

Alteraciones en el largo de la cola y su asociación con caracteres de fertilidad en ratones CF1 seleccionados por peso

Alterations in tail length and its association with fertility characters in CF1 mice selected for weight

Bernardi, S.F.¹; Tarallo, A.²; Faletti, C.²; Oyarzabal, M.I.³

¹Cátedra de Histología I y Embriología Básica. Fac. Cs. Veterinarias. UNR. Ov. Lagos y Ruta 33, 2170 Casilda. Argentina. ²Cátedra de Anatomía Descriptiva y Comparada II Parte. Fac. Cs. Veterinarias. UNR. ³Cátedra Producción de Bovinos de Carne. Fac. Cs. Veterinarias. CIC. UNR.

RESUMEN

En una población testigo (*t*) de ratones de la cepa CF1 y en dos pares de líneas de selección divergente para peso (*s* y *b*: negativas; *s'* y *b'*: positivas) derivadas de la primera, fundadas y criadas en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario, se presentaron animales con alteraciones en las colas y ausencia de vértebras caudales en baja frecuencia. Para estimar las relaciones entre longitud de cola (LC), número de vértebras caudales (V), peso (P) y caracteres de fertilidad, se midió LC en mm, se contó V mediante radiografías, se observaron caracteres estructurales en ovarios y testículos por microscopía óptica. Por aplicación de ANOVA y pruebas de comparaciones múltiples se probó que las líneas difirieron en LC ($p < 0,05$) en el sentido de la selección de P (machos: $LC_b = 8,4$; $LC_s = 8,8$; $LC_t = 9,0$; $LC_{b'} = 9,2$; $LC_{s'} = 9,8$). Los ratones con ausencias de vértebras caudales (cc) tuvieron en promedio la mitad de V que los animales con colas fenotípicamente normales (cn). Cuando los cc se compararon con los cn ($p < 0,05$) se observó un menor tamaño de las gónadas en ambos sexos, un menor diámetro del túbulo seminífero en machos y un menor número de cuerpos lúteos en hembras. LC se modificó como respuesta correlacionada a la selección de peso, pero la presencia de animales con malformaciones en la cola se debería a mutaciones que podrían estar asociadas con fertilidad.

Palabras clave: (longitud de cola), (sin cola), (selección de peso), (ratones).

SUMMARY

In a control population (*t*) and in two pairs of lines of two-way selection for body weight (*s* and *b*: downward selection; *s'* and *b'*: upward selection), mice with tail alterations and absence of caudal vertebrae were presented with low frequency from line foundation. To estimate the relations among tail length (LC), number of caudal vertebrae (V), weight (P) and fertility characters, LC was measured in mm, V was counted by X-rays, structural characters in ovaries and testicles were observed by optical microscopy. It was tested, by ANOVA and multiple comparisons tests, that lines differed in LC ($p < 0,05$) in the same way of the weight selection performed (males: $LC_b = 8,4$; $LC_s = 8,8$; $LC_t = 9,0$; $LC_{b'} = 9,2$; $LC_{s'} = 9,8$). The mice with caudal vertebrae absences (cc) had, in average, half of the V than the animals with phenotypically normal tails (cn). Males and females presented smaller gonads, minor seminiferous tubule diameter in males and minor number of corpora lutea in females, when cc animals were compared with cn ones ($p < 0,05$). LC was modified as correlated response to the weight selection, but the presence of animales with tail malformations would be due to mutations that may be associated with fertility.

Key words: (tail length), (tailless), (weight selection), (mice).

INTRODUCCIÓN

La columna vertebral del ratón está compuesta por 7 vértebras cervicales, 13 vértebras torácicas, 6 vértebras lumbares, 4 vértebras sacras y 28 vértebras caudales. Las vértebras caudales forman la base ósea de la cola; progresivamente van simplificándose y disminuyendo de tamaño hacia caudal, excepto las primeras, las demás sólo conservan el cuerpo correspondiente a la vértebra tipo²⁰. La longitud de la cola en el ratón varía entre seis y diez centímetros, pudiéndose presentar ratones con colas más cortas o sin cola. Está demostrado que la temperatura ambiente afecta parcialmente su crecimiento, de tal manera que a mayor temperatura, mayor tasa de crecimiento y longitud de la cola en los adultos^{10, 3, 12, 1}. La temperatura, asociada a la vasodilatación y vasoconstricción de la red sanguínea de la cola, influye directamente sobre la proliferación celular y la producción de matriz en el cartílago de la placa epifisiaria, responsable del crecimiento en el largo de los huesos¹⁶.

La longitud de la cola depende también del genotipo del animal y está asociada genéticamente con el peso corporal⁹. Esta asociación genética positiva entre ambos caracteres provocó que la selección divergente por peso corporal modificara la longitud de la cola¹⁵.

La presencia de mutaciones inicialmente descritas por el año 1945 pueden alterar la longitud de la cola⁸. La mutación "brachyury" causa acortamiento de la longitud, varía su expresión de un ratón a otro, desde una cola con apariencia normal hasta prácticamente la ausencia de cola, y puede afectar la fertilidad, el desarrollo y el crecimiento^{5, 19, 4}.

En los individuos fundadores y durante 55 generaciones de una población testigo de ratones de la cepa CF1 y de dos pares de líneas de selección divergente de peso originadas a partir de la anterior, fundadas y criadas en la Facultad de Ciencias Veterinarias UNR, se observaron ratones con colas normales y con colas cortas. Estos últimos en muy baja frecuencia ($< 0,01$) evidenciaban a simple vista la falta de vértebras caudales u otras malformaciones.

En el presente trabajo se propuso probar si las diferencias observadas en la longitud de la cola están asociadas con variaciones en el número de vértebras caudales, evaluar los efectos de la selección de peso sobre la longitud de la cola y la asociación entre la ausencia de vértebras caudales y caracteres de fertilidad. Si existiera esta asociación, las líneas podrían constituir un modelo para el estudio de problemas reproductivos asociados a mutaciones que

también se encuentran en otras especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las líneas de ratones

En 1986, a partir de una población de ratones de la cepa CF1 existente en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNR, se formó una población testigo (*t*) no seleccionada con apareamientos al azar y $N_e \cong 40$. Con animales de las generaciones 2 y 8 de *t* se fundaron dos pares de líneas de selección divergente de peso a los 49 días de edad: *s'* y *h'*: líneas seleccionadas para alto peso, *s* y *h*: líneas seleccionadas para bajo peso^{13, 14}.

La selección de peso se realizó eligiendo como reproductores los animales de pesos más extremos, los más pesados o los más livianos según correspondiera. En las generaciones actuales, en promedio, los animales de las líneas seleccionadas para alto peso pesan ~50-60% más que los de las seleccionadas para bajo peso. En las líneas seleccionadas, se practicó endocría por limitación del número con $N_e \cong 10$.

El manejo y cuidado de los animales se realizó de acuerdo con las normas éticas de la guía Guide for the Care and Use of Laboratory Animals¹¹. Se les suministró *ad-libitum* agua y un alimento comercial para ratón con 25% de proteínas, el ambiente se mantuvo a una temperatura media de $21 \pm 2^\circ\text{C}$. El sacrificio de los animales se realizó por dislocación cervical².

Desde el origen de las líneas, todos los animales se pesaron a los 49 días de edad y se registraron las historias reproductivas de las hembras seleccionadas.

Longitud de la cola y número de vértebras caudales

Para estimar la variabilidad de la longitud de la cola (LC) y del número de vértebras caudales (V) y la asociación entre ambos caracteres, se midió la longitud de la cola en milímetros mediante regla milimetrada y se contó el número de vértebras caudales mediante radiografías de las colas en 243 ratones pertenecientes a generaciones actuales. Se estimaron, por sexo, los

promedios y errores estándar de LC, los valores mínimos y máximos de V y los coeficientes de correlación entre LC y V.

Ratones con colas fenotípicamente normales

Diferencias entre líneas en longitud de cola y su asociación con peso. Con el propósito de estimar las diferencias en la longitud de la cola y su asociación con el carácter seleccionado (peso a los 49 días de edad (P) utilizando balanza digital), se midió la longitud de la cola en mm (LC) de los machos y hembras con colas fenotípicamente normales pertenecientes a las tres últimas generaciones de las cinco líneas (G: 57-59 *t*; 54-56 par *s*, 49-51 par *h*). Se denominó cola fenotípicamente normal a la que no presentaba malformaciones ni ausencia de vértebras caudales por simple observación visual. Para cada sexo, mediante la aplicación de análisis de la variancia y pruebas de comparaciones múltiples HSD de Tukey-Kramer, se probó si existían diferencias entre líneas para LC y P. Se estimaron los coeficientes de correlación P-LC con los promedios de las cinco líneas¹⁸.

Los registros de LC de los animales pertenecientes a las primeras generaciones de las líneas *t*, *s* y *s'* permitieron comparar, exclusivamente para estas líneas, si existieron cambios en LC a lo largo del proceso evolutivo. Para ello se consideraron dos períodos: I) generaciones iniciales y II) generaciones actuales. Se aplicó un análisis factorial con efectos fijos líneas y períodos y pruebas de comparaciones múltiples HSD de Tukey-Kramer para probar la posible existencia de diferencias entre períodos.

Ratones con defectos en las colas

Número y clasificación de las vértebras caudales. Durante las ~55 generaciones de cría de estas líneas, se observó la presencia de animales con malformaciones en las colas en muy baja frecuencia en todas las líneas. Se trata de animales en los cuales pueden identificarse, por observación visual, falta de vértebras caudales o colas flexionadas. Con el propósito de clasificarlas y describirlas, se tomaron 9 machos y 7 hembras con defectos en las colas

y se dividieron según el tipo de malformación en cola corta y cola flexionada. Mediante radiografías de las colas, se contó el número de vértebras caudales y se las categorizó de la siguiente manera:

- Normales (N): vértebras que presentan el patrón morfológico de una vértebra caudal; es decir, las primeras de la serie tienen cuerpo, arco y apófisis, el resto sólo consta de cuerpo.

- Menor tamaño (MT): vértebras que conservan la morfología de una vértebra caudal pero con una evidente disminución de su tamaño.

- Vestigiales (V): vértebras que han perdido la forma correspondiente a la vértebra tipo; o sea que no presentan cuerpo, arco ni apófisis; las mismas están representadas por un pequeño botón óseo.

- Con articulación anormal (A): cuando es evidente la pérdida del ángulo articular normal correspondiente a una juntura entre vértebras caudales, la cola parece estar flexionada o “quebrada”.

Caracteres de fertilidad y fenotipo de la cola

Con animales *h'* de cola normal (cn) y de cola corta (cc) se realizaron cruzamientos recíprocos (cn x cc y cc x cn) y entre ambos fenotipos entre sí (cc x cc y cn x cn) para probar si la presencia de cola corta se presentaba asociada a subfertilidad. Se estimó el porcentaje de pariciones (%PAR) para cada tipo de cruzamientos y se comparó la estructura ovárica y testicular de animales cc y cn.

En este último caso, se extirparon las gónadas correspondientes, se fijaron por inmersión en una solución al 10% de formaldehído tamponado con fosfato bisódico anhidro y fosfato monosódico monohidratado y se incluyeron en parafina. Los cortes histológicos se colorearon con hematoxilina-eosina y se observaron a microscopio óptico. Todas las mediciones se realizaron utilizando el software ImageJ 3.0. Con la metodología utilizada en trabajos anteriores^{6,7}, se estimaron las medias y errores estándar y se probó si existían diferencias entre animales cc y cn mediante pruebas *t*-student para las siguientes variables:

- número de cuerpos lúteos (CL): suma del número de CL observados en los ovarios derecho e izquierdo de una hembra.

- superficie ovárica (SOV): promedio de los productos del diámetro mayor por el diámetro menor observados en el ovario derecho e izquierdo de una hembra, expresado en micrómetros cuadrados.

- diámetro del tubo seminífero (DTS): promedio del diámetro mayor de 100 túbulos seminíferos por macho, expresado en micrómetros.

- altura del epitelio seminífero (AES): promedio de la altura del epitelio que recubre la luz de 100 túbulos seminíferos de cada animal, en micrómetros.

- superficie testicular (STES): promedio de los productos del diámetro mayor por el diámetro menor observado en el testículo derecho e izquierdo de un macho, expresado en micrómetros cuadrados.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa JMP en su versión 5.0 para Windows (JMP®, SAS Institute, 2003).

RESULTADOS

Longitud de la cola y número de vértebras caudales

En la Fig. 1 se observa la dispersión de la longitud de la cola (1,5 a 10,9 cm) y del número de vértebras caudales (9 a 29) en machos pertenecientes a generaciones actuales. Se distinguen claramente dos grupos (por arriba y por debajo de LC=6,5cm) que difieren en LC y V: ratones con colas fenotípicamente normales (Grupo 1) y con colas cortas (Grupo 2). Estos dos caracteres expresaron una asociación positiva al considerar ambos grupos (r^2 (LC-V)=0,87; $p<0,001$; N=134). La misma distribución y asociación entre LC y V se observó en hembras.

Ratones fenotípicamente normales

Diferencias entre líneas en la longitud de la cola y su asociación con peso. En la Tabla 1 se presentan los promedios y errores estándar de LC y P en machos. Las líneas difirieron en los promedios de

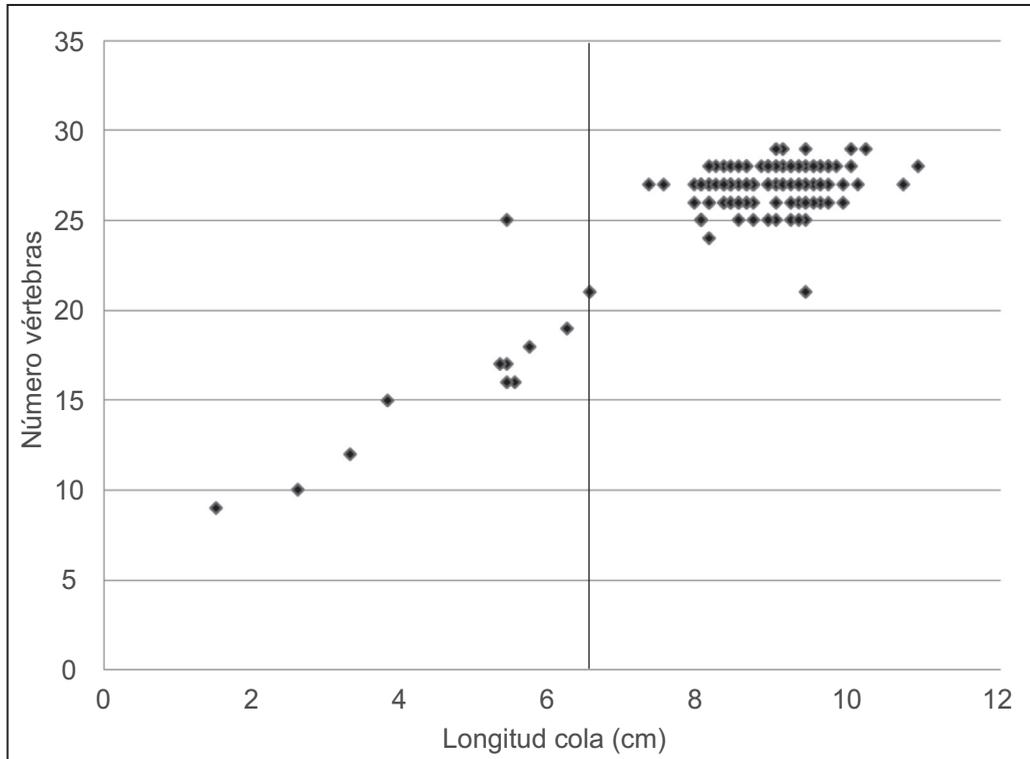


Figura 1. Longitud de la cola y número de vértebras. Machos

LC y P y presentaron una asociación positiva entre ambos caracteres: $r(P-LC_{\text{hembras}})=0,95$ ($p<0,01$) y $r(P-LC_{\text{machos}})=0,89$ ($p<0,05$). En el origen de las líneas, al menos para t , s y s' , no existieron diferencias en la longitud de las colas ($p>0,05$), es decir, las diferencias actuales se produjeron durante el proceso evolutivo analizado.

Ratones con defectos en las colas

Número y clasificación de las vértebras caudales. En las Fig. 2 y 3 se muestran radiografías de colas normales, cortas y flexionadas. Al analizar los promedios, mínimos y máximos del número de vértebras normales y la presencia de malformaciones, se evidenció que las colas cortas tienen en promedio la mitad de vértebras que las colas normales, oscilando entre muy pocas y apenas identificables a simple vista hasta un número similar al de las colas normales. Sólo los ratones cola corta presentaron vértebras de menor tamaño y vestigiales (Tabla 2). No se encontraron anomalías en las vértebras sacras y lumbares.

Caracteres de fertilidad y fenotipo de la cola

Para los cruzamientos en los cuales el padre, la madre o ambos tenían cola corta, el porcentaje de pariciones varió entre 62,5 y 63,6% y se redujo con respecto al de los cruzamientos entre animales de cola normal que presentaron un 100% de pariciones.

Los machos con cola corta mostraron testículos significativamente ($p<0,05$) más pequeños ($STES_{cc} = 46,91 \mu\text{m}^2$; $STES_{cn} = 54,19 \mu\text{m}^2$) y un menor diámetro del túbulo seminífero ($DTS_{cc} = 185,69 \mu\text{m}$; $DTS_{cn} = 192,95 \mu\text{m}$), no así la altura del epitelio (ATS) al compararlos con los machos de cola normal (Tabla 3).

En hembras, los resultados también evidenciaron una disminución estadísticamente significativa ($p<0,05$) en el tamaño de las gónadas (SOV) y esta diferencia además estuvo acompañada por una significativa disminución en el número de cuerpos lúteos (CL) en las hembras cc (Tabla 3).

Tabla 1. Promedios y errores estándar de longitud de cola (cm) y peso (g) por línea. Generaciones actuales. Machos

Línea	n	LC ± ES	P ± ES
<i>t</i>	159	9,0±0,03 c	31,9±0,25 c
<i>s</i>	143	8,8±0,04 d	24,7±0,27 d
<i>s'</i>	154	9,8±0,04 a	41,5±0,25 a
<i>h</i>	90	8,4±0,05 e	24,6±0,34 d
<i>h'</i>	184	9,2±0,04 b	40,3±0,24 b

Dentro de una columna, letras distintas indican diferencias significativas entre líneas, $p < 0,05$

Tabla 2. Número de vértebras caudales normales y presencia de malformaciones

Sexo	n	Malformación externa	Promedio N° vértebras	N° mínimo	N° máximo	MT	V	A
♀	4	cola corta	12,0	6	15	sí	sí	no
♀	3	cola flexionada	25,3	24	27	no	no	sí
♂	9	cola corta	12,9	5	23	sí	no	no

MT: presencia de vértebras de menor tamaño, V= presencia de vértebras vestigiales, A=presencia de articulación anormal

Tabla 3. Estructura ovárica y testicular de ratones con largo de cola normal (cn) y cola corta (cc)

	♀ <i>h'cc</i>		♂ <i>h'cc</i>		
	cn (n=8)	cc (n=18)		cn (n=24)	cc (n=15)
P ± ES	34,56 ± 0,56 a	32,76 ± 1,06 a	P ± ES	40,68 ± 0,72 a	40,03 ± 0,78 a
LC ± ES	9,25 ± 0,09 a	5,08 ± 0,24 b	LC ± ES	8,23 ± 0,52 a	5,25 ± 0,38 b
CL ± ES	10,87 ± 0,51 a	8,23 ± 0,46 b	DTS ± ES	192,95 ± 1,82 a	185,69 ± 2,30 b
SOV ± ES	24,89 ± 0,63 a	22,55 ± 0,29 b	AES ± ES	61,74 ± 0,83 a	59,47 ± 1,08 a
			STES ± ES	54,19 ± 1,70 a	46,91 ± 0,71 b

Letras distintas en la fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$). P: peso corporal a los 49 días (grs); LC: largo de cola; CL: número de cuerpos lúteos; SOV: superficie ovárica (μm^2); DTS: diámetro del túbulo seminífero (μm); AES: altura del epitelio seminífero (μm); STES: superficie testicular (μm^2)

DISCUSIÓN

En estas líneas de ratones, se ha demostrado que la longitud de la cola constituye un buen indicador del número de vértebras caudales debido a la significativa correlación entre ambos caracteres, cuando se incluyen en su estimación ratones que en conjunto presentan un amplio rango de la longitud de la cola (Fig. 1). Dado

que no se midió la longitud de las vértebras, no pudo estimarse si también existe variabilidad en la longitud de las mismas.

Se descarta que la temperatura ambiente haya sido un factor significativo como modificador de la longitud de la cola y se supone que, de haber existido, su influencia debe haber sido menor. El control de la temperatura durante estos años hizo

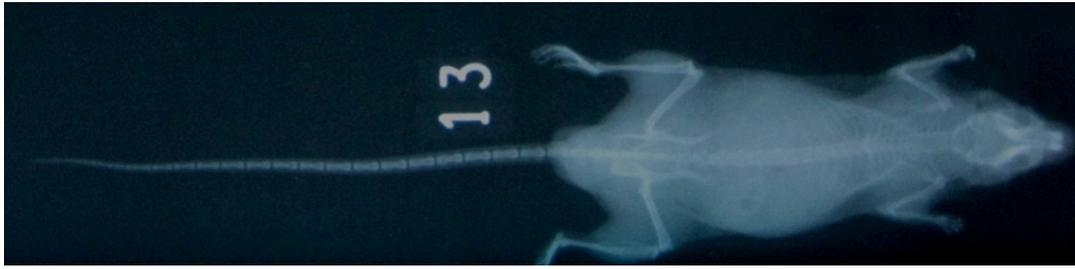


Figura 2. Radiografía de cola fenotípicamente normal. Obsérvese que la mayoría de las vértebras sólo constan de cuerpo y disminuyen progresivamente de tamaño hacia caudal. El extremo final de la cola es agudo y en punta.



Figura 3. Radiografía de colas cortas y flexionada. A: Cola corta con menor cantidad de vértebras caudales (< Ca 23). B: Cola corta y flexionada. Obsérvese que los extremos de las colas son romos, no se observan puntiagudos como en la cola de largo normal.

que las oscilaciones fueran pequeñas comparadas con las de los trabajos en los que se probó su influencia. En ellos, se utilizaron rangos que van desde temperaturas bajo cero a valores superiores a los 30°C que están muy lejos de las oscilaciones del ambiente donde se crían las líneas^{10, 3 12, 1, 16}.

La presencia de dos grupos bien definidos, con colas fenotípicamente normales y con colas con menor número de vértebras caudales, indicó que hubo distintas causas que contribuyeron a la modificación de la cola. En el primer grupo, la respuesta a la selección de peso estuvo acompañada por modificaciones en la longitud de la cola asociada positivamente al peso corporal. En promedio, los animales pertenecientes a las líneas más pesadas presentaron colas más largas, en ambos sexos. A esta evidencia se suma el hecho de que en tres de las cinco líneas, esta asociación no estaba presente en los animales fundadores y sí en las generaciones actuales, o sea que se produjo durante el proceso de selección de peso realizado.

En este sentido, los resultados coinciden con los de otros trabajos en los que se observó variaciones en la longitud de la cola como respuesta correlacionada a la selección divergente por diferente tasa de crecimiento de peso corporal a distintas edades. Los autores seleccionaron por un índice para ganancia de peso a los 10 días de edad manteniendo constante la ganancia de peso posterior y, en otro caso, por un índice para ganancia de peso entre los 28 y 56 días, manteniendo constante la ganancia de peso a edad más temprana. En ambas situaciones, la respuesta a la selección de ganancia de peso estuvo acompañada por cambios similares, pero menos pronunciados, en la longitud de la cola¹⁵.

En el otro grupo, la presencia de malformaciones en las colas fue independiente de la selección de peso. Estas malformaciones fueron similares a las descritas por otros autores y se deberían a mutaciones que pueden ocasionar fusiones entre vértebras vecinas, torsiones y defectos angulares, afectar la fertilidad, el desarrollo embrionario y el crecimiento^{8, 5, 19, 4}.

En las líneas estudiadas se observó que la menor cantidad de vértebras caudales está

asociada a caracteres relacionados con la estructura ovárica y testicular, y a un menor número de oocitos maduros disponibles para ser fecundados. Ellos podrían ser el origen de una posible subfertilidad que se expresó en un menor porcentaje de pariciones cuando alguno o ambos padres presentaron colas cortas.

Como está descripto, la presencia de la mutación "brachyury" en homocigosis genera defectos en la diferenciación de la notocorda y en la formación del mesodermo, lo cual lleva a la falta de tronco y cola provocando, la muerte del embrión alrededor del día 10. Los heterocigotos, en cambio, tienen una cola corta y un número menor de vértebras sacras. Estos resultados plantean probar a futuro si el modo de herencia del carácter cola corta coincide con el descripto por Silver en el año 1995¹⁷. Si fuera así, podría generarse una sublínea de ratones con ausencia de vértebras caudales como modelo experimental para el estudio de los efectos de estas mutaciones, que están presentes en otras especies y que están asociadas, entre otros, a problemas de fertilidad, crecimiento y desarrollo.

CONCLUSIONES

En estas líneas de ratones, se ha demostrado que la longitud de la cola constituye un buen indicador del número de vértebras caudales.

La respuesta a la selección de peso estuvo acompañada por modificaciones en la longitud de la cola asociada positivamente a ese carácter seleccionado. En cambio, la presencia de malformaciones en las colas fue independiente de la selección de peso.

La menor cantidad de vértebras caudales está asociada a caracteres relacionados con la estructura ovárica y testicular, y a un menor número de oocitos maduros disponibles para ser fecundados. Esto último podría estar relacionado a la subfertilidad que, a veces, se expresa cuando alguno o ambos componentes de la pareja presentaron colas cortas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Hill, F. and Wright, A. The effects of changes in the

- environmental temperature on the growth of bone in the mouse. Radiological and morphological study. *Br. J. exp. Path.* 1983; 64, 43.
2. AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA: American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia). 2007. En: http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf, Consultado en febrero de 2009.
 3. Barnett, S. A. Genotype and environment in tail length in mice *Experimental Physiology*. 1965; 50: 417-429.
 4. Benavides, F. J.; Guénet, J. L. *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá. SECAL. Laboratory Animals Ltd. 2003.
 5. Bennett, D. and Dunn, L. C. Genetical and embryological comparisons of semilethal t-alleles from wild mouse populations. *Genetics* 1968; 61:411-422.
 6. Bernardi, S. F.; Brogliatti, G.; Oyarzabal, M. I. Ovarian Structure in Mice Lines Selected for Weight. *Anat Histol Embryol*. 2009; 38: 200-03.
 7. Bernardi, S.; Brogliatti, G.; Oyarzabal, M. I. Estructura testicular y calidad seminal en ratones seleccionados por peso. *Int. J. Morphol.* 2010; 28(3):673-80.
 8. Dunn, L. C. and Caspari, E. A case of neighboring loci with similar effects. *Genetics*. 1945; 30:543-568.
 9. Falconer, D. S. *Introducción a la Genética Cuantitativa*. CECSA. 2da. Edición. México. 1981.
 10. Harrison, G. A.; Morton, R. J.; Weiner, J. S. The Growth in Weight and Tail Length of Inbred and Hybrid Mice Reared at Two Different Temperatures. I. Growth in Weight. II. Tail Length. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1959; 242 (695): 479-516.
 11. Institute of Laboratory animal Resources. Commission on life sciences. Natural research council. *Guide for the Care and use of Laboratory Animals*. National Academy Press. Washington, D. C., 1996.
 12. Noel, J. F. and Wright, E. A. The effect of environmental temperature on the growth of vertebrae in the tail of the mouse. *Embryol. exp. Morph.* 1970; 24 (2): 405-410.
 13. Oyarzabal, M. I. y S. L. Rabasa. Selección divergente de peso en ratones con alta endocría seguida de 90 generaciones de cría libre. *Mendeliana*. 1995; 10:119-132.
 14. Oyarzabal, M. I. y S. L. Rabasa. Riqueza genética y estabilidad en ratones de la cepa CF1. *Mendeliana*. 1999; 13:74-84.
 15. Rhees, B. K. and Atchley, W. R. Body Weight and Tail Length Divergence in Mice Selected for Rate of Development. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*. 2000; 288:151-164.
 16. Serrat, M.A.; King, D.; Owen Lovejoy, C. Temperature regulates limb length in homeotherms by directly modulating cartilage growth. 2008. PNAS 105 (49): 19348-53. En: www.pnas.org/cgi/content/full/0803319105/DCSupplemental. Consultado 20 de julio de 2011.
 17. Silver, L. M. Mouse Genetics. Concepts and Applications. 1995. En: www.informatics.jax.org/silver/. Consultado en octubre de 2011.
 18. Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. *Biometría, principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H. Blume Ediciones, Madrid, España, 1979.
 19. Strickberger, M. W. *Genética*. Ediciones Omega S. A. Barcelona. 1978.
 20. Suckow, M.A.; Danneman, P.; Braylon, C. 2001. *Laboratory mouse*. Ed. CRC Press LLC. Pág.15. Washington. D.C. USA.

