



Avances en Investigación Agropecuaria

ISSN: 0188-7890

revaia@ucol.mx

Universidad de Colima

México

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 producidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes, Venezuela
Avances en Investigación Agropecuaria, vol. 15, núm. 2, 2011, pp. 45-63
Universidad de Colima
Colima, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83719236004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Uso de marcadores moleculares microsatélites para determinar condición de homocigosis y heterocigosis en roedores producidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes, Venezuela

Use of molecular scoreboards microsatellites to determine condition
of homocigosis and heterocigosis in rodents produced in the Bioterio
of the University of Los Andes, Venezuela

De Jesús, R.;* **Rodríguez, N.;** **Torres, W.;**
Moreno, Y. y O'Callaghan, J.

Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA),
Mérida, Venezuela. Código postal 5101.

*Correspondencia: rosadej@ula.ve

Resumen

Los animales de laboratorio no consanguíneos, producidos en los bioterios para la investigación, tienen una alta probabilidad de incrementar su consanguinidad; así como los animales consanguíneos, tienen una alta probabilidad de alterar su homocigosis por la introgresión de genes que no corresponden al genoma de los mismos. El presente estudio tuvo como objetivo analizar marcadores moleculares microsatélites del adn extraído de ratones pertenecientes a las colonias de ratones BALB/C//BIOULA, C57BL/6//BIOULA y de ratas BIOULA: Sprague-Dawley, producidas en el Bioterio de la Universidad de Los Andes- Mérida (Venezuela), las cuales se han mantenido durante 16 años (32 generaciones) sucesivos e ininterrumpidos, usando apareamientos hermanos con hermanas en los ratones y empleando el sistema de Robertson en las ratas. Los productos de amplificación de los 14 microsatélites usados en el análisis del adn de los ratones presentaron una

Abstract

The outbred animals of laboratory, produced in the laboratory animals facilities for the investigation have a high probability of increasing his consanguinity, as well as the inbred animals, have a high probability of altering his homocigosis by the introgression of genes that do not correspond to the genome of the same ones. The present study had as aim analyze scoreboards molecular microsatellites of the dna extracted from mice belonging to the colonies of mice BALB/C//BIOULA, C57BL/6//BIOULA and of rates BIOULA: Sprague-Dawley, produced in the Bioterio of the University of The Andes - Merida – Venezuela. Which have been kept for 16 years (32 generations) successive and uninterrupted using matchings brothers with sisters in the mice and using Robertson's system in the rats. The amplification products of 14 microsatellites used in the analysis of the dna of the mice presented an alone fiber and they coincided with quantity

sola hebra y coincidieron en cantidad de pares de bases a lo reportado en la base de datos de The Jackson Laboratory, indicando que conservan su condición de homocigosis e isogenicidad. Los productos de amplificación de los siete microsatélites analizados para el adn de las ratas presentaron sólo en cuatro microsatélites la condición de doble hebra; lo cual, para el total de 32 animales analizados, representa una heterocigosis disminuida de $0,157 \pm 0,214$ sd, con un bajo polimorfismo génico, revelado en el análisis estadístico realizado con el programa PopGen32. El estudio efectuado permitió verificar la condición genética de los animales producidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes-Mérida (Venezuela).

Palabras clave

Consanguinidad, homocigosis, heterocigosis, bioterios, genética.

of base couples to brought The Jackson's Laboratory database, indicating that preserve his condition of homocigosis and isogenicidad. The amplification products of 7 microsatellites analyzed for the dna of the rats presented only in 4 microsatellites, the condition of double fiber which in the total of 32 analyzed animals that represents a diminished heterocigosis of $0,157 \pm 0,214$ sd, with a low polymorphism genetic, revealed in the statistical analysis realized with the program PopGen32. The realized study allowed to check the genetic condition of the animals produced in the bioterio of the University of The Andes - Merida, Venezuela.

Key words

Consanguinity, homocigosis, heterocigosis, animals facilities, genetic.

Introducción

La condición del animal usado para la investigación se determina por sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas o cualquier otra cualidad que defina su fenotipo, el cual es el resultado de la interacción entre su genotipo y el ambiente. Por tanto, dado que el ambiente de los bioterios debe estar rigurosamente controlado, tales características derivan principalmente de su patrimonio genético, por lo que el control y la preservación de la calidad genética del animal de laboratorio deben ser prioritarios (Melloy y Balk, 1993). En los últimos 30 años, se han publicado casos de líneas y 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 y Guénet, 2003). De manera que es necesario establecer controles genéticos y fenotípicos de los ratones y las ratas utilizadas en la experimentación, para garantizar que los resultados obtenidos en ésta sean reproducibles y tengan importancia científica.

Con relación al control genético, se debe tener presente que los roedores de laboratorio no consanguíneos deben mantener un coeficiente de consanguinidad en un nivel bajo (menor al 1% cada cuatro generaciones); es decir, los animales deben presentar un alto grado de heterocigosis no definido que se relacione con una elevada variabilidad genética (Festing, 1992; 1993; Berry y Cutler, 2007).

En los bioterios de producción de animales de laboratorio, sin embargo, con el tiempo puede ocurrir algún incremento en su consanguinidad, debido a que estos grupos son mantenidos como colonias cerradas por largos periodos de tiempo, pudiendo conllevar a una variabilidad genética disminuida (Benavides y Guénet, 2003; De Jesús, 2003; Fes-

ting, 1993). Situación contraria puede ocurrir con los roedores de las colonias consanguíneas, los cuales, por errores generalmente técnicos, pueden llegar a ser genéticamente heterocigotos.

La condición genética de los animales de laboratorio tiene un importante efecto en los resultados experimentales; a pesar de esto, el análisis genético de las líneas no consanguíneas generalmente está ausente en los bioterios (Shang *et al.*, 2009); no así para los roedores consanguíneos (Benavides *et al.*, 2001).

En los bioterios, los ratones y las ratas se reproducen siguiendo esquemas de apareamientos determinados. Los ratones denominados consanguíneos se reproducen realizando apareamientos hermanos por hermanas durante 20 generaciones, teniendo origen en una sola pareja de fundación logrando, de esta manera, que exista un 99% de homocigosis en los individuos de la colonia, y de un 99% de isogenicidad entre los individuos que forman la colonia (Benavides y Guénet, 2003); de esta manera, el investigador que utiliza animales consanguíneos tiene la probabilidad de investigar en una genética definida. Cuando se reproducen los ratones o ratas no consanguíneos se utilizan diferentes esquemas de forma de mantener una alta variabilidad genética en éstos. Se trata del esquema de reproducción de Robertson (Wang, 1997).

Distintas técnicas han sido utilizadas para comprobar la condición de homocigosis y heterocigosis de los roedores utilizados para la investigación, desde las que evalúan solamente condiciones fenotípicas hasta las que valoran el genoma de los mismos (De Jesús, 2003). En el presente estudio, se utilizó el análisis directo del ADN mediante la detección de marcadores moleculares microsatélites, usando la PCR y observando los productos de amplificación, en geles de agarosa 2.5% (Love *et al.*, 1990; Gibbs, 1990). Los polimorfismos microsatélites se derivan, principalmente, de la variabilidad en la longitud de la secuencia primaria, la cual se evidencia por la presencia de varios alelos (Hans, 2004; Serikawa *et al.*, 2006); este análisis representa una herramienta valiosa en la valoración genética de los roedores de laboratorio.

El análisis efectuado, en el caso de las líneas de ratas no consanguíneas, se fundamenta primero en la existencia de procesos que ocasionan cambios en la composición genética de éstas (Hartl, 2001); y segundo, en que aunque no está claro cuánta es la extensión de la variabilidad genética que puede ser esperada para un *stock* no consanguíneo (Kloting *et al.*, 2003); sin embargo, se debe tener en cuenta que una media de 0.5724 de heterocigosis implica que existe abundante variación genética en la población de ratones Kumming (Shang *et al.*, 2009).

Con respecto a la existencia de procesos dentro de las colonias de animales que cambian la composición genética de éstas, se pueden considerar: la deriva genética (modificaciones al azar de las frecuencias alélicas), la cual se presenta en los bioterios debido a que, generalmente, se escoge un número pequeño de animales para ser utilizado en la formación de las nuevas parejas reproductoras dentro de los núcleos de fundación, y que no poseen una muestra representativa de los genes de sus ascendientes (Metler y Gregg, 1972; Suzuki *et al.*, 1993).

El segundo proceso es la selección, práctica común en los bioterios, debido a la elección, según las características de los reproductores de una generación para dar lugar a la siguiente; en este caso, los efectos de la selección dependerán del nivel de variación genética de la población y de los individuos seleccionados (Zúñiga *et al.*, 2001).

El tercer proceso es la consanguinidad, la cual conduce al aumento de *loci* homocigotos, ocasionando una reducción en la heterocigosis, que conlleva a la disminución de la variabilidad genética, y a la aparición de un descenso en las aptitudes biológicas de la colonia; tales como: la fertilidad, el ritmo de crecimiento y la viabilidad, entre otras (Zúñiga *et al.*, 2001).

El cuarto y último proceso puede afectar la composición genética de los roedores de laboratorio no consanguíneos, es la mutación; la misma puede fijarse o no, dependiendo de si la misma ocurre en un animal que es reproductor. Además, pueden ser contraselectivas; por ejemplo, aquellas que causan infertilidad (White y Lee, 1998).

En el caso de las líneas consanguíneas, la genética puede ser alterada por las mutaciones, por la deriva genética, y también pueden ser afectadas por la introgresión de genes de otros roedores (como los roedores no consanguíneos), conllevando a perder la condición de homocigosis de los animales.

Debido a los procesos antes señalados, los cuales tienen influencia sobre la composición genética de los roedores de laboratorio, se planteó realizar la evaluación molecular mediante el análisis de marcadores moleculares microsatélites de la homocigosis de ratones BALB/C//BIOULA, C57BL/6//BIOULA y de la heterocigosis de ratas BIOULA: Sprague-Dawley, del Bioterio de la Universidad de Los Andes-Venezuela, con la finalidad de evaluar la condición genética de los animales que se producen en éste.

Materiales y métodos

Animales

Se realizó la extracción del ADN genómico del total de ratas (32 ejemplares) que conforman para el momento del estudio el núcleo de fundación de la colonia no consanguínea BIOULA: Sprague Dawley, y de las cuatro parejas que conforman el núcleo de fundación de las cepas BALB/c//BIOULA y de la C57BL/6//BIOULA, producidas en el Bioterio de la Universidad de Los Andes, de Mérida (Venezuela).

Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó del tejido de oreja del ratón (*Mus musculus*) y de la rata (*Rattus norvegicus*), mediante digestión del tejido con ananasa (20 mg/ml) (González *et al.*, 2011), para lo cual se limpió y esterilizó el material de trabajo; se higienizó cada oreja de los ratones y ratas a usar, con alcohol al 70%, para desinfectar y evitar contaminaciones futuras. Se tomaron fragmentos de la oreja, de $\sim 2 \times 2$ mm, de cuatro de los ratones del núcleo de fundación de la cepa consanguínea C57BL/6//BIOU y de las 32 ratas (16 machos y 16 hembras) pertenecientes al núcleo de fundación de la línea *Sprague*

Dawley, en tubos eppendorf estériles, con 500 μ L de la solución 1 (Buffer TE; NaCl (Riedel-Haën) 0,4 M) pH 8.2.

La solución de lavado fue descartada adicionando, posteriormente, 400 μ L de solución 1, más 40 μ L de SDS (Sigma) al 10% y 8 μ L de Bromelina 20 mg/mL). Las muestras fueron incubadas en estufa Fabricante: Memmert (Alemania, modelo 255111), a 37°C durante dos horas; transcurrido este periodo de tiempo, la temperatura de la estufa fue aumentada a 65°C durante 15 minutos más, con la finalidad de inactivar la enzima. Luego, se agregaron 300 μ L de NaCl (Riedel-Haën) 6M, agitando seguidamente por inversión, hasta observar la homogenización de la solución.

Las muestras fueron centrifugadas en frío durante 30 minutos a 12.000g en centrifuga marca KHT modelo 420B-Taiwán. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y estériles, adicionando 1 volumen de isopropanol (Merck), mezclando por inversión. Las muestras se dejaron durante 12-18 horas a 4°C en una nevera convencional de 287 L. marca: Mabe-Colombia. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 12.000g en frío durante 30 minutos.

Finalmente, el precipitado fue recuperado y resuspendido en 100 μ L de agua ultrapura. Las muestras de ADN se re-precipitaron, adicionándole 50 μ L de NaCl (Riedel-Haën) 0,3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (Merck); se dejaron a -20°C (congelador vertical FE22, -17°C, marca Electrolux-Venezuela), durante 12 horas; seguidamente se centrifugó durante 10 minutos a 12.000g, y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 70% frío, secado en estufa, con rangos de temperatura de 0 -200°C-capacidad 53 Lts a 37°C, resuspendido y almacenado en 100 μ L de agua ultrapura.

Para la estimación de la concentración del ADN genómico obtenido se realizó una dilución del ADN en agua para, posteriormente, realizar las medidas de absorbencia a 260 y 280 nm, en un espectrofotómetro (Jenway, modelo 6305 UV/Vis-Reino Unido).

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis (BIO-RAD wide mini-subcell GT-Italia) en geles de agarosa (Agarose D-1 LE CQT \times 100g., Scientific Trade Corp Miami-EUA); para ello, se prepararon geles de agarosa al 0,9% en buffer TBE 0,5X, pH 8,2, empleándose como marcador de peso *Hind* III (Invitrogen) y revelado con bromuro de etidio (PROMEGA). La electroforesis en agarosa fue realizada a 90 Voltios (fuente de poder: BIO-RAD powerPac Basic™ -EUA) durante 60 minutos, y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV de 254 nm (BIO-RAD transilluminator UV 2000-EUA). El registro fotográfico se efectuó con una cámara digital (Sony Cyber-shot, modelo DSC-W100, 8.1 megapixels-Brasil), dotado de un filtro (#15 orange 40,5 mm-EUA).

Microsatélites

Para el análisis del ADN de la línea BIOULA: Sprague Dawley, la selección de los microsatélites y la secuencia de los oligonucleótidos iniciadores, se realizó de acuerdo a los resultados obtenidos por Serikawa *et al.* (1992); estos investigadores realizaron el mapeo genético de rata mediante marcadores moleculares microsatélites (cuadro 1). De manera que se seleccionaron cinco de los microsatélites que mostraron mayor polimorfismo gené-

tico: *R-12*, *R-43*, *R-99*, *R-119* y *R-145*. La selección de los microsatélites *D1Mit10* y *D1Mit17* se realizó de acuerdo a la información que se encuentra en la dirección *web* siguiente: <http://rgd.mcw.edu> (Rat Genome Database).

Cuadro 1

Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para el análisis de los microsatélites de rata.

Microsatélites	Oligonucleotidos iniciadores
R-12	Forward: 5'- GAGATAGTTCAGAAGCCCATG-3' Reverse: 5'- AGGGAGTGGCAGCATTTAG- 3'
R-43	Forward: AAGCATAGCAGTGAATTGGTG-3' Reverse: 5'- TTCATCATCCTTTCATAAAGGC- 3'
R-99	Forward- 5'- GCCCTATGTCTGAGTGTTC- 3' Reverse- 5'- CTAGGTGAAGTGACAGGCCA- 3'
R-199	Forward- 5'- CAAGGACTGAGTGCATGCTC- 3' Reverse- 5'- TTCTCTCTTGCTAGCTGCCA- 3'
R-145	Forward- 5'- AGGAAATGGGTTTCAGTTCC- 3' Reverse- 5'- CAGGATTCTGTGGCAATCTG- 3'
R103	Forward- 5'-CATTTCTGAAACGTTGTTTCCTC - 3' Reverse-5'- AGGAAATTAAGAGAAGTTGGGACT- 3'
D1Mit17	Forward- 5'-GTGTATGTATGCGTGCGTGC- 3' Reverse- 5'- TGGAAAGGGTGGAGACAAATG- 3'

Para el análisis del ADN de las cepas de ratones C57BL/6//BIOULA y BALB///BIOULAC: la selección de los 14 microsatélites (cuadro 2) usados y la secuencia de los oligonucleótidos iniciadores; para el análisis del ADN se realizó, de acuerdo al listado de loci de ratón (que se encuentra en la dirección *web*: <http://www.informatics.jax.org>); los mismos se seleccionaron de acuerdo al polimorfismo presentado entre cepas y la ubicación en distintas cromosomas.

Análisis del ADN

El análisis del ADN se llevó a cabo mediante el ensayo de la PCR; la mezcla para PCR se preparó conteniendo 100 ng de ADN con volumen final de 50 μ l, adicionando a cada tubo los siguientes reactivos: mezcla de dNTP (250 μ M); MgCl₂ (1,5 mM); par de oligonucleótidos iniciadores (0,5 μ M para el análisis del ADN de rata y 0,3 μ M para el ADN de ratón); 1 U/ μ l de Taq DNA polimerasa, buffer 1X y agua calidad ultrapura para completar el volumen final de 50 μ l. La amplificación fue realizada en termociclador Ge-

neAmp PCR System 2400, empleando las siguientes condiciones: 4 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, 35 ciclos a 95°C durante 45 segundos; 47.5°C, 49.7°C, 50.3°C, 52.3°C, 54.4°C durante 45 segundos (dependiendo del oligonucleotido iniciador usado); 72°C durante 30 segundos y un ciclo de elongación final a 72°C durante 4 minutos. Los oligonucleótidos iniciadores utilizados en el ensayo fueron adquiridos a través de Eurofins MGW Operon. El tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR fue evaluado por electroforesis en geles de agarosa al 2.5% en buffer TBE 1X pH 8,2 y revelados con bromuro de etidio (PROMEGA). La escalera de peso molecular utilizada fue X174RF/*Hae* III (Life Technologies). Las muestras fueron corridas a 110 V (fuente de poder: BIO-RAD powerPac Basic™, EUA) durante 70 minutos y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV de 254 nm (BIO-RAD transilluminator 2000-EUA). El registro fotográfico se efectuó con una cámara digital Sony Cyber-shot, modelo DSC-W100, 8.1 megapixels (Brasil), dotado de un filtro (#15 orange 40,5 mm- EUA).

Cuadro 2

Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para el análisis de los microsatélites de ratón.

Microsatélites	Oligonucleotidos iniciadores
D1Mit14	forward: GCCAGACAGGGCTACATTGT reverse: AGACTGAACTCTGCCTCCA
D1Mit17	forward: GTGTCTGCCTTTGCACCTTT reverse: CTGCTGTCTTTCCATCCACA
D5Mit254	forward: GTGCAGGCCTGAATTGAAAT reverse: CAAAGTGCCTGTGCATGTG
D6Mit160	forward: AAGAGGACAGGCTAGTCTCGG reverse: AGCAAAGCTGAAAAGAAAGGG
D8Mit46	forward GCCTGGGCTACATGAGACTC reverse GGAATTCCAATACTAAAGGG
D10Mit10	forward: CCAGTCTCAAAACAACAACAAC reverse: TTGCACCTAGATTGCCTGA
D10Mit123	forward: AAAGTGGATGCAAAGGAAAGG reverse: GTTGATCTAATGGATCTTGACA
D11Mit2	forward: TCCCAGAGGTCTCCAAGACA reverse: CCACAGTGTGTGATGTCTTC
D11Mit31	forward: GCCTGAATTCACATGGTGG reverse: AGAATAAGTAAACCCAGCTGCG

El cuadro continúa en la siguiente página.

Continúa cuadro 2

D13Mit13	forward: CTGTGGTAAGTCCAGATTTG reverse: GGAAAGAGTAGGAAGATGCC
D13Mit99	forward: CAACAGGCAGATTTGGTGG reverse: TATAGTGGCAACTTTCAGATGGA
D14Mit193	forward: CTCTGGCTTCTAAACAAAACACTG reverse: CATGTGGACGTGTGTATACATCC
D15Mit63	forward: ACCAATGATCGTTGATGCCT reverse: TAATTTCACACTAGCAAAACCAA
D17Mit175	forward: TGGAAATCGGAGCCTCTG reverse: TTGGAAAAGGTTGAGAGTAGATCA

Análisis estadístico

Los datos resultantes de los productos de amplificación mediante PCR del ADN de rata, fueron analizados mediante el programa PopGen 32 (Yeh *et al.*, 1999), el cual se basa en el análisis de poblaciones a través de la variación genética existente entre y dentro de poblaciones naturales, cuando se utilizan marcadores moleculares dominantes o co-dominantes. Para realizar el análisis estadístico de los resultados, se calcularon los Rf del peso molecular, el cual es calculado como el radio de la distancia migrada por el producto de amplificación problema con relación al frente del colorante del marcador molecular; una vez calculados los Rf de los productos de amplificados obtenidos para los distintos microsatélites, éstos se introdujeron en el programa estadístico PopGen2.

Resultados

Los siete *loci* microsatélites seleccionados para el análisis del ADN de rata presentaron productos de amplificación con las características presentadas en el cuadro 3.

Cuadro 3

Tamaño de los productos de amplificación para los *loci* microsatélite usados en la evaluación molecular de las ratas BIOULA: Sprague Dawley.

Locus	Alelos	Tamaño (pb)* Encontrado	Condición genética
D10Mit10	1	200	Monomórfico/monoalélico
D1Mit17	1	228	Monomórfico/monoalélico
R-12	1	151	Monomórfico/monoalélico
R-43	2	148, 178	Polimórfico Monoalélico / bialélico
R-99	2	91, 109	Polimórfico Monoalélico / bialélico
R-119	2	109, 128	Bialélico/ monomórfico
R-145	1	126	Bialélico/ monomórfico

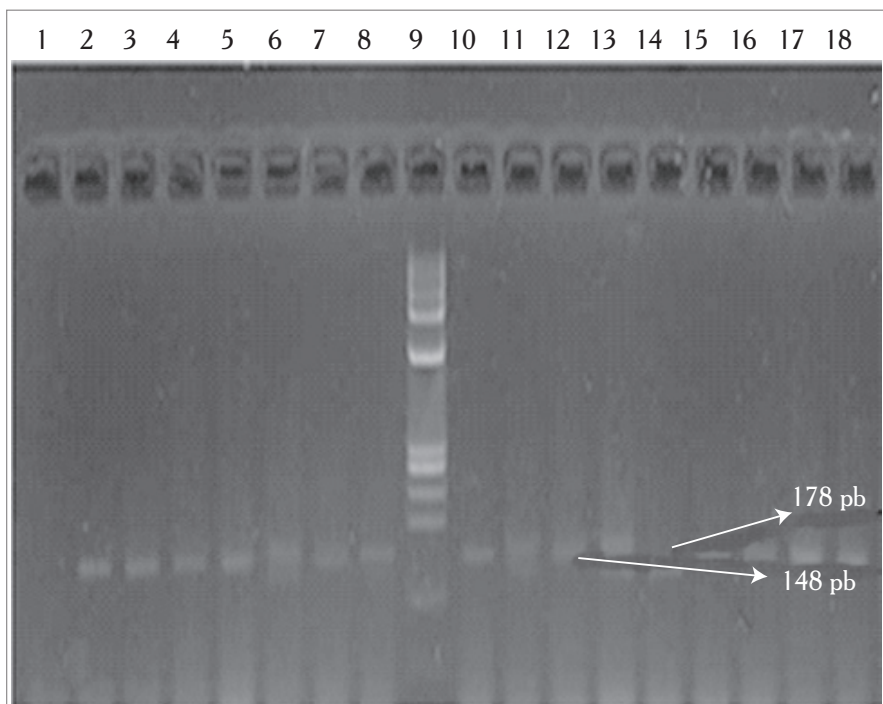
*pb: pares de bases

Se pudo observar que los microsatélites *D10Mit10*, *D1Mit17* y *R-12* mostraron un comportamiento monomórfico (de una sola forma) y monoalélico (una sola hebra); es decir, hebras que sólo presentaron 200, 228 y 151 pb., respectivamente. Los productos de amplificación observados para los microsatélites *R-43* y *R-99*, presentaron polimorfismo a pesar de que se observaron productos de amplificación con una condición monoalélica (una sola hebra), algunos mostraron una cantidad de pares de base de 148 y otros de 178, para el microsatélite *R-43*; y para el *R-99* se observaron microsatélites que tenían una sola hebra de 91 pb., y otros de 109 pb.; para estos microsatélites se observaron, igualmente, algunos productos de amplificación de dobles hebras, indicando la existencia de alelos de diferentes tamaños, pero en las mismas cantidades de pares de bases observadas por separado; para el microsatélite *R-43*, de 148 y 178; y para el *R-99*, de 91 y 109.

Para los microsatélites *R-119* y *R-145*, se observaron productos de amplificación con una sola forma (monomórfico), pero en una condición bialélica (dos hebras); ejemplo de lo planteado se puede observar en la figura 1, la cual presenta el producto de amplificación del microsatélite *R-43*; en ésta, se pueden observar hebras con 178 pb y hebras con 148 pb, en forma monoalélica; e igualmente se pueden observar ambas hebras, pero en forma bialélica.

Figura 1

Productos de amplificación del microsatélite *R-43*.



Carril 1: Control negativo. Carriles 2-9 y 11-18: Productos de amplificación de muestras problemas. Carril 10: Marcador Molecular Φ X174 *Hae* III.

Los resultados del análisis estadístico (cuadro 4), realizado con el programa Pog-Gen 32 presentaron que las frecuencias alélicas, para el microsatélite *R-119*, poseen la proporción máxima de heterocigotos, es decir, 0,5; mientras que para *R-99* y *R-143*, se observó la tendencia a la fijación de un alelo, ya que la frecuencia de un alelo es muy alta con respecto a la frecuencia del otro; por ejemplo, para *R-43*, la frecuencia del alelo A es de 0,883 (aproximándose a 1), mientras que la frecuencia del alelo B es de 0,116 (acercándose a 0). Para *D1Mit17*, *D10Mit10*, *R-12* y *R-145*, las frecuencias son iguales a 1, debido a la existencia de un alelo único.

Cuadro 4

Frecuencias alélicas de la colonia de ratas *Sprague-Dawley* para los diferentes *loci* microsatélites evaluados.

Alelo	Locus						
	D1Mit17	D10Mit10	R-12	R-43	R-99	R-119	R-145
A	1.000	1.000	1.000	0.883	0.725	0.500	1.000
B	-	-	-	0.116	0.274	0.500	-

Los resultados de la medida de los Rf permitieron, a la vez, estimar el porcentaje de *loci* polimórficos y monomórficos con respecto al total de microsatélites evaluados. El porcentaje de *loci* polimórficos, para los microsatélites *R-43*, *R-99*, *R-119*, fue de 42.86%; mientras que un porcentaje de 57.14%, está representado por *loci* monomórficas, para los microsatélites *D1Mit17*, *D10Mit10*, *R-12*, *R-145*.

En el cuadro 5 se presentan los estadísticos de la variación génica de la población de ratas *Sprague-Dawley*, para todos los *loci* microsatélites analizados, observándose que el tamaño de la muestra para los *loci* *R-12* y *R-43* fue de 60, mientras que para el resto de los *loci* fue de 62. Esto se debe a que en ambos *locus* no se presentó la misma cantidad de producto de amplificación para una de las muestras de ADN; por lo tanto, no se reportan los alelos correspondientes a dichos *locus* en el análisis.

Cuadro 5

Variaciones génicas para todos los *loci* de la colonia de ratas *Sprague-Dawley*: valores de Índice de Shanno's y del coeficiente de heterocigosis de Nei's.

Locus	N	Na	Ne	I
D1Mit17	62	1	0.000*	0.000*
D10Mit10	62	1	0.000*	0.000*
R-12	60	1	0.000*	0.000*
R-43	60	2	0.206	0.360
R-99	62	2	0.398	0.587
R-119	62	2	0.500	0.693
R-145	62	1	0.000	0.000
Promedio	-	-	0.157	0.234
SE	-	-	0.214	0.308

Tamaño de la muestra (N); número de alelos observados (n_a); heterosis esperada (He); índice de fijación (I); desviación significativa (*); error estándar (SE), n_e = número de alelos efectivos (Kimura y Crow, 1964). $*I =$ Índice de información de Shannon's (Lewontin y Krakauer, 1973).

La proporción de homocigotos y heterocigotos observados para la colonia de ratas fue de $0,791 \pm 0,367$ y $0,208 \pm 0,376$, respectivamente.

El promedio del número de alelos por *locus*, para toda la colonia, fue de $1,428 \pm 0,534$ y el promedio del número de alelos efectivos fue de $1,274 \pm 0,403$. El valor (*na*) indica el número de alelos observados para la colonia, mientras que el (*ne*) mide la frecuencia de aparición o la efectividad de estos alelos.

Como anteriormente se dijo, el Índice de Shanno's, representa una medida de diversidad genética, y la encontrada para la colonia en análisis con respecto a los microsatélites estudiados fue de $0,234 \pm 0,308$, indicando una diversidad muy baja. Ambas medidas estiman la proporción de heterocigotos esperados en una población (cuadro 6).

Cuadro 6

Proporciones de heterocigosis para la colonia de ratas *Sprague-Dawley*, calculadas mediante el programa de análisis genético de poblaciones PopGen 32.

Locus	Tamaño muestra	Homo. Obs.	Heter. Obs.	Homo [^] Esp.	Heter. [^] Esp.	Hete. Esper. Nei*
D10mit10	62	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000
D1Mit17	62	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000
R-12	60	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000
R-43	60	0.833	0.166	0.790	0.209	0.206
R-99	62	0.709	0.290	0.595	0.404	0.398
R-119	62	0.000	1.000	0.491	0.508	0.500
R-145	62	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000
Promedio	61	0.791	0.208	0.839	0.160	0.157
Desv. Est.		0.367	0.367	0.218	0.218	0.214

[^]Heterocigosis esperada (Levene, 1949). *Heterocigosis esperada (Nei, 1973).

Los productos de amplificación obtenidos en el análisis de los 14 *loci* microsatélites del ADN de los ratones de las líneas BALB/c//BIOULA y C57BL/6//BIOULA y observados en gel de agarosa al 2,5%, presentaron una condición de un solo alelo para todos los microsatélites analizados (cuadro 7).

Cuadro 7

Tamaño de los productos de amplificación para los *loci* microsatélite usados en la evaluación molecular de los ratones BALB/c//BIOULA y C57BL/6//BIOULA.

Locus	A l e l o s	Tamaño (pb)* encontrado		Tamaño (pb)* esperado	
		BALB/c// BIOULA	C57BL/6// BIOULA	BALB/c// BIOULA	C57BL/6// BIOULA
D1 Mit17	1	176	170	176	170
D1MIT14	1	198	180	198	180
D5 Mit254	1	144	136	144	136
D6 Mit160	1	135	135	135	135
D8Mit46	1	200	208	200	208
D10 Mit10	1	128	180	128	180
D10Mit123	1	149	141	149	141
D11 Mit2	1	112	122	112	122
D11mit31	1	150	156	150	156
D13 Mit13	1	138	148	138	148
D13Mit99	1	177	203	177	203
D14Mit193	1	132	122	132	122
D15 Mit63	1	124	146	124	146
D17Mit175	1	104	110	104	110

*pb: pares de bases.

Discusión

Se asume que los roedores de laboratorio pertenecientes a las líneas no consanguíneas se caracterizan por su alto grado de heterogeneidad genética, reflejando la de la población humana; sin embargo, muchas 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 azaroso de los animales mantenidos en la colonia, por lo que es necesario establecer sistemas de cruce especiales que eviten el aumento de los niveles de consanguinidad en el grupo (De Jesús y Torres, 2006). Los sistemas usados intentan, por medio de cruces en rotación, copiar los apareamientos al azar que se presentan 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.

Para mantener correctamente estos grupos de roedores no debe sobrepasarse del 1% de endocría por generación, tratando de cruzar siempre animales no emparentados. En una colonia cerrada, esto es muy difícil de lograr; por lo tanto, dependerá del tamaño inicial de la colonia. Lo ideal es contar con alrededor de 80 parejas reproductoras como fundadores del núcleo; así, el coeficiente de endocría F no llega a superar el 10% dentro de las 20 generaciones (Benavides y Guénet, 2003). Por consecuencia, es importante que las líneas no consanguíneas presenten un alto grado de diversidad genética individual, aunque la heterogeneidad total nunca sea lograda.

La variabilidad genética detectada por técnicas como la PCR, se describe por la variación en las frecuencias alélicas. Las frecuencias genotípicas sólo se pueden calcular a partir de las alélicas cuando hay equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, las alélicas siempre se pueden calcular a partir de las genotípicas.

Para esto, se calculan parámetros como la proporción de *loci* polimórficos (P) o polimorfismo (proporción de *loci* con más de un alelo) y la heterocigosis media (H), la cual se determina obteniendo, primero, la frecuencia de individuos heterocigotos en cada *locus* y sacando, luego, el promedio de estas frecuencias con todos los *loci*; sin embargo, existen distintos índices para medir diversidad genética, como el Índice de Shannon, el Índice de fijación y el coeficiente de heterocigosis de Nei's, mediante los cuales se pueden deducir la variación genética.

La colonia de ratas Sprague Dawley, del Bioterio de la Universidad de Los Andes, se ha mantenido en reproducción durante 16 años (32 generaciones), en una colonia cerrada, usando el esquema reproductivo de Robertson; éste consiste en agrupar una cantidad de parejas por bloques. En el caso de la colonia en estudio ($B_1, B_2 \dots B_8$), para realizar el apareamiento de los reproductores de la colonia de fundación, se seleccionan los machos de los bloques impares (B_1, B_3, B_5, B_7) y se aparean con las hembras de los bloques pares (B_2, B_4, B_6, B_8) y los machos de los bloques pares (B_2, B_4, B_6, B_8) y se aparean con las hembras de los bloques impares (B_1, B_3, B_5, B_7), para formar nuevamente los bloques ($B_1, B_2 \dots B_8$).

El análisis de marcadores moleculares microsatélites permitió inferir, a la colonia de ratas Sprague Dawley, que la colonia ha perdido variabilidad genética; ya que se observó un alto porcentaje de uniformidad genética para los productos de amplificación de los microsatélites *D10Mit10*, *D1Mit17*, R-145 y R-12 al analizar los valores de R_f a través del estadístico de variación génica, conocido como el Índice de Shanno's indicando una diversidad genética muy baja para las ratas de esta colonia *Sprague-Dawley*. Este

índice representa la probabilidad de que dos alelos de un mismo *locus* (elegidos al azar), sean diferentes uno del otro. Las proporciones de homocigotos y heterocigotos esperados (Levene, 1949), son una función de los *loci* polimórficos, del número de alelos por *locus* polimórficos y de las frecuencias alélicas bajo el supuesto de apareamiento netamente al azar, notándose que las proporciones obtenidas para estos dos parámetros fueron: $0,791 \pm 0,367$ para la homocigosis y $0,208 \pm 0,376$ para la heterocigosis. Estos valores indican que la proporción de heterocigotos se encuentra notablemente disminuida.

La diversidad genética de una población es comúnmente medida calculando el promedio de heterocigotos por *locus* (Nei y Roychoudhury, 1973). El método propuesto por Nei y Roychoudhury (1973), es aplicable a cualquier población, sin considerar el número de alelos por *locus*, el patrón de fuerzas evolutivas tales como la mutación, selección y migración y el método reproductivo del organismo usado. La estimación de las heterocigosis esperadas mediante Levene (1949), así como Nei's y Roychoudhury (1973), son realizadas asumiendo apareamiento al azar.

Es importante mencionar que los números esperados deben ser muy similares a los números observados (aunque la prueba no especifica qué factor es determinante de la concordancia), ya que los números esperados se calculan de las frecuencias génicas determinadas por las cifras observadas; y, como podemos ver, no existen mayores diferencias entre ellas. Resultados similares fueron encontrados por Kloting *et al.* (2003), quienes reportaron más heterocigosis en ratas Rj: SD (0.27 ± 0.19), la cual fue significativamente diferente al de las ratas Cri: WIST (0.41 ± 0.19) y las ratas silvestres (0.35 ± 0.21), presentando una pérdida de alelos en las ratas *outbred* (no consanguíneas), producidas en cautiverio con relación a las ratas silvestres; demostrando así, que la designación de "outbred stock" o "colonia no consanguínea" no garantiza la variabilidad genética, ni fenotípica de las primeras.

En Venezuela se han reportado escasos estudios de este tipo; por ejemplo, los realizados por De Jesús (2003, 2006) y De Jesús *et al.* (2005). En el caso reportado en este trabajo, el resultado es el reflejo del manejo zootécnico que se le ha tenido que proporcionar a la línea a través de su historia (16 años) de producción en el Bioterio de la Universidad de Los Andes; ya que, como se mencionó anteriormente, existen procesos que actúan a largo plazo en contra del mantenimiento de la variabilidad genética de poblaciones no consanguíneas; especialmente si estas poblaciones son pequeñas, siendo probable que alguno de los procesos mencionados (deriva genética, selección, consanguinidad y mutación) hayan actuado en la colonia analizada, ya que ésta se compone y se ha mantenido con un grupo pequeño de individuos; por lo que cada generación descendiente del nuevo núcleo puede haber proporcionado una dotación genética poco nutrida que ha conllevado a las modificaciones en las frecuencias alélicas y, por ende, a un descenso en la frecuencia de heterocigotos.

El análisis realizado permite planificar los apareamientos posteriores debido a que se podrán seleccionar los animales que presenten alelos en condición bialélica y polimórfica para ser los futuros reproductores de las próximas generaciones; ello permitirá incrementar la variabilidad genética de la misma, esperando lograr, en el futuro, un mayor

polimorfismo en la colonia (Kiran *et al.*, 2007), teniendo en cuenta la existencia de estudios en los cuales se ha intentado recuperar la condición de heterocigosis en colonias de animales no consanguíneos que, con el transcurso del tiempo, presentan la condición de homocigosis; por ejemplo: Kloting *et al.* (2003); Campino *et al.* (2002); Voigt *et al.* (1997); Kloting *et al.* (1997), en los cuales se propusieron, básicamente, el aumento de la variabilidad de las colonias en estudio mediante el cruce con grupos silvestres, cuya alta variabilidad genética fue comprobada con anterioridad. La propuesta a seguir en el bioterio será la del análisis del polimorfismo de microsatélites para realizar la selección de futuros reproductores dentro de la misma colonia de producción que se ha mantenido durante 16 años en el bioterio.

Debido a que los resultados obtenidos reflejan desviaciones estándares elevadas, este estudio conlleva también a la decisión de examinar un mayor número de marcadores microsatélites, con la finalidad de obtener mayor información en el análisis (Serikawa *et al.*, 1992; Teppner *et al.*, 2004; Smits *et al.*, 2004; Weinschenker *et al.*, 2005).

Con relación a los resultados obtenidos en el análisis de los microsatélites para las cepas consanguíneas analizadas (BALB/c//BIOULA y C57BL/6//BIOULA), éstos son un reflejo de las condiciones de mantenimiento que han tenido los núcleos de fundación de ambas cepas, los cuales se han mantenido en aisladores desde la llegada de las parejas que le dio origen a la colonia (en el año de 1995), lo cual ha permitido que estos animales se mantengan en una condición de consanguinidad, proporcionando homocigosis e isogenidad a lo largo del tiempo (32 generaciones) de producción, ya que la reproducción se ha realizado mediante apareamientos monogámicos de hermanos con hermanas, seleccionados del tercer parto de la pareja reproductora (P_3), fundamentado en que la consanguinidad (o endocria) es el acoplamiento entre individuos emparentados.

Y, por otro lado, la práctica sistemática de la consanguinidad disminuye la frecuencia de los genotipos heterocigotas y, paralelamente, el número limitado de progenitores genera una progresión hacia el estado homoalélico (una sola variante alélica presente), donde algunos alelos (en principio al azar) son fijados en ese grupo de animales. De esta forma, cada línea consanguínea representa una colección única de genes (alelos) imposible de repetir (Benavides y Guénet, 2003). Ante lo planteado por estos autores, las cepas de ratones consanguíneos que fueron estudiados en este trabajo, además de demostrar un estado homoalélico, presenta semejanza con las líneas BALB/c y C57BL/6 clásicas, debido a la paridad con la cantidad de pares de bases encontradas en el reporte de la base de datos de The Jackson Laboratory.

No se descarta, sin embargo, la posibilidad de que las colonias presentes en el Bioterio de la Universidad de Los Andes, actualmente sean subcepas; esto, debido a que es inevitable la divergencia de las líneas consanguíneas, siendo éste un fenómeno lento pero insidioso e inevitable. Ante esta situación es necesario continuar el análisis de mayores números de microsatélites, con la finalidad de definir la posible divergencia con las cepas denominadas clásicas o estándar y, a la vez, estandarizar la colonia existente.

Conclusiones

La evaluación de marcadores moleculares microsatélites permitió evaluar la condición de heterocigosis para las ratas no consanguíneas BIOULA: Sprague Dawley y de homocigosis para los ratones consanguíneos BALB/c//BIOULA y C57BL/6//BIOULA.

Se encontró un estado homoalélico, similar al reportado en la base de datos de The Jackson Laboratory para los ratones BALB/c//BIOULA y C57BL/6//BIOULA, para los distintos microsatélites analizados mediante PCR.

La condición de heterocigotos en las ratas BIOULA: Sprague Dawley, se encuentra notablemente disminuida, de acuerdo a los resultados estadísticos encontrados al analizar los Rf de los productos de amplificación de los distintos microsatélites usados, mediante el programa estadístico PopGen2.

Agradecimientos

Al Centro de Desarrollo Científico, Tecnológico y Humanístico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes, Mérida, bajo el Proyecto No. C-1377-06-03-A.

Literatura citada

- Benavides, F.; Glasscock, L.; Coghlan, M.; Stern, M.; Weiss, D. y Conti, C. (2001). PCR - based microsatellites analysis for differentiation and genetic monitoring of nine SENCAR mouse strains. *Lab Ani*. 35: 157-162.
- Benavides, F. y Guénet J. L. (2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá. Madrid, 312 pp.
- Berry, M. y Cutler C. (2007). Breeding Systems: Considerations, Genetic Fundamentals, Genetic Background, and Strain Types. The Mouse in Biomedical Research. *History, Wild Mice and Genetics Ch 4- Elsevier Academic Press. California, 53-78pp*.
- Campino, S.; Behrschmidt, C.; Bagot, S.; Güenet, J. L.; Cazenave, P.; Holmberg, D. y Goncalves, C. (2002). Unique genetic variation revealed by a microsatellite polymorphism survey in ten wild-derived inbred strains. *Genomics*. 79: 618-620.
- De Jesús, R. (2003). ¿Cómo sabemos si los animales consanguíneos usados en la investigación son genéticamente puros? *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2: 15-22.
- De Jesús, R.; Moreno, N. y Martínez, J. (2005). 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). *Revista Científica del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. División de Investigación*. XV: 134-140.
- De Jesús, R. (2006). *Caracterización genética de líneas consanguíneas de ratón producidas en Venezuela, mediante análisis de microsatélites*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Maracay.
- De Jesús, R. y Torres, E. (2006). Evaluación de factores de reproducción para detectar posible contaminación genética en cepas consanguíneas de ratones. *J. Bol. Mal. Salud Amb. V.46 No. 2 Maracay, Dic. 2006*.
- Festing, W. (1992). Genetic variation in outbred rats estimated from DNA fingerprints: implications for toxicological screening. *Human Experiment Toxicology*. 11: 590-591.
- Festing, W. (1993). Genetic variation in outbred rats and mice and its implications for toxicological screening. *J. Experiment Animal. Science*. 35: 210-200.
- Gibbs, R. (1990). DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*. 62: 1202-1214.

- González, N.; Rodríguez, N.; Torres, W.; O'Callaghan, J. y De Jesús, R. (2011). Protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de tejido de oreja del ratón y la rata usando la enzima Bromelina. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXI, No. 3*, 233-238.
- Hans, E. (2004). Microsatellites: Simple Sequences With Complex Evolution. *Nature Reviews*. 5: 435-445.
- Hartl, D. (2001). Genetic Management of Outbred Laboratory Rodent Populations. *Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts*. Pp: 1-17.
- Kimura, M. y Crow, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite Population. *Genetics* 49:725-38.
- Kiran, K.; Vijaya, B.; Vishnuvardhan, R. y Giridharan, N. (2007). DNA Fingerprinting and Phylogenetic Analysis of W^{NIN} Rat Strain and Its Obese Mutants Using microsatellite Markers. *Biochemical Genetics*. 45: 77-91.
- Kloting, I.; Vogt, L. y Voigt, P. (1997). How heterozygous are wild rats (*Rattus norvegicus*)? *Transplantation Proceedings*. 29: 1772-1773.
- Kloting, I.; Nitschke, C. y Brandt, V. (2003). Impact of genetic profiles on experimental studies: outbred versus wild rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 189. 68-71.
- Lewontin, R. y Krakauer, J. (1973). Test for neutral genes. *Genetics* 74: 175-195.
- Levene, H. (1949). En un problema de la concordancia que se plantean en la genética. *Ann. Math. Stat.* 20: 91-94.
- Love, J.; Knight, A.; McAlerr, M. y Todd, J. (1990). Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-based microsatellites. *Nucleic Acids Research* 18:4123-4130.
- Melloy, E. y Balk, M. (1993). The importance of laboratory animal genetics, health and the environment in Biomedical Research. *Editorial Academic Press, New York*. 135 pp.
- Mettler, L. y Gregg, T. (1972). *Genética de las poblaciones y evolución*. Editorial Hispano-Americana. Distrito Federal. México. 350 pp.
- Nei, M. y Roychoudhury, K. (1973). Sampling Variances of Heterozygosity and Genetic Distance. *Genetics* 76: 379-390.
- Serikawa, T.; Kuramoto, T.; Hilbert, P.; Mori, M.; Yamada, J.; Dubay, C.; Linpdpainter, K.; Ganten, D.; Güenet, J. L.; Lathrop, M. y Beckmann, J. (1992). Rat Gene Mapping Using PCR-Analyzed Microsatellites. *Genetics*. 131: 701-721.
- Serikawa, T.; Mashimo, T.; Voigt, B.; Tsurummi, T.; Naoi, K.; Nakanishi, S.; Yamasaki, K. y Kuramoto, T. (2006). A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and genetically defined rat strains. *Genetics*. 7: 1-8.
- Shang, H.; Wei, H.; Yue, B.; Xu, P. y Huang, H. (2009). Microsatellite analysis in two populations of Kunming mice. *Lab Anim*. 43:34-40.
- Smith, B.; Zutphen, B.; Plasterk, R. y Cuppen, E. (2004). Genetic Variation in Coding Regions Between and Within Commonly Used Inbred Rat Strains. *Genome Research*. 14: 1285-1290.
- Suzuki, D.; Griffiths, A.; Miller, J. y Lewontin, R. (1993). *Introducción al análisis genético*. Interamericana. McGraw-Hill. Cartagena. Madrid. 267 pp.
- Teppner, I.; Aigner, B.; Schreiner, E.; Muller, M. y Windisch, M. (2004). Polimorphic microsatellite markers in the outbred cfw and icr stocks for the generation of speed congenic mice on C57BL/6 background. *Laboratory Animals*. 38: 406-412.
- Voigt, B.; Kovacs, P.; Vogt, L. y Kloting, I. (1997). How heterozygous are wild rats (*Rattus Norvegicus*)? *Transplantation Proceeding* 29:1772-1773.
- Wang, J. (1997). More efficient breeding systems for controlling inbreeding and effective size in animal populations. *Heredity* 79 (1997) 591-599.
- Weinschmker, D.; Wilson, M.; Williams, K.; Weiss, J.; Lamb, N. y Twigger, S. (2005). A new method for identifying informative genetic markers in selectively bred rats. *Mammalian Genome*. 16: 784-791.
- White, W. y Lee, C. (1998). The Development and Maintenance of the Crl:CD[®](SD) IGS BR Rat Breeding System. *Charles River Laboratories*.

- Yeh, F.; Boyle, T.; Rongai, Y.; Ye, Z. y Xijan, J. (1999). *PopGen version 1,31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis* <http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh> (Consultada el 28 de agosto de 2010).
- Zúñiga, M.; Turmari, J.; Milocco, S. y Piñeiro, R. (2001). *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. McGraw-Hill/ Interamericana de España. Madrid, España. 638 pp.

Recibido: Octubre 14, 2010

Aceptado: Junio 28, 2011