valores por debajo de 1.7 indica presencia excesiva de proteínas y valores por encima de 2.5 de hidratos de carbono, valores inferiores o superiores podrían inhibir la PCR (Ren *et al.* 2000, Lehmann & Kreipe 2001, Coombs *et al.* 1999, Vago *et al.* 2000). La concentración de ADN obtenida fue inferior a 20 ng, podría considerar que factores como: la cantidad de muestra procesada en la extracción (3 mg de tejido), la manipulación de los materiales durante el proceso de extracción, la aplicación de reactivos utilizados entre otros, sin embargo la pureza y concentración obtenida en las muestras no inhibieron la PCR.

*Electroforesis capilar.* El análisis de las muestras se realizó con el programa GeneMapper, donde se procedió a la identificación de alelos por marcador, figura 4 los picos de fluoroforos azul, verde y amarillo representan a marcadores moleculares usados en estudio.

En la figura 4, se observa picos de los microsatélites, también se puede visualizar la presencia de stutters o productos Slippge de la polimerasa (picos pequeños), que llegan a formarse durante la PCR. La formación de stutters puede deberse a la estructura de los microsatélites que presentan tándem de trinucleótidos, si el motivo de repetición es mayor, la probabilidad de encontrar stutters es alta, evento que dificulta la identificación de alelos reales, (individuos heterocigotos cuyos alelos difieren en un número escaso de repetición). Sin embargo la identificación de picos correctos de los microsatélites se caracterizó y distinguieron en base a su morfología y a una escalera alélica.

*Estructura génica y diferenciación intrapoblacional.* Las poblaciones de roedores de laboratorio no consanguíneos se caracterizan por presentar una gran variabilidad genética, muy similar a la población humana, empero con el tiempo muchas de estas poblaciones podrían llegar a disminuir su variabilidad genética a causa de que sean mantenidas como poblaciones estrictamente cerradas durante mucho tiempo (Kloting *et al.* 2003). La información sobre la variabilidad genética de una población puede obtenerse a través de la estimación de parámetros poblacionales, mediante análisis de microsátélites que permiten analizar cuantitativamente los resultados obtenidos en la evaluación genética. El análisis estadístico de las poblaciones RJV, RF y RCM de rata (*Rattus norvegicus*) *Sprague-Dawley*, figura 5, las frecuencias alélicas de la población RJV, donde el locus D1Mit17 presentó 5 alelos, el alelo 216 con una frecuencia de (0.55), y los alelos 206, 214, 215 y 217 presentaron baja frecuencia. El locus D17Rat115 se halló 4 alelos, de estos los, 226 y 228 presentaron frecuencia alta (0.43 y 0.42) en comparación a los alelos 227 y 229 que obtuvieron una frecuencia baja (0.07 y 0.08). Para el locus D14Mit9 se encontró 2 alelos, el 246 presentó la mayor frecuencia (0.90) comparado el 247 que presentó una frecuencia baja de (0.10), estos resultados pueden deberse a que existe fluctuación de alelos, entre los locus D1Mit17 y D17Rat115, en tanto el alelo 246 para el locus D14Mit9 presentó una frecuencia cercana a 1, datos que muestra que probablemente este alelo llegue a fijarse en esta población.

El análisis de frecuencias alélicas para la población RF figura 6, los alelos 206 y 246 del locus D1Mit117 y D14Mit9 presentaron la mayor frecuencia (0.60 y 0.87), posiblemente lleguen a fijarse en la población al presentar frecuencias superior a

0.5, comparado con 204, 227 para los locus D1Mit17 y D17Rat115 con frecuencia baja (0.05 y 0.03), los resultados indican que existe una variación de alelos en la población.

La frecuencia alélica de la población RCM Figura 7, así identificamos en la población los alelo 228 y 246 para los locus D17Rat115 y D14Mit9, presentaron la mayor frecuencia alélica (0.53 y 0.95), indican que probablemente lleguen a fijarse en la población, mientras 214, 227, 229, 241 y 244 para los locus D1Mit17, D17Rat115 y D14Mit9 comparten la menor frecuencia, valores que están entre (0.03 y 0.02), observándose que el locus D17Rat115 presenta el mayor número de alelos (7) comparado a los locus D1Mit17 y D14Mit9. Estos resultados explicarían que en la población existe una mayor fluctuación de alelos a través de las generaciones.

(Metler & Gregg 1972, Suzuki *et al.* 1993) la modificación en la frecuencia de un alelo se denomina “deriva génica”, y puede llegar a fijar fácilmente uno y eliminar el otro al azar, en una sola generación, perdiéndose así toda posibilidad de polimorfismo. Las frecuencias alélicas en las poblaciones muestran fluctuaciones, de hecho podría ser afectado por la “deriva génica” que llevo modificar drásticamente frecuencias alélicas en cada generación de forma al azar. Mettler & Gregg 1972, Suzuki *et al.* 1993. indica que la deriva génica es más frecuente en poblaciones de laboratorio a causa de pocos individuos de cada generación seleccionados para producir la siguiente generación, condición que daría lugar a la pérdida de un alelo y fijarse el alternativo al azar en una sola generación. Es necesario mencionar que la deriva genética en estas poblaciones es inducida por el criador, quien llega a seleccionar los reproductores para una nueva generación, ocasionando cambios en las frecuencias alélicas y genotípicas si no se selecciona individuos que presenten

alta variabilidad genética, además este proceso de selección demuestra que en las poblaciones indirectamente se está dando una selección inducida (cuello de botella). Mettler & Gregg 1972, Suzuki *et al.* 1993, mencionan que los eventos mutacionales son causa para la variación en las frecuencias alélicas, y el modelo de salto mutacional explicaría la distribución de estas, dada a causa del proceso intralélico evento que se da el aumento o disminución del motivo repetitivo a causa del deslizamiento de la enzima ADN polimerasa (replication slippage), este fenómeno sería causa de adición de la unidad de repetición. Considerando esta explicación se consideraría que el alelo con mayor frecuencia en la población se debe a que el número de evento mutacionales no se dio en un periodo fijo de tiempo por tanto no sufrieron cambio durante varios años.

La frecuencia genotípica de la población RJV figura 8, encontró 10 genotipos, del locus D1Mit17 5 genotipos, de estos 3 (214/216, 215/217 y 214/217) revelan heterocigosidad en una proporción de 19 individuos, y 2 genotipos (206/206 y 216/216) presentan homocigosidad en un número de 11 individuos. Para el locus D17Rat115 se encontró 3 genotipos (226/228, 226/229 y 227/229), observándose el mayor número de individuos heterocigotos, comparado al locus D14Mit9 presenta 2 genotipos (246/246 y 247/247) muestran mayor número de individuos homocigotos, al no presentar variación entre ellas. Los resultados explicarían que la probabilidad de hallar los genotipos (226/228 y 246/246) en la población es mayor debido a las frecuencias que estas presentan.

La frecuencia genotípica de la población RF, figura 9, la mayoría de los genotipos corresponden a heterocigotos para esta población, 20 individuos heterocigotos para el locus D1Mit17 y 6 para el locus D17Rat115, mientras el locus D14Mit9 presento 2

genotipos que corresponden a homocigotos con un número de 30 individuos homocigotos. Estos resultados expresan que los locus D1Mit17 y D17Rat115 existe un mayor número de genotipos, la presencia de individuos heterocigotos en la población es alta, en relación al locus D14Mit9 que presentó un número reducido de genotipos. Las frecuencias genotípicas en su mayoría no superan el 50%, excepto para los genotipos (226/228 y 246/246) de los locus D17Rat115 y D14Mit9, lo que significa que la probabilidad de encontrar estos genotipos en la población es baja.

La frecuencia genotípica de la población RCM figura 10, se observa mayor número de genotipos heterocigotos, con un número de 28 individuos heterocigotos para el locus D1Mit17, 29 individuos para D17Rat115 y 1 individuo para D14Mit9, a su vez esto evidencia que los locus D1Mit17 y D17Rat115 son los más polimórficos. Las frecuencias genotípicas en su mayoría no superan el 50% excepto para los genotipos (206/216, 226/228 y 246/246), lo que significa que la probabilidad de hallar estos genotipos en la población es baja debido a la baja frecuencia que presenta.

Una de las principales utilidades de este tipo de marcadores es la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudio es de gran importancia para realizar estimaciones de diversidad genética existente en poblaciones de animales en cautiverio o en peligro de extinción (Takezaki & Nei, 1996).

Los estadísticos de variación genética de tres poblaciones de rata (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley tabla 5, para los locus estudiados, en promedio del número de alelos por población fue de 5 alelos para la población RCM, 4 RF y 3 para RJV, valores que indica un número reducido de alelos presentes en las

poblaciones. La diversidad genética obtenida en las poblaciones fluctúa entre (0.44 y 0.48) resultados que indican número reducido de individuos heterocigotos en las poblaciones. También se observa el valor PIC los cuales proporciona datos de calidad (media-baja) al presentar valores menores a 0.5. Por otro lado el índice de coeficiente de consanguinidad (F) en las poblaciones RJV, RF y RCM presentó valores 0.22, 0.15 y 0.08.

Las poblaciones presentan una disminución de heterocigosidad y un aumento de la homocigosidad tabla 6, resultados que podrían ser consecuencia de varios factores como: la selección inducida, deriva génica, mutación y la consanguinidad, procesos que llevarían a una disminución de la variabilidad genética. Por ejemplo el manejo reproductivo en los bioterios es dado por el criador, selección que no siempre es estrictamente controlado en su totalidad, este evento podría ocasionar cruzamientos entre individuos que mantienen una relación familiar lo que ocasiona el incremento de la consanguinidad en las poblaciones.

También De Jesús *et al.* (2011), indica que en *Rattus norvegicus* Sprague-Dawley, una diversidad baja de 0.37 mencionando que esto puede ser a causa del número reducido de individuos analizados en la población, la consanguinidad es un problema universal que afecta tanto a poblaciones cautivas como silvestres es una fuerza que reduce tanto la eficacia individual como poblacional, ocasionando trastornos genéticos. La consanguinidad es un proceso que reduce la heterocigosis y aumenta la homocigosis, que conlleva a la aparición de defectos genéticos como la infertilidad, crecimiento. La reducción de la heterocigosis se expresa con el coeficiente de consanguinidad "F", que mide la disminución del número de loci heterocigotos después de varias generaciones. Un valor F=0 significa ausen-

cia de consanguinidad y  $F=1$  individuo completamente consanguíneo. Si bien la consanguinidad en las poblaciones es baja, existen diferencias dentro de ellas, siendo la población RJV la más consanguínea en comparación a la población RF y RCM, pero es necesario mencionar que la población RCM es el resultado de los cruzamientos llevados a cabo entre los individuos de las poblaciones RJV y RF a partir del año 2002 considerándose como una población híbrida, razón por lo cual presenta una consanguinidad baja.

Asimismo realizando el análisis de las frecuencias alélicas en relación al equilibrio de H- W, los valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ) para las poblaciones RJV, RF y RCM y los tres locus analizados tabla 6, la heterocigosidad observada es elocuentemente mayor a la esperada en las tres poblaciones, resultado que indica la presencia reducida de individuos heterocigotos en las poblaciones. Los resultados de heterocigosidad,  $H_o$  y  $H_e$  en la población RCM muestra valores de  $H_o$  y  $H_e$  superiores para los locus D1Mit17 (0.68 y 0.65) para D17Rat115 (0.60 y 0.58) en comparación a las poblaciones RJV y RF. Resultados casi similares fueron descritos por De Jesús (2011) quien reporto una heterocigosidad observada y esperada en ratas *Sprague-Dawley* de (0.28 y 0.19) indicando una proporción de heterocigotos bajo. Valores de heterocigosidad observada y esperada en las tres poblaciones para los tres locus mostraron valores bajos, resultados que podría deberse al número de individuos analizados en las poblaciones, por otro lado el número de alelos presentes en los locus podría ser la causa de estos resultados bajos (De Jesús 2011), pues en el locus D14Mit9 únicamente se identificó dos alelos razón por lo cual presento valores de 1, evento no es dado en los locus D1Mit17 y D14Rat115 que se halló un promedio de 4 alelos distri-

buido en toda la población siendo los locus más estables.

La estructura genética de las poblaciones RJV, RF y RCM también fue evaluada a través de los estadísticos F (FIT, FIS y FST) de Wright 1969, tabla 7, la definición de Wright se basa en el coeficiente de endogamia (consanguinidad). Los estadísticos F pueden ser vistos como la correlación entre genes homólogos tomados de un nivel de la subdivisión en relación con cualquier otro nivel superior, el coeficiente de endogamia en una población subdividida FIT entre el componente debido a apareamientos no aleatorios dentro de poblaciones FIS y la subdivisión entre poblaciones FST. Así, la endogamia total tendría un componente generado por la cruza entre parientes dentro de una población FIS y otro por el balance entre deriva génica y flujo FST (Excoffier 2001). En el presente estudio la diferenciación genética FST muestra un valor de 0.09 resultado que como se acerca a 0 revela que existe poca diferencia genética entre las tres poblaciones lo cual se podría considerar que se está estudiando a una sola población ya que las tres poblaciones son de la colonia *Sprague-Dawley*. El índice de fijación FIS para las poblaciones RJV, RF y RCM presenta valores (0.137, 0.142 y 0.099) resultados que se explican como un exceso de individuos homocigotos en un 0.9%; 14% y 13%, asimismo el coeficiente de endogamia FIT para las poblaciones RJV, RF y RCM presentaron valores 0.172, 0.165 y 0.186 resultados que indica un déficit de individuos heterocigotos, en una proporción de 17%, 16%, y 18%. Por tanto los estadísticos F revelan que en las tres poblaciones existe un déficit de heterocigotos y un exceso de homocigotos en una mínima proporción, es decir que la frecuencia de heterocigotos se está reduciendo mientras que la de los homocigotos aumenta tras sucesivas generaciones. La consanguinidad se origi-

na en las poblaciones como consecuencia de mecanismos que actúan sobre el sistema reproductivo o por la reducción del tamaño poblacional. Al reducirse el tamaño poblacional los apareamientos se producen entre individuos emparentados Mettler & Gregg 1972, Suzuki *et al.* 1993. A su vez evidencia un desequilibrio de Hardy Weinberg, al presentar un déficit de individuos heterocigotos, la ley de equilibrio de H-W indica que una población se encuentra en equilibrio cuando: la población es grande, la reproducción ocurre al azar, y no están sometidas a la migración y mutación, bajo estas condiciones las frecuencias alélicas y génicas permanecen constantes de generación en generación. Así pues la condiciones del equilibrio de H-W no son dados en las poblaciones RJV, RF y RCM por lo que dichas poblaciones no se encuentra en equilibrio.

El cálculo de las distancias genética mide el grado de diferenciación existe entre poblaciones de una misma especie. Las distancias genéticas son estimadores del tiempo de separación entre poblaciones y se basan en ciertas diferencias genéticas existente dentro y entre poblaciones, algunas de ellas esta enfocadas a los cambios en las frecuencias génicas, otras incorporan el proceso mutacional microsátélites.

Los arboles de parentesco de las poblaciones RJV, RF y RCM se construyeron en base a los locus D1Mit17, D17Rat115 y D14Mit9, de acuerdo a la diferenciación genética de Stalkin (1994) y con el método de agrupamiento de Neighbor Joining (NJ).

El árbol de parentesco de la población RJV figura 11, presente 8 genotipos en dos clados, el primero presenta genotipos (C, H, G y E) diferentes, que evolucionaron al mismo tiempo, el segundo clado presenta genotipos que presentan una similitud, explicándose que el genotipo RJV-F dio origen al genotipo RJV-A y así mutuamente. También se

observa que el genotipo RJV-B es el que recientemente apareció en la población, que descendió del genotipo RJV-A. De acuerdo al árbol observado en la población, se explicaría que los genotipos C, H, G y E son los que mejor se han conservado y provienen de un mismo linaje.

El árbol de parentesco de la población RF figura 12, en esta población se encontró 11 genotipos, llegan a formar tres clados, el primer clado la agrupación de los genotipos (S, M, Q, J y L), el segundo clado los genotipos (O y P) presentan una similitud genética, en donde el genotipo RF-R dio origen a los dos otros genotipos. En el tercer clado están los genotipos (K, N, R e I) estos cuatro genotipos son los que mejor se han conservado en la población. La proporción de genotipos homocigotos para esta población es alto en comparación de los genotipos heterocigotos. Estos resultados probablemente se deban a que esta población presenta un mayor número de individuos homocigotos, por lo que la similitud genética que presentan es mayor.

En la población RCM se encontró 13 genotipos, llegan a formar tres clados grandes y dentro de ellas a otros subclados (Figura 13). Claramente se puede visualizar que existe una similitud entre los genotipos, agrupados en los tres clados, existiendo un parecido genético entre los genotipos, también se puede observar que el genotipo R1 es el que recientemente apareció en la población al presentar una distancia superior en comparación de los demás genotipos.

El numero de genotipos total encontrado en las tres poblaciones de rata (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley fue de 32 Figura 14, observandose la agrupacion de tres clados, los genotipos (H, G y E), llegan a agruparse en un solo clado (color rojo) demostrando que entre estos genotipos no existe diferencia genética, similar evento es dado en la



agrupación de los genotipos del tercer clado (color verde), y en el segundo clado se observa una variación de genotipos conformado por las tres poblaciones. Los genotipos de la población RF (O,M,S,P,Q N,I y R) son los más diferentes en toda la población, esto podría deberse a que esta población se encuentra en constantes cruzamientos por lo que la probabilidad de encontrar nuevos genotipos es mayor, al ser la población frecuentemente más preferida para las investigaciones su manejo reproductivo es más acelerado (Benavides & Guenet 2003). También se puede observar que entre los genotipos de las poblaciones RJV y RCM existe poca diferenciación genética lo cual podría suponerse a que estas dos poblaciones descendieron de un mismo linaje.

### Conflictos de intereses

Esta investigación fue realizada en el Centro de Investigación Genética (CinGen) del Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Universidad Policial (IITCUP) y no presenta conflictos de interés.

### Agradecimientos

Esta investigación se logró con el apoyo del Centro de Investigación Genética (CinGen) del Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Universidad Policial (IITCUP) y la Carrera de Ingeniería Zootécnica de la Universidad Católica Boliviana San Pablo de la Unidad Académica Campesina Tiahuanaco, La Paz-Bolivia.

### Literatura citada

- Benavides F, Guénet J. Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. Universidad de Alcalá. Madrid. 2003. p. 215.
- Benavides F, Guenet JL. Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. Universidad de Alcalá. Madrid. 2003. p. 312.
- Benson VL, McMahon AC, Lowe HC, Khachigian LM. The streptozotocin-treated Sprague-Dawley rat: a useful model for the assessment of acute and chronic effects of myocardial ischaemia reperfusion injury in experimental diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2007; 4(2): 153-4.
- Chia R, Achilli F, Festing MF, Fisher EM. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat Genet.* 2005; 37(11): 1181-6.
- Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue". *Nucl Acids Res.* 1999; 27(16): e12.
- Davidson EP, Coppey LJ, Calcutt NA, Oltman CL, Yorek MA. Diet-induced obesity in Sprague-Dawley rats causes microvascular and neural dysfunction. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010; 26(4): 306-18.
- De Jesús R, Moreno N, Martínez JA. Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usado en el control genético de ratones consanguíneos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Rev. Cient. (Maracaibo),* 2005; 15(2); 134-40.
- De Jesús R, Rodríguez N, Torres W, Moreno Y, O'Callaghan J. Uso de marcadores moleculares microsatélites para determinar condición de homocigosis y heterocigosis en roedores pro-

- ducidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes, Venezuela. *AIA*. 2011; 15(2): 45-63.
- De Jesus R, Torres E. Evaluación de factores de reproducción para detectar posible contaminación genética en cepas consanguíneas de ratones. *J Bol Mal Salud Amb*. 2006; 46(2): 161-8.
- Excoffier L. Analysis of population subdivision. In: *Handbook of Statistical Genetics* (eds. Balding DJ, Bishop M, Cannings C) 2001. p. 271-307. John Wiley and Sons, Chichester UK.
- Festing MF. Reduction in animal use in the production and testing of biologicals. *Dev Biol Stand*. 1999; 101: 195-200.
- Fox JG, Anderson LC, Lowe FM, Quimby FW. *Laboratory Animal Medicine*, 2nd ed. Academic Press, New York, NY, 2002. p. 1256.
- Hopper JL. Opportunities and handicaps of antipodean scientists: A. J. Nicholson and V. A. Bailey on the balance of animal populations. *Hist Rec Aust Sci*. 1987; 7(2): 179-88.
- Hubrecht RC, Kirkwood J. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. 8th ed. Wiley-Blackwell; 2010.
- Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res*. 2007; 74(1): 29-38.
- Kloting I, Nitschke C, Brandt V. Impact of genetic profiles on experimental studies: outbred versus wild rats. *Toxicol Appl Pharm*. 2003; 189: 68-71.
- Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*. 2001; 25(4): 409-18.
- Levin BE, Dunn-Meynell AA, Balkan B, Keeseey RE. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol*. 1997; 273:R725-R730.
- Liu J, Muse SV. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*. 2005; 21(9): 2128-9.
- Liu YH, Yang XP, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol*. 1997; 272: H722-7.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LE, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol*. 1998; 7(5): 639-55.
- Melby EC, Balk MW. The importance of laboratory animal genetics, health and the environment in Biomedical Research. Editorial Academic Press, New York. 1983. p. 135.
- Mettler L, Gregg T. *Genética de las poblaciones y evolución*. Editorial Hispano-Americana. Distrito Federal. México. 1972. p. 350.
- Miller SA, Dykes DD, Polsky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 1215.
- Naaijken BA, van Dijk A, Meinster E, Kramer K, Kamp O, Krijnen PA, et al. Wistar rats from different suppliers have a different response in an acute myocardial infarction model. *Res Vet Sci*. 2014; 96(2): 377-9.
- Page RD. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*. 1996; 12(4): 357-8.
- Ren ZP, Sällström J, Sundström C, Nister M, Olsson Y. Recovering DNA and optimizing PCR conditions from microdissected formalin-fixed

- and paraffin-embedded material. *Pathobiology*. 2000; 68(4-5): 215-7.
- Roomi MW, Roomi NW, Ivanov V, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Modulation of N-methyl-N-nitrosourea induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats by combination of lysine, proline, arginine, ascorbic acid and green tea extract. *Breast Cancer Res*. 2005; 7(3): R291-5.
- Serikawa T, Kuramoto T, Hilbert P, Mori M, Yamada J, Dubay C, et al. Rat Gene Mapping Using PCR-Analyzed Microsatellites. *Genetics*. 1992; 131: 701-21.
- Shpilberg Y, Beaudry JL, D'Souza A, Campbell JE, Peckett A, Riddell MC. A rodent model of rapid-onset diabetes induced by glucocorticoids and high-fat feeding. *Dis Model Mech*. 2012; 5(5): 671-80.
- Slatkin M. Gene flow and population structure. In *Ecological Genetics*, Editado por L. Real. Princeton. 1994. p. 3-17.
- Suzuki D, Griffiths A, Miller J, Lewontin R. Introducción al análisis genético. Interamericana. McGraw-Hill. Cartagena. Madrid. 1993. p. 267.
- Takezaki N, Nei M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. 1996; 144(1): 389-99.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila-Reis D, Macedo AM, Adad SJ, et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly tissues of patients with chronic Chagas disease. Differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Patho*. 2000; 156(5): 1805-9.
- Vallender EJ, Miller GM. Nonhuman primate models in the genomic era: a paradigm shift. *ILAR J*. 2013; 54(2): 154-65.
- White WJ, Lee CS. The Development and Maintenance of the Crl: CD (SD) IGS BR Rat Breeding System. CD (SD) IGS Charles River Laboratories Publications. 1998. p. 8-14.
- Wright S. Evolution and the genetics of populations. Vol. 2. The theory of gene frequencies. Chicago, London: University of Chicago Press; 1969. p. 201.
- Zhang F, Ye C, Li G, Ding W, Zhou W, Zhu H, et al. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. *Exp Anim*. 2003; 52(5): 401-7.
-