# Cénes que protegen a la célula.



Nutria gigante de río

## ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN HSP70-2 DE MUSTÉLIDOS

Moncayo, E1., Guevara, S1

 Profesores Departamento de Ciencias Naturales, Gimnasio Campestre Dirección para correspondencia emoncayo@campestre.edu.co

> Recibido: 16 de abril Aprobado: 30 de agosto

### RESUMEN

Las proteínas de choque térmico HSP70-2 han sido ampliamente estudiadas por su importante función en la conservación de la integridad celular y del organismo.

La presente investigación muestra los pasos seguidos en la estandarización de las condiciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para amplificar el gen HSP70-2 usando iniciadores diseñados para este gen a partir de la secuencia en humanos, utilizando muestras de ADN de diferentes mustélidos.

Este trabajo pretende además continuar con los estudios moleculares de este grupo de animales carnívoros que se encuentran actualmente en riesgo de extinción.

PALABRAS CLAVE: Extinción, Proteínas de choque térmico HSP70-2, Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), Mustélidos.

## **A**BSTRACT

Heat shock proteins HSP70-2 has been studied widely due to its important physiology function in cellular and organism integrity conservation.

This paper shows followed steps to standardized Polymerase Chain Reaction (PCR) by primers genes from human secuence, using DNA of different mustélidos.

This work pretend to continue molecular studies with this carnivore group of animals, because of its present extinction risk.

**KEY WORDS:** *Extinction,* Heat shock proteins HSP70-2, Polymerase Chain Reaction (PCR), *Mustélidos.* 

## NTRODUCCIÓN

Las respuestas de las células o de los organismos al estrés ambiental, a cambios térmicos o contaminantes químicos se realizan mediante la síntesis y acción rápida y coordinada de un número de proteínas conocidas como HSP o proteínas del choque térmico que son abundantes a nivel celular. Cerca del 5% de las proteínas celulares son HSP y se constituye en la respuesta más conservada en el ámbito genético durante los procesos de evolución (Barbara & Polla, 1994).

La respuesta fisiológica al choque térmico fue descrita inicialmente por Ritossa en 1962, al observar la aparición de una serie nueva de abultamientos sobre los cromosomas de la mosca de la fruta *Drosophila busckii*, estos abultamientos eran inducidos tanto por calor como por fenol o salicilato sódico; sólo fue hasta 1974 cuando Tissieres y colaboradores pusieron de manifiesto las proteínas del choque térmico. A partir de este momento el choque térmico ha sido tomado como sistema modelo para investigar la estructura y regulación génica en *Drosophila spp*.

Hasta 1978, algunos investigadores descubrieron que también en otros organismos la respuesta al calor y otros tipos de estrés podían inducir la síntesis de estas proteínas, en los últimos años se ha descrito que estas proteínas se expresan constitutivamente a las temperaturas normales de desarrollo y crecimiento y desempeñan un papel vital en el metabolismo celular (Morimoto & Tissieres, 1994).

Estas HSP son inducidas por niveles moderados de sustancias tóxicas como mercurio, plomo, otros metales pesados y sustancias químicas denaturantes que afectan el metabolismo natural o normal. Las HSP también son inducidas mediante niveles moderados de estrés que protegen el organismo contra niveles más severos, adaptándolos para sobrevivir en ambientes extremos; pasan de ser una proteína constitutiva a ser proteínas inducibles que se expresan en la membrana y en algunos organelos proveyéndoles de defensa contra estos eventos (Barbara & Polla, 1994).

En infecciones de tipo parasitario al nivel de mamíferos ocurre un hecho muy curioso: las HSP70-2 actúan como blanco para el sistema inmune del huésped y como un factor protector para el parásito jugando una doble función. Por lo tanto, es básico e importante el estudio y la acción de esta proteína debido a que la gama de actividades que desempeñan las hace importantes en eventos como el diagnóstico, pronóstico y aplicación terapéutica en un gran número de enfermedades (Feigi & Polla, 1994).

## METODOLOGÍA

EXTRACCIÓN DE **DNA** A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE TOTAL DE LOS MUSTÉLIDOS ESTUDIADOS (*Pteronura brasiliensis, Lontra longicaudis, Eira barbara y Galictis vittata*).

Se emplearon muestras tomadas a partir de sangre total de los mustélidos en jeringas y vacutainers que contienen EDTA, para la extracción de DNA genómico para su utilización en la reacción de amplificación del gen hsp70-2 se ensayaron los métodos de "salting out" y el de fenol cloroformo; el pellet se sacó y se resuspendió en 50  $\mu$ L de  $H_2$ O destilada-desionizada estéril y se conservó a  $-20^{\circ}$ C hasta su utilización.

El DNA se cuantificó por comparación visual después de la electroforésis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio con las bandas de un DNA standar 1kb (Gibco, USA –technologies), de concentración conocida. Por espectrofotometría se leyó la pureza del DNA utilizando un GenQuant Calculador de RNA/DNA Pharmacia Biotechnologies.

#### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la estandarización de las condiciones de PCR que permitieran amplificar el gen de HSP70-2 de manera específica se realizaron ensayos de amplificación con los oligonucleótidos diseñados así:

5 PRIM- 1: 5'- TCC GAA GGA CTG AGC TCT TG-3' 3- PRIM-2-5'- GAC CAA AGT CCT TGA GTC CC-3'

Los oligonucleótidos considerados específicos reconocen regiones conservadas de genes que codifican para las proteínas de la familia HSP70-2, y fueron diseñados a partir de trabajos anteriores.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo inicialmente en un volúmen final de 25µL, utilizando como referencia las mezcla de reacción standard del GeneAmp kit (Perkin Elmer Cetus). Esta mezcla recomienda el uso de 0.1 a 0.5 µM de cada oligonucleótido, 200 µM de cada dNTP, 1X PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 y 1.5 mM MgCl2) y 0.5 a 5 U de Taq DNA polimerasa. Sin embargo se evaluaron diferentes concentraciones de oligonucleótidos (0.1-1.0 µM); MgCl<sub>2</sub> (1.0-5 mM), Taq DNA Polimerasa (0.5 U) y diferentes concentraciones de DNA genómico (10-500 ng). Además, se probaron varias temperaturas de anillaje de los oligonucleótidos (48, 50, 53 y 55°C), partiendo de la fórmula para obtener la Temperatura media TM:2 (A+T) + 4 (G+C). Además se ensayaron programas de amplificación los cuales se presentan en la Tabla 1.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., USA) y después de la reacción, una alícuota de cada muestra fue analizada por electroforésis en geles de agarosa al 1%.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. Extracción y concentración de DNA de Mustélidos Amplificación del Gen hsp70-2 de Mustélidos mediante PCR

A continuación se presentan los resultados de las diferentes metodologías empleadas en este estudio para amplificar el gen hsp70-2 de mustélidos. El objetivo final fue establecer el tamaño de los productos del gen hsp70-2 amplificados por técnica PCR, utilizando oligos (Primers) de hsp70-2 humano diseñados a partir de la secuencia reportada por Cambell & Milner (1990) del gen hsp70-2, amplificando una región de aproximadamente 2000 pb.

PROGRAMA			HIBRIDACIÓN A 60° Y 55° C	SÍNTESIS A 72° C	INCUBACIÓN FINAL 72° C
1	5 minutos	3 ciclos 1 min	1 minuto	3 minutos	10 minutos
2	1 minutos	15 ciclos 1 min	5 minutos	1 minuto	5 minutos
3	3 minutos	15 ciclos 1 min	3 minutos	3 minutos	10 minutos

Tabla 1 Programas de Amplificación.

La calidad y concentración del DNA son aspectos importantes para una reacción normal de amplificación por **PCR** (Gibbs *et al.*, 1992). Se presentan fotografías del DNA extraído de sangre total de mustélidos, después de su electroforésis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, siguiendo la metodología de extracción de DNA de fenol-cloroformo y "Salting out", como se puede observar, la calidad y apariencia del DNA aislado por los dos métodos son diferentes (Figura 1 y Figura 2A).

La concentración relativa del DNA aislado varió considerablemente dependiendo del método de extracción; de unos pocos nanogramos en unas muestras, hasta el orden de los microgramos en otras. En algunos casos, la concentración de DNA fue tan baja que no se pudo detectar visualmente en los geles. Por este motivo, fue necesario cuantificar el DNA obtenido usando un método espectrofotométrico después de cada extracción; con el fin de asegurar la concentración y pureza requerida en todas las muestras antes de proceder a la amplificación del segmento genético que codifica la proteína hsp70.-2 (Tabla 3).

En general, para la reacción de amplificación por PCR se considera que una concentración adecuada de DNA molde es alrededor de 1  $\mu$ g/ml (Gibbs et al., 1992; Hosta & Flick, 1992; Williams *et al.*, 1993), equivalente a 10-100 ng de DNA por reacción (10² a 10 copias de DNA blanco).

## 2. Pruebas de especificidad y concentración de oligonucleótidos:

5'PRIM-1 HSP70-2

Secuencia 5'-TCC GAA GGA CTG AGC TCT TG-3'

Peso molecular 7,545.00 Contenido de GC 55.0% Tm(50 mM de NaCl) 57. 28°C

3'PRIM-2 HSP70-2

Secuencia 5' – GAC CAA AGT CCT TGA GTC CC- 3'

Peso molecular 7,477.00 Contenido de GC 55.0% Tm(50 mM de NaCl) 56. 57°C



**Figura 1.** Aislamiento de DNA genómico de mustélidos, método fenol-cloroformo.

DNA obtenido a partir de sangre total de diferentes mustélidos, en zoológicos colombianos. Carriles 1 a 6: DNA de nutria gigante de río *Pteronura brasilensis*; carriles 7-11 DNA de nutria de río *Lontra longicaudis*; carriles 12-14 DNA de taira *Eira barbara*, carriles 15-16 DNA de hurón o grisón *Galictis vittata*.

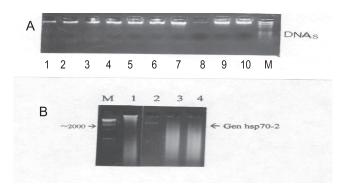


Figura 2 A. Aislamiento de DNA genómico de mustélidos, método Salting-out.

DNA obtenido a partir de sangre total de diferentes mustélidos, en zoológicos colombianos. En los carriles se muestran carriles 1-3: DNA de nutria gigante de río *Pteronura brasilensis*; carriles 4-6 DNA de nutria de río *Lontra longicaudis*; carriles 7-8 DNA de taira *Eira barbara, carriles* 9-10 DNA de hurón o grisón *Galictis vittata* M: marcador de peso molecular 2 Kb. (Gibco, USA Technologies).

**B.** Primera fase de la estandarización de la técnica para amplificar el gen HSP70-2 en mustelidos. Se utilizó nutria gigante de río *Pteronura brasilensis*.

Para comprobar la especificidad del juego de oligonucleótidos seleccionados, se realizaron reacciones estándar independientes de amplificación por PCR del gen HSP70-2 de nutría; a partir del DNA aislado de sangre total de mustélidos correspondiente (la cual contiene el gen a amplificar). De igual manera, bajo las mismas condiciones de reacción y empleando DNA humano aislado por los dos métodos antes

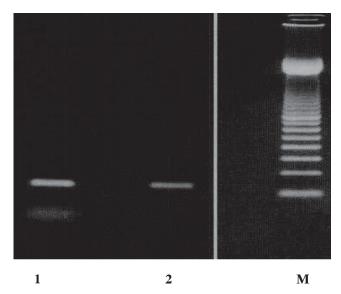


Figura 3. Amplificación del Gen HSP70-2, con los iniciadores del Gen humano

1: Gen obtenido de Humano 2: Gen obtenido de nutria gigante de río Pteronura brasilensis. **M**: marcador de peso molecular 2 Kb.

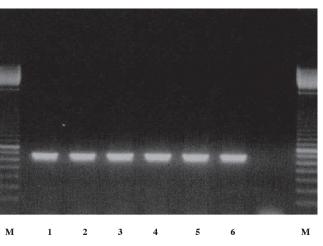


Figura 4: Amplificación del Gen HSP70-2 de mustélidos, siguiendo la técnica estandarizada.

M: marcador de peso molecular 2 Kb.; carriles 1-2: Nutria gigante de río *Pteronura brasilensis*; carriles 3-4 Nutria de río *Lontra longicaudis*; carril 5 Taira *Eira barbara*, carril 6 Hurón o grisón *Galictis vittata*.

mencionados, se amplificaron los diferentes productos utilizando la mezcla de oligonucleótidos; básicamente, las concentraciones reportadas permitieron amplificar de manera específica los fragmentos del gen hsp70-2 para los cuales fueron diseñados y el tamaño de los productos de amplificación, en algunos casos, estuvieron de acuerdo con lo esperado.

Sin embargo, se observaron bandas extras de DNA en los geles, correspondientes posiblemente a amplificaciones inespecíficas, que pueden estar influidas por: la calidad y concentración del DNA genómico, las secuencias de los genes a amplificar (contenido de G y C) y las concentraciones de oligonucleótidos, así como también por la concentración de Mg²+ (Rychlik, 1995).

La concentración de oligonucleótidos en una reacción estándar oscila entre 0.1- $0.5\,\mu\text{M}$  (GeneAmp Kit, Perkin Elmer Cetus; Saiki, 1992). Con el fin de optimizar las condiciones de reacción, se evaluaron concentraciones desde 0.1 hasta  $1\,\mu\text{M}$ . Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los resultados de las amplificaciones utilizando este rango de concentración de oligonucleótidos, aunque las altas concentraciones incrementaron ligeramente la aparición de amplificaciones inespecíficas, por lo tanto para las reacciones de PCR se empleó una concentración de oligonucleótidos de  $0.125\,\mu\text{M}$ . (Figura 2B).

#### 3. Concentración de MgCl2 y Taq DNA Polimerasa.

La concentración de MgCl₂ en la mezcla de reacción para la PCR, puede tener un profundo efecto en la especificidad y el producto de la amplificación (Saiki, 1992; Williams *et al.*, 1993); los iones Mg²+ forman un complejo soluble con los dNTPs, esencial para su incorporación durante la reacción de amplificación, y estimulan además la actividad de la Polimerasa; incrementando la temperatura media™ de la interacción entre la cadena de DNA y los oligonucleótidos (Saiki, 1992). Regularmente la concentración de MgCl₂ utilizada en una reacción estándar de PCR es de 1.5 mM (Saiki, 1992; Williams *et al.*, 1993), muestra el efecto de varias concentraciones de MgCl₂ sobre los productos de la amplificación del gen HSP70 utilizando la combinación de oligonucleótidos específicos.

Se observó que a concentraciones por debajo de  $2.5\,$  mM de  ${\rm MgCl_2}$ , aparecen en los perfiles de amplificación dos bandas inespecíficas de alto peso molecular (aprox. 1600 pb) y los productos de la amplificación de los genes hsp70-2 son bastantes tenues; por lo tanto, la concentración de  ${\rm MgCl_2}$  escogida para la amplificación de los genes hsp70 en este estudio fue de 3 mM .

En una reacción estándar de PCR la concentración de Taq DNA Polimerasa que se utiliza es aproximadamente

ESPECIE	No. DE REGISTRO INTERNO <sup>1</sup>	ORIGEN GEOGRÁFICO <sup>2</sup>	LOCALIZACIÓN ZOOLÓGICOS COLOMBIANOS <sup>3</sup>	SEXO	
Pteronura brasiliensis	1001	Río Bita	Cali	F	
(Nutria Gigante de Río)		Vichada			
(Nutria Gigante de 100)	1002	Orinoco	Cali	М	
	2001	Meta	Cali	F	
Lontra longicaudis	2002	Meta	Cali	М	
(Nutría de Río)	3001	Sin datos	Pereira- Matecaña	F	
	3002	Sin datos	Pereira- Matecaña	М	
	3101	Sin datos	Santafé de Medellín	F	
	3102	Sin datos	Santafé de Medellín	М	
	3201	Valle del Cesar	Barranquilla	F	
Eira barbara	3202	Valle del Cesar	Barranquilla	М	
(Taira)	3301	Valle Andino	Santacruz- La Mesa	F	
	3301	Cundiboyacense	Cundinamarca		
	3302	Valle Andino	Santacruz- La Mesa	М	
		Cundiboyacense	Cundinamarca		
	4002	Sin datos	Pereira- Matecaña	М	
Galictis vittata	4101	Sin datos	Santafé de Medellín	F	
(Hurón- Grisón)	4102	Sin datos	Santafé de Medellín	М	
	4202	Valle del Cesar	Barranquilla	М	

<sup>1.</sup> El número de registro se realizó para fines pertinentes a este estudio. No corresponde a números de registro de los zoológicos, ni son consecutivos. En los zoológicos donde se obtuvieron las muestras no se lleva este número de registro.

- 2. Sitio donde el animal fue capturado para su posterior monitoreo en los zoológicos.
- 3. Localización del animal en el momento del muestreo.

Tabla 2. Origen geográfico y localización de los mustélidos utilizados en este estudio.

ESPECIE	No. DE REGISTRO INTERNO	1 PUREZA DEL DNA GENÓMICO (%)	2 CONCENTRACIÓN DEL DNA GENÓMICO
Pteronura brasiliensis	1001	96	200 ng/μl
Pleronura prasiliensis	1002	95	150 ng/μl
Lontra longicaudis	2001	98	200 ng/μl
Lontra longicadois	2002	96	200 ng/μl
	3001	70	100 ng/μl
	3002	75	100 ng/μl
	3101	70	50 ng/μl
Eira barbara	3102	75	100 ng/μl
(Taira)	3201	60	100 ng/μl
	3202	65	100 ng/μl
	3301	90	150 ng/μl
	3302	85	100 ng/μl
	4002	80	50 ng/μl
Galictis vittata	4101	85	100 ng/µl
(Hurón- Grisón)	4102	90	150 ng/µl
	4202	85	150 ng/µl

<sup>1.</sup> Se leyó la pureza del DNA en un espectofotómetro de 260 a 280 nm.

Tabla 3. Concentración y pureza del DNA genómico obtenido de los mustélidos estudiados.

de 2.5 U/50 µl de mezcla de reacción (Saiki, 1992). Sin embargo, para la amplificación de genes hsp70-2 humano, se han utilizado concentraciones que oscilan entre 0.25-2.5 U/50 μl (Saiki, 1992). En este trabajo, se estudió el efecto de varias concentraciones de Tag DNA Polimerasa sobre los productos de la amplificación del gen hsp70-2. Aunque la intensidad de los fragmentos de los genes amplificados aumentó proporcionalmente con la concentración de la Polimerasa, las diferencias en el rango de concentración empleado (1-4 U/50 µI) no fueron muy significativas. Sin embargo, como en el caso de concentración de oligonucleótidos, altos niveles de Polimerasa tienden a amplificar fragmentos inespecíficos. Por lo tanto la concentración empleada para el análisis del Gen hsp70-2 fue de (0.5.10) Taq. DNA polimerasa (Figura 3).

## 4. Temperaturas de hibridación y programas de amplificación.

La temperatura de hibridación de los oligonucleótidos con el DNA blanco depende de su longitud y contenido de G v C. Regularmente, las temperaturas de hibridación se determinan empíricamente para cada mezcla de oligonucleótidos (Myers et al., 1992), de acuerdo con Saiki (1992), una temperatura de 55°C es un buen punto de partida para oligonucleótidos de 20 pares de bases que tengan un contenido de GC cercano al 50%; sin embargo, se tuvo en cuenta que su temperatura de disociación fuera la misma (aproximadamente 55°C). Por lo tanto, se ensayaron temperaturas de hibridación de 48-55°C en los que se presentan los productos de amplificación de los genes HSP70 de mustélidos, obtenidos con los oligonucleótidos de las diferentes temperaturas de hibridación. Como se puede obser-

<sup>2.</sup> Se utilizó el protocolo para extracción de DNA por "Saalting out".

var, a la temperatura más baja de hibridación ensayada (48°C), además de los productos esperados para el gen, se obtuvo una banda inespecífica adicional entre los fragmentos. Este producto inespecífico se fue diluyendo conforme se aumentó la temperatura de hibridación, hasta desaparecer casi por completo a 55°C. Adicionalmente, a la máxima temperatura (55°C), la intensidad del fragmento hsp70-2 disminuyó notablemente. En general este resultado prueba que a mayores temperaturas, la astringencia en la hibridación de los oligonucleótidos es mayor y con esto su especificidad (Myers et al., 1992; Saiki, 1992).

La amplificación de fragmentos de DNA por PCR se lleva a cabo en tres etapas que se repiten cíclicamente en el tiempo, en un termociclador. Estas etapas son: i) la denaturación (separación o linearización) de la doble cadena de DNA, ii) la hibridación de los oligonucleótidos con las regiones homológas en el DNA blanco y finalmente iii) la amplificación o síntesis del DNA por la enzima termo resistente Taq DNA Polimerasa. En una reacción típica de PCR, la denaturación se realiza por calentamiento de la muestra a 90-95°C, los oligonucleótidos se anillan con la secuencia complementaria a 40-60°C y los fragmentos de DNA son sintetizados a 70-75°C (Saiki, 1992). La duración de cada una de las etapas en cada ciclo puede variar desde 1 minuto hasta 10 minutos. En este estudio se ensayaron tres programas de amplificación que incluyeron tiempos de incubación de 1 minuto, 5 minutos y 10 minutos para todas las tres etapas de cada ciclo. Los resultados obtenidos permitieron determinar que el tiempo de incubación para amplificar el gen HSP70-2 es muy importante, máximo cuando se usan primers interespecíficos, por lo tanto, el poder identificar con precisión mediante la técnica de PCR el gen HSP70-2 de mustélidos, es de gran importancia para posteriores estudios en la conservación estos especímenes y de otras especies de interés (Figura 4).

## CONCLUSIONES

Las condiciones más apropiadas para la amplificación por técnica PCR del gen hsp70-2, incluye la utilización en un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l usando: 300 ng de DNA, 200  $\mu$  /L de dNTP $_5$  1.5 mM MgCl $_2$  1 X Taq DNA polimerasa buffer, 1 $\mu$  Mol cada primer y 1 unidad de Taq. Polimerasa y de un programa de amplificación de: Incubación inicial 94° C y 5 minutos seguido de 30 ciclos a 94° C por un minuto; 60° C por 1 minuto, 72° C 3 minutos y una extensión final de 72° C por 10 minutos.

Los productos amplificados del gen hsp70-2 de *Mus-télidos* correspondieron al tamaño reportado por este gen en humanos, de aproximadamente 2000 pares de bases.

## **Perspectivas**

La presente investigación pretende ser la base de próximos estudios moleculares de este grupo de animales carnívoros con el fin de relacionarlos con respuesta inmune a nivel celular, como aporte a su conservación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestros más sinceros agradecimientos a:

- Dr. Jaime Bernal Villegas, Director del Instituto de Genética Humana de la Universidad Javeríana.
- Luz Helena Aljure, Coordinadora de los Centros de Estudio del Gimnasio Campestre.
- Zoológico Jaime Duque, Zoológico de Cali, Zoológico Matecaña (Pereira),
- Zoológico SantaFé (Medellín) y Zoológico de Barranquilla.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Morimoto, R.I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C. 1994. The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, New York, NY

Williams, J.A., Paddock, S.W., Carroll, S.B. (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing Drosophila wing disc into discrete subregions. Development 117(2): 571—584Rychlik, W. (1995) Priming efficiency in PCR. Biotechniques, 18, 84–90[ISI][Medline].

David L. Pompliano, \*.t Elaine Rands,\* Michael D. Schaber,\* Scott D. Mosser,\* Neville J. Anthony,g and Jackson B. Gibbs, Steady-State Kinetic Mechanism of Ras Farnesy1:Protein Transferase Biochemistry 1992, 31, 3800-3807

Hosta L, Flick P (1992) Enhancement of specificity and yield in PCR. Comments 18:1–5. US Biochem Crop, USA

Emmons Louise H. Mamíferos de los bosques húmedos de América Tropical. Una Guía de Campo. FAN Bolivia p.p 164-165. 1999

6. Valladares M. Ríos vivos para la nutria. Fondo Mundial para la Naturaleza. Madrid: 1996; 10-19The University of Michigan – Museum of Zoology – Animal Diversity Web/ADW Home/Animal/Search/Pteronura brasiliensis Grant Otters.

http://www.oit.itd.umich.edu/bio/doc.cgi/Chordata/Mammali.

Stailo E, Schenck C, eds. Lobo del Río Frankfurt: Esta –Druck, S. Tafertshofer Polling, 1994; 1-24

Macdonald D, ed. The Encyclopedia of Mammals. New York: 1995; 124-129

Bisbal E., F. 1986. Food habits of some neotropical carnivores in Venezuela (Mammalia, Carnivora). Mammalia, 50(3): 329-340

Reid, F. 1997A Field Guide to the Mammals of Central America and Southeastern Mexico. Oxford University Press

Mares, N., R. Ojeda, R. Barquez. 1989. Guide to the Mammals of Salta Province, Argentina. University of Oklahoma Press

Rodriguez José Vicente, 1998. Listas preliminares de mamíferos colombianos con algún riesgo a la extinción. Informe final presentado

al instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt

Stailo E, Schenck C, eds. Lobo del Río Frankfurt: Esta –Druck, S. Tafertshofer Polling, 1994; 1-24

http://www.oit.itd.umich.edu/bio/doc.cgi/Chordata/Mammali... http://www.humboldt.org.co/conservacion/Listas\_Preliminares.htm

http://www.wzar.unizar.es/invest/vinv/linv/dep/anat\_embriol.htmlwww.pt.wkhealth.com/pt/re/agen/fulltext.00000556-200012000-00014.htm

www.siicsalud.com/dato/dat041/05208016.htm

Genetic variation in the tumor necrosis factor-a promoter region and in the stress protein hsp70-2 - grupo de 5 »...

Ahmed, A Khedhaier, BB Jrad, S Remadi, L Chouchane - Cancer, 2001 - doi.wiley.com... Pathol Oncol Res 1998;4:316–21. 23.

Chouchane L, Ben Ahmed S, Baccouche S, Remadi S. Poly-morphism in the tumor necrosis ... Cancer 1997;80:1489–96. 24. ... Citado por 37 - Artículos relacionados - Búsqueda en la web Polymorphism of the stress protein HSP70-2 gene is associated with the susceptibility to the ... - grupo

Gargouri, M Corbex, S Ben Ahmed, L Chouchane - Cancer Letters, 2003 – Elsevier ... J. Clin. Oncol. 15 (1997), pp. 499–508. ... 39.

M. Souhir, N. Bouaouina, S. Ben Ahmed, A. Khedaier, BB Jrad, S. Remadi and L. Chouchane, Genetic variation in ... Citado por 16 - Artículos relacionados - Búsqueda en la web Hereditary predisposition to breast cancer: epidemiologic and clinico-anatomic features in 11

S Ben Ahmed, K Monastiri, L Chouchane, M el Ouali, ... - Tunis Med, 1997 - ncbi.nlm.nih.govTunis Med. 1997 Mar;75(3):111-6 ... and clinico-anatomic features in 11 Tunisian families] [Article in French] Ben Ahmed S, Monastiri K, Chouchane L, el ... Búsqueda en la web