



Componentes principales como fenotipos de sistemas biológicos complejos. Relación músculo-hueso en el ratón (*Mus musculus*)

Di Masso RJ*, Pippa C, Silva PS, Font MT

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. CIC-UNR

*Correspondencia a: Dr. Ricardo José Di Masso. Instituto de Genética Experimental - Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Rosario. Santa Fe 3100. 2000 Rosario.
E mail: rjdimasso@gmail.com

ABSTRACT

Principal components analysis classifies the phenotypic variation of a population into independent systems of correlated traits. It has been postulated that principal components can be used to identify genetic networks involved in regulating complex biological systems as each individual in the population has values which may be associated with phenotypes susceptible to be analyzed genetically. The technique was applied to five traits involved in muscle-bone relationship (PESMUS: gastrocnemius muscle weight; PESTIB and PESFEM: weight of tibia and femur, and LONFEM and LONTIB: length of femur and tibia) measured at 150 days of age in males (n = 336) and females (n = 319) of a segregating population (F2) of mice derived from crossing two lines selected for body conformation. The three first principal components explained almost the same proportion of the total variance (87%) in males and females. The first component (PC1) explained 60% of the generalized variance and was negatively associated with the five muscle-bone indicators, so it may be considered as an indicator of body size. The second component (PC2) explained 15% of the total variance and was associated with bone length with little effect on bone weight and muscle weight so it can be interpreted as an indicator of skeleton length. The third component explained 12% of the variance and was associated with muscle weight, with little effect on bone weight and no effect on bone length, so it can be interpreted as an indicator of the biomass sustained. The results indicate the coexistence of independent sources of phenotypic variance in the characterization of this complex biological system that allow to identify particular combinations of the triad -body size, skeleton as a scaffold for soft tissues and biomass sustained.

Key words: femur, tibia, gastrocnemius muscle, body size, artificial selection

RESUMEN

El análisis de componentes principales clasifica la variación fenotípica en sistemas independientes de caracteres correlacionados. Se ha postulado que las componentes pueden utilizarse para identificar redes genéticas involucradas en la regulación de sistemas complejos dado que cada individuo de la población presenta valores que pueden asociarse con fenotipos susceptibles de analizarse genéticamente. La técnica se aplicó a cinco indicadores de la relación músculo-hueso (PESMUS: peso del músculo gastrocnemio, PESFEM y PESTIB: peso del fémur y de la tibia, y LONFEM y LONTIB: longitud del fémur y de la tibia) medidos a los 150 días de edad en machos (n=336) y hembras (n=319) de una población segregante (F2) de ratones proveniente del cruzamiento entre dos líneas seleccionadas por conformación corporal. Las tres primeras componentes explicaron similar proporción de la variancia total (87%) en ambos sexos. La primera (PC1) explicó el 60% de la variancia y se asoció negativamente con los cinco indicadores por lo que puede ser considerada un indicador de tamaño corporal. La segunda (PC2) explicó el 15% de la variancia y se asoció con la longitud del hueso con poco efecto sobre el peso del hueso y el peso del músculo que en él se inserta por lo que puede ser interpretada como un indicador de longitud del esqueleto, base de sustentación de los tejidos blandos. La tercera explicó el 12% de la variancia y se asoció con el peso del músculo, con escaso efecto sobre el peso del hueso y nulo sobre su longitud por lo que puede ser interpretada como un indicador de la biomasa sustentada. Los resultados indican la coexistencia de fuentes independientes de variancia fenotípica en la caracterización de este sistema biológico complejo que permiten identificar combinaciones particulares de la tríada tamaño corporal-base ósea de sustentación- biomasa sustentada.

Palabras clave: fémur, tibia, gastrocnemio, tamaño corporal, selección artificial

INTRODUCCIÓN

La selección artificial, al actuar sobre la variabilidad genética presente en una población animal, es capaz de modificar rápidamente aquellos caracteres de alta heredabilidad como es el caso de los caracteres anatómicos. El perro doméstico (*Canis lupus familiaris*), considerada la especie de mamífero en existencia con mayor diversidad morfológica, constituye un ejemplo clásico en este sentido. Todas las razas de perros, desde el Daschshund y el Chihuahua hasta el Gran Danés y el Bulldog, descienden del lobo gris (*Canis lupus*) y son producto de procesos de selección artificial que el hombre inició hace más de 100.000 años. Dada la rapidez y la coherencia con que han tenido lugar tales adaptaciones funcionales se ha sugerido (Chase *et al.*, 2002) que en esta especie la selección habría actuado sobre unos pocos loci que controlan múltiples estructuras morfológicas.

El análisis multivariado de componentes principales es una técnica que permite clasificar la variación fenotípica en sistemas independientes de caracteres correlacionados. Cada individuo incluido en el análisis presenta un valor de cada una de las componentes, las que constituyen, por lo tanto, fenotipos susceptibles de ser sometidos a análisis genético y para los cuales es posible identificar QTLs informativos (Batista Pinto *et al.*, 2006; Yamaki *et al.*, 2006). Como producto de este enfoque, la genética de los componentes principales puede utilizarse como una herramienta en la identificación de las redes genéticas involucradas en la regulación de sistemas biológicos complejos.

Desde un punto de vista funcional el músculo y el hueso desempeñan funciones de naturaleza mecánica, a diferencia de la grasa corporal que como tejido presenta predominantemente funciones aislantes y de reserva. La diferencia básica entre ambos a este respecto radica en que mientras el músculo se encuentra involucrado activamente en el mantenimiento de la postura corporal y en la locomoción de los animales, el hueso desempeña un rol comparativamente pasi-

vo en la transmisión y el almacenamiento de esa energía (Davies, 1989). Dentro de este contexto resulta crucial reconocer que los huesos largos parecen tener un programa genético que determina su eventual longitud, y que los mecanismos paracrinos de regulación tienen una importancia crítica en la regulación de ese crecimiento lineal (Goss, 1986). Por otra parte, de acuerdo con Schiessl *et al.* (1998), los músculos y los huesos crecen en forma proporcional unos a otros, presumiblemente porque el hueso se encuentra ligado biomecánicamente al músculo y los huesos se adaptan a las fuerzas musculares durante el desarrollo. Esta idea ya había sido expuesta por D'Arcy Thompson (1917) cuando expresó que “entre músculo y hueso no puede existir cambio en uno de ellos que no esté correlacionado con cambios en el otro” y “músculo y hueso se encuentran asociados en forma inseparable, moldeados uno con el otro, son en conjunto”. Hooper (1978a) observó una amplia similitud en el control genético cuantitativo del crecimiento de músculos y huesos en líneas de ratones seleccionados para alto o bajo peso corporal cuando se las estudia al mismo peso corporal. Aún más, como los músculos y los huesos funcionalmente relacionados responden de manera similar a la selección artificial Hooper (1978b), propuso la hipótesis que la placa epifisiaria actuaría como un marcapasos para el crecimiento muscular-esquelético. De acuerdo con esta hipótesis, el aumento de tensión originado por el crecimiento longitudinal de un hueso produce un aumento en la masa de los músculos que en él se insertan; mientras que la mayor fuerza ejercida por esos músculos de mayor tamaño aumenta el diámetro y la masa del hueso. La relación músculo-hueso en el ratón puede ser considerada como un fenotipo complejo en tanto supone la modificación simultánea de la longitud del hueso, el peso del músculo que en él se inserta y el peso del hueso.

Las líneas de ratón CBI, originadas por selección artificial en el Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Rosario), representan un recurso adecuado para el estudio de las in-

teracciones músculo-hueso en tanto permitieron demostrar la posibilidad de alargar los huesos y evitar simultáneamente la respuesta correlacionada esperada sobre la masa muscular seleccionando simultáneamente por esqueleto largo y bajo peso corporal, ofreciendo así evidencia de la regulación genética al menos parcialmente independiente de ambos procesos (Di Masso *et al.* 2004). Paralelamente, las modificaciones en los huesos largos generadas por selección artificial en estas líneas llevaron a proponerlas como potenciales modelos animales para el mapeo de QTLs vinculados con la base ósea de sustentación corporal (Di Masso *et al.* 2007).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la relación músculo-hueso en una población segregante de ratones, a partir de la identificación mediante técnicas de análisis multivariado de combinaciones particulares de fuentes de variancia para las variables individuales consideradas en la definición de este fenotipo complejo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron machos (n = 339) y hembras (n = 319) de ratón pertenecientes a la F2 del cruzamiento entre dos líneas que difieren en su biomasa pero no en la longitud promedio de sus fémures. Los genotipos parentales [CBi/L (bajo peso y esqueleto largo) y CBi/C (alto peso y esqueleto corto)] provienen de un experimento de selección artificial que utilizó como criterio un índice biológico que relaciona el peso corporal y la longitud del esqueleto en contra de la correlación genética positiva entre ambos (Di Masso *et al.*, 1991). Todos los animales provenían de camadas estandarizadas a ocho crías dentro de las 24 horas post-parto. El destete se realizó a los 21 días de edad y los animales se alojaron en grupos de seis individuos del mismo sexo en cajas de polipropileno (32x24x10 cm) y se mantuvieron con disponibilidad de agua y alimento (Cargil Rata-Ratón) *ad libitum*, en las condiciones habituales de bioterio (23 ± 1°C y un fotoperíodo de 12 horas de luz: 12 horas de

oscuridad). A los 150 días de edad los animales se sacrificaron por sobre-exposición al éter. Inmediatamente después del sacrificio se extrajo el músculo tríceps sural (sóleo y gemelos) derecho e izquierdo y se registró su peso en balanza de precisión con aproximación a la décima de miligramo (PESMUS). Posteriormente se extrajeron los fémures y las tibias de ambos miembros, se los limpió a mano para despojarlos de cualquier resto de tejidos blandos, se los pesó en balanza de precisión con aproximación a la décima de miligramo (PESFEM y PESTIB) y se midió su longitud con un calibre con aproximación al mm (LONFEM y LONTIB).

Análisis estadístico

La relación músculo-hueso se caracterizó mediante la técnica multivariada de componentes principales incluyendo las cinco variables (peso de fémur y tibia, longitud de fémur y tibia y peso del músculo) (PC-ORD Versión 4.0, McCune y Mefford, 1999)

Las componentes principales derivadas del análisis se consideraron como nuevas variables aleatorias y su significado se interpretó a partir del signo de los coeficientes factoriales y de la magnitud de los coeficientes de determinación (R^2) que cuantifican la proporción de la variancia total de cada variable individual que es explicada por cada una de dichas componentes.

Los miembros de la generación segregante, machos y hembras por separado, se dividieron en diez categorías utilizando como criterios los deciles de las tres primeras componentes corporales. El comportamiento de cada una de las cinco variables incluidas en el análisis se describió gráficamente en función del decil de pertenencia para cada una de las tres primeras componentes principales.

RESULTADOS

La Tabla I describe los valores del peso corporal y de las cinco variables incluidas en el análisis en los machos y las hembras de la población segregante.

	Machos	Hembras
Tamaño muestral	336	319
Peso corporal (g)	49,7 ± 4,22	44,6 ± 3,16
Peso del músculo (g)	0,237 ± 0,0206	0,193 ± 0,0152
Peso del fémur (g)	0,104 ± 0,0081	0,097 ± 0,0073
Peso de la tibia (g)	0,072 ± 0,0065	0,066 ± 0,0049
Longitud del fémur (mm)	16,6 ± 0,39	17,0 ± 0,38
Longitud de la tibia (mm)	18,1 ± 0,36	18,6 ± 0,30

Tabla I - Peso corporal e indicadores de la relación músculo-hueso (media aritmética ± desvío estándar) a los 150 días de edad, en machos y hembras de una población segregante de ratones

Las Tablas II y III resumen la información correspondiente a las tres primeras componentes principales en machos y en hembras, respectivamente.

Las tres primeras componentes principales explicaron en conjunto el 89,26% y el 87,87% de la variancia total observada en machos y en hembras, respectivamente.

La primera componente principal (PC1) explicó aproximadamente la misma proporción de la variancia total en cada sexo (machos: 61,94%; hembras: 58,84%). Presentó todos los coeficientes con el mismo signo.

La segunda componente principal (PC2) explicó también una proporción similar de la variancia total en machos (15,45%) y en hembras (16,40%). En este caso los caracteres de peso (del músculo y de los huesos) estuvieron pon-

derados con coeficientes con signos negativos mientras que los coeficientes que acompañaron a los caracteres de longitud presentaron signos positivos.

Por último, la tercera componente principal (PC3), al igual que las dos anteriores explicó la misma proporción de la variancia en uno y otro sexo (machos: 11,87%; hembras: 12,63%) y presentó coeficientes positivos para peso del músculo, negativos para peso de los huesos y un aporte nulo de los caracteres de longitud.

De las cinco componentes posibles, las tres primeras consideradas en este análisis agotaron toda la variancia para peso del músculo (99,9%). Las dos componentes restantes incluyen, en conjunto, el 9,9% del peso del fémur, el 13,6% del peso de la tibia, el 18,2 % de la longitud del fémur y el 12,1% de la longitud de la tibia.

Componente	PC1		PC2		PC3	
Variancia explicada (%)	61,94		15,45		11,87	
Variable	signo	R ² (%)	signo	R ² (%)	signo	R ² (%)
PESMUS	(-)	48,2	(-)	7,3	(+)	44,4
PESFEM	(-)	68,3	(+)	14,0	(-)	7,8
PESTIB	(-)	71,5	(+)	8,4	(-)	6,7
LONFEM	(-)	65,9	(-)	15,6	(-)	0,3
LONTIB	(-)	55,9	(-)	31,8	(-)	0,2

Tabla II – Contribución a la variancia total, signo de los coeficientes y coeficiente de determinación (R²) de las tres primeras componentes principales vinculadas con la relación músculo-hueso en ratones machos pertenecientes a una población segregante

Componente	PC1		PC2		PC3	
Variación explicada (%)	58,84		16,40		12,63	
Variable	signo	R ²	signo	R ²	signo	R ²
PESMUS	(-)	43,8	(-)	13,9	(+)	41,1
PESFEM	(-)	74,7	(+)	6,9	(-)	8,4
PESTIB	(-)	71,2	(+)	8,4	(-)	11,7
LONFEM	(-)	46,8	(-)	37,0	(-)	0,0
LONTIB	(-)	57,8	(-)	15,8	(-)	1,9

Tabla III – Contribución a la variación total, signo de los coeficientes y coeficiente de determinación (R²) de las tres primeras componentes principales vinculadas con la relación músculo-hueso en ratones hembras pertenecientes a una población segregante.

Las Figuras 1, 2 y 3 resumen esquemáticamente la relación entre cada componente discriminada en diez categorías en función del valor de los deciles y cada una de las cinco variables utilizadas para definir la relación músculo-hueso. Dado que el comportamiento fue coincidente en machos y en hembras sólo se presentan los datos correspondientes a los primeros. La Figura 1 permite apreciar la relación inversa entre los valores de la primera componente y los valores de las variables originales. La Figura 2 muestra la relación inversa entre los valores de PC2 y las variables de peso, y la relación directa entre los valores de la componente y las variables de longitud ósea. La Figura 3 muestra la relación directa entre los valores de PC3 y el peso del músculo así como la relativa independencia entre los valores de la componente y las cuatro variables óseas. Finalmente, la Figura 4 ejemplifica mediante la representación bidimensional de las dos primeras componentes principales (PC1 y PC2) el comportamiento de PC2 cuando sus valores se discriminan en función de los deciles de PC1.

DISCUSIÓN

El análisis de componentes principales es una técnica estadística multivariada de síntesis de la información o reducción del número de variables. Las nuevas variables artificiales que genera -componentes principales- tantas como variables se hayan incluido en el análisis, son combinacio-

nes lineales de las variables originales que, en conjunto, explican el 100% de la variación observada en los datos, pero la porción de la variación que explica cada una de ellas es independiente de la fracción que explican las restantes. Un aspecto clave de este análisis es la interpretación que se le da a las componentes generadas ya que la misma no viene explicitada *a priori* sino que debe deducirse a partir de la observación de la relación entre las nuevas variables -componentes principales generados en el análisis- y las variables reales introducidas originalmente (Carrasco y Hernán, 1993).

Batista Pinto *et al.* (2006) aplicaron esta técnica para analizar el desempeño conjunto de caracteres de crecimiento y caracteres de la carcasa en una población experimental F2 de pollos (*Gallus gallus*) y concluyeron que la técnica permitió reducir el número de variables consideradas en cada candidato facilitando su evaluación global en el marco de un programa de mejoramiento genético.

Yamaki *et al.* (2006) la utilizaron para el estudio de caracteres de interés productivo en codornices (*Coturnix coturnix*) destinadas a producción de carne y concluyeron que la misma resultó efectiva para identificar variables informativas independientes y descartar otras inicialmente consideradas y que no efectuaban un aporte significativo a la variación total lo que posibilitó reducir costos sin una pérdida significativa de información.

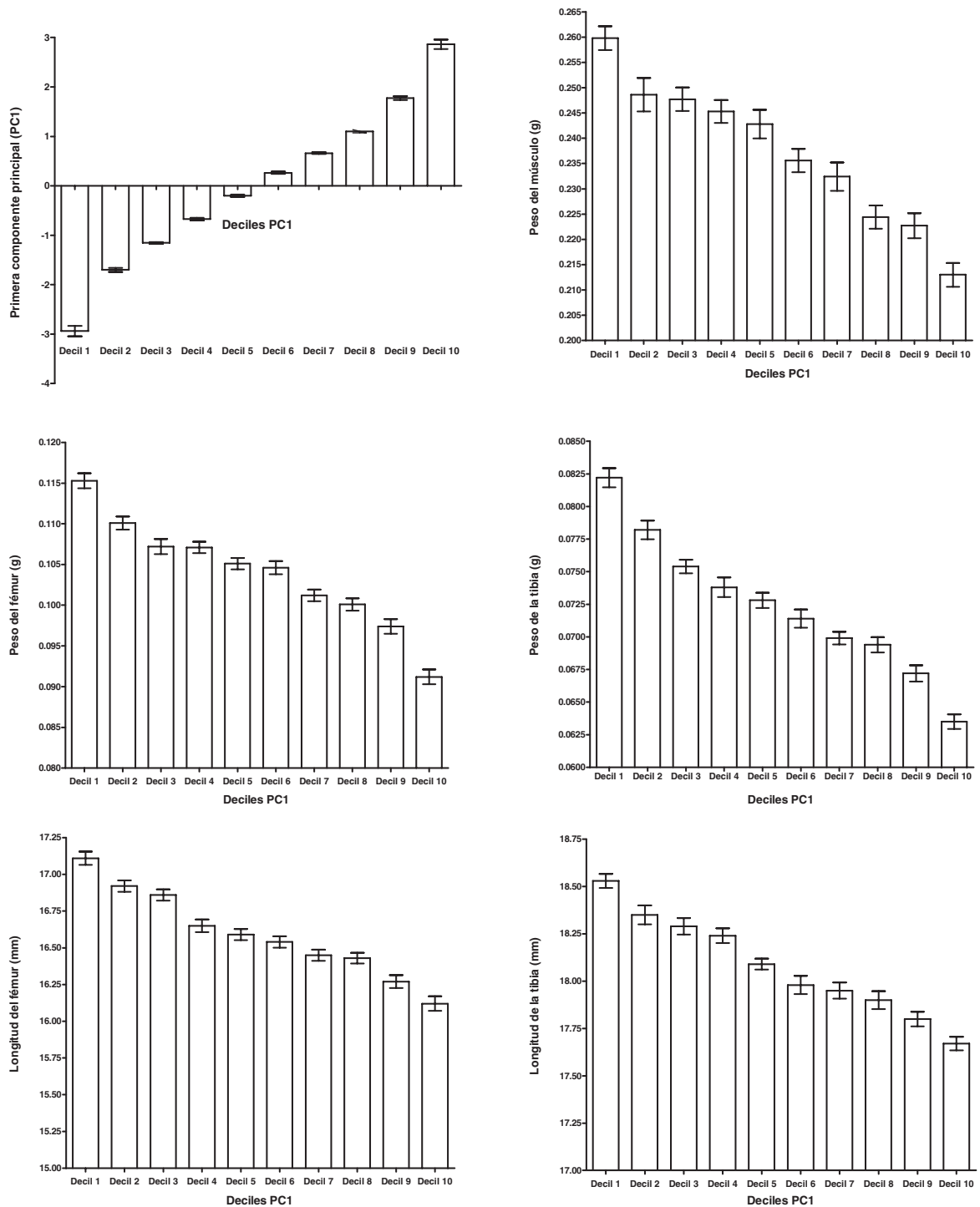


Figura 1 – Comportamiento de los cinco indicadores utilizados para definir la relación músculo-hueso en función del decil de pertenencia de la primera componente principal (PC1) en ratones machos de una población segregante

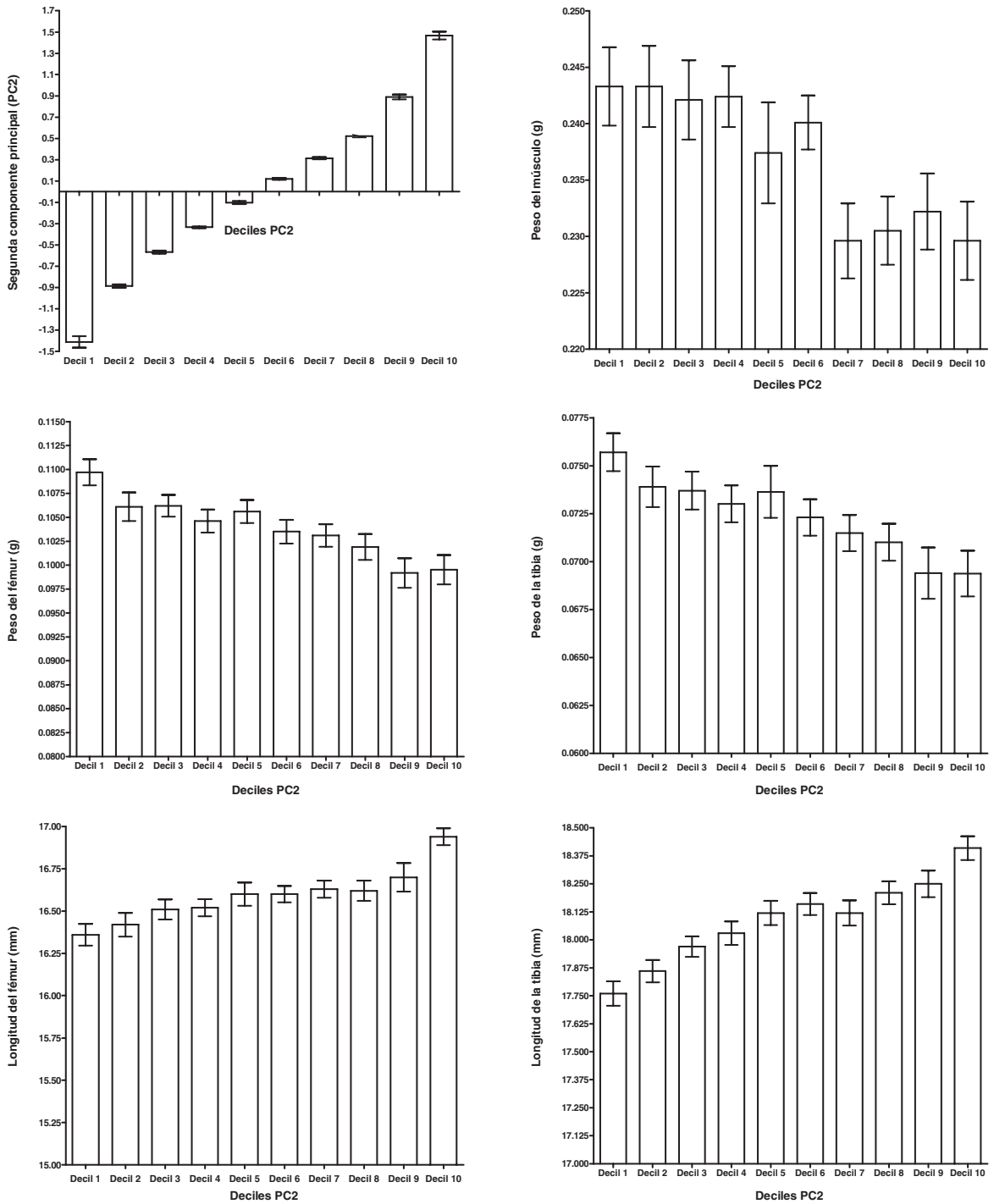
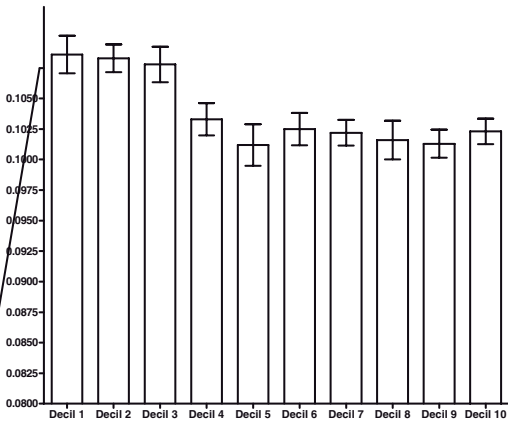
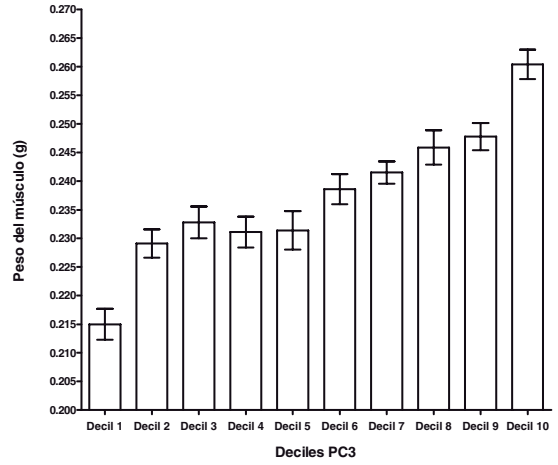
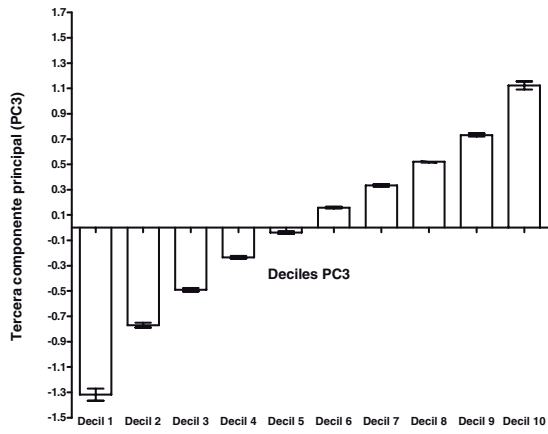


Figura 2 – Comportamiento de los cinco indicadores utilizados para definir la relación músculo-hueso en función del decil de pertenencia de la segunda componente principal (PC2) en ratones machos de una población segregante



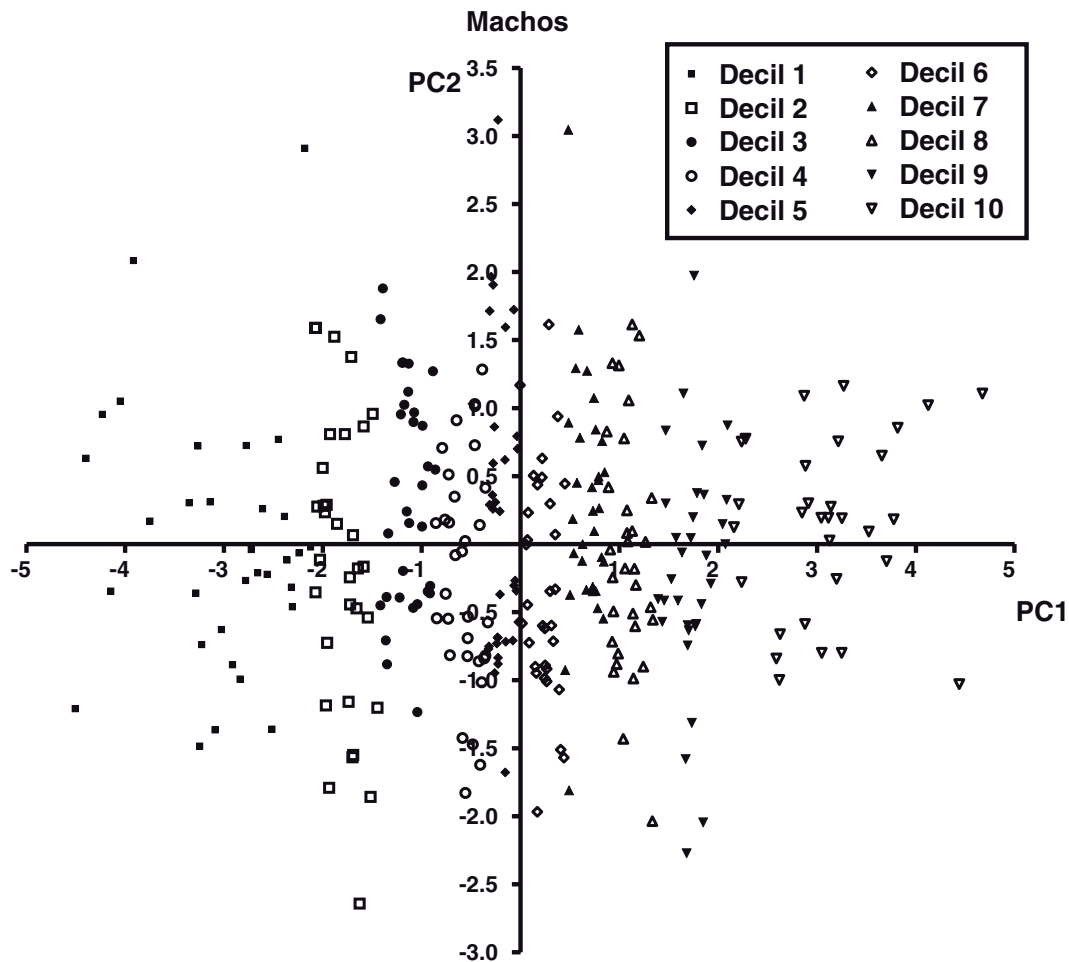


Figura 4 – Representación bidimensional de las dos primeras componentes principales (PC1 y PC2) discriminando los valores de PC2 en función de los deciles de PC1

Los resultados informados en este trabajo indican la coexistencia de fuentes independientes de variancia fenotípica en la caracterización del sistema biológico complejo conformado por la variación conjunta de la longitud de los huesos, su peso y el peso de la masa muscular asociada.

La primera componente principal puede ser interpretada como un indicador de tamaño general dado que presentó todos los coeficientes con el mismo signo poniendo de manifiesto una modificación armónica de las cinco variables consideradas. Por lo tanto, a mayor longitud del fémur y la tibia, mayor peso del músculo y mayor peso de ambos huesos, y viceversa. Esta nueva variable relaciona los cinco caracteres en forma

coincidente con lo postulado por la hipótesis de Hooper (Hooper, 1978 a y b) según la cual los músculos y los huesos crecen en forma proporcional unos a otros, porque el hueso se encuentra ligado biomecánicamente al músculo y se adapta a las fuerzas musculares durante el desarrollo. La placa epifisiaria de los huesos largos actuaría como un marcapasos para el crecimiento muscular-esquelético, el aumento de tensión originado por el crecimiento longitudinal del hueso produciría un aumento en la masa de los músculos que en él se insertan respuesta ésta que, a su vez, se refleja en un mayor peso del hueso. Esta sería la fuente de variancia mayoritaria vinculada con la relación músculo-hueso planteada, es la que

explica la mayor proporción de la variancia observada y coincide con la identificada por Hooper en sus experimentos. La misma puede identificarse también en otras especies. Por ejemplo, Draper *et al.* (1992) seleccionaron en forma divergente cerdos Duroc Jersey por debilidad de las patas, un síndrome vinculado con desórdenes músculo-esqueléticos que es causa de pérdidas económicas y para el que se ha demostrado un importante papel de factores hereditarios. Estos autores observaron que tanto el peso como la longitud de los músculos biceps brachii y extensor del antebrazo fueron mayores en la rama negativa de la selección, respuesta que estuvo asociada con una mayor longitud del húmero y el metacarpo lo que los llevó a concluir que la respuesta a la selección estuvo asociada a importantes diferencias en el peso y la longitud de los músculos y huesos del tren anterior.

La segunda componente principal se asoció principalmente con la longitud del hueso con escaso aporte del peso del hueso y el peso del músculo que en esos huesos se inserta por lo que puede ser interpretada como un indicador de longitud del esqueleto y por ende de la base de sustentación de los tejidos blandos independiente de la tendencia general postulada por Hooper en su hipótesis. En consecuencia, a mayor valor de la componente le corresponden huesos de mayor longitud pero de menor peso, así como también menor peso del músculo, tanto en machos como en hembras. Esta componente explicaría la respuesta a la selección por conformación corporal observada en la línea CBi/L (Di Masso *et al.*, 2004) utilizada como progenitor en el cruzamiento inicial que dio origen a la F2 analizada. Esta línea, de conformación longilínea, representa la rama negativa del experimento de selección antagónica (Di Masso *et al.*, 1991) y fue seleccionada por esqueleto largo y bajo peso. Los animales CBi/L presentan huesos más largos y más livianos, asociados a músculos más livianos, que la línea testigo.

La tercera componente principal se asoció con el peso del músculo. Dado el escaso aporte del peso del hueso y el aporte nulo de la longitud

del hueso, puede ser interpretada como un indicador de la biomasa de tejidos blandos sustentada. A mayor valor de la componente le corresponden músculos más pesados sobre huesos algo más livianos, independientemente de la longitud de esos huesos.

Las componentes cuarta y quinta no incluyen variancia atribuible al peso del músculo y, por lo tanto, sólo representan variabilidad ósea indicando que una porción de la variancia total observada no está vinculada con la interacción entre músculo y hueso sino que se restringe a uno sólo de los elementos del sistema.

Las componentes segunda y tercera, si bien minoritarias si se las interpreta por la proporción de variancia que explican, adquieren trascendencia dado que indican la existencia de fuentes de variación tanto para longitud del esqueleto como para peso del músculo independientes de la asociación hipotetizada por Hooper.

Cada una de las fuentes de variancia descritas son potencialmente identificables en las poblaciones de diferentes especies animales y su trascendencia puede cuantificarse a partir de un análisis de componentes principales con miras a su posterior utilización en el marco de programas de mejoramiento. El diagrama de dispersión presentado a modo de ejemplo en la Figura 4 permite visualizar que es posible identificar individuos con valores positivos o negativos de la segunda componente asociados a cualquier valor de la primera componente. Dada la distribución normal de PC1 y la discriminación de los valores de PC2 en función de los deciles de PC1, los deciles de los extremos de la distribución se extienden más sobre el eje de las abscisas que los deciles del centro de la misma. De esta manera, tanto para valores de mayor o menor tamaño armónico en la relación músculo hueso (PC1) es posible elegir individuos con mayor (positivo) o menor (negativo) valor de PC2. Los animales con mayores valores de la segunda componente principal, dados los signos que ponderan a los valores estandarizados de las variables originales, presentan huesos de mayor longitud asociados a huesos y músculos más livianos tal como

se observó en la línea progenitora CBI/L.

Modelizar, simular y eventualmente predecir el comportamiento de los sistemas biológicos complejos representan algunos de los principales desafíos de la biología actual (Balling, 2007). De acuerdo con este autor, la mera identificación de los componentes individuales de un sistema complejo derivada de las tecnologías “ómicas” representa una estrategia insuficiente en este sentido. En contraposición plantea la necesidad de recurrir a un enfoque biológico sistémico que brinde información acerca de la arquitectura de las redes involucradas cuyo comportamiento como un todo no puede ser explicado a partir del conocimiento de las partes. Profundizar en la dinámica de esta estructura de redes requiere de su perturbación seguida, entre otras posibilidades, de la caracterización fenotípica de los cambios resultantes. La selección artificial representa un claro ejemplo de perturbación de los sistemas biológicos y las líneas de ratón derivadas de los experimentos de selección a largo plazo, como las utilizadas en este trabajo, representan un recurso valioso para el estudio sistémico de fenotipos complejos como los vinculados con las interacciones músculo-hueso mencionadas.

REFERENCIAS

- Balling, R. (2007) From mouse genetics to systems biology. *Mamm Genome* 18:383–388.
- Batista Pinto, LF; Packer, IU; Rodrigues De Melo, CM; Corrêa Ledur, M; Lehmann Coutinho, M. (2006) Principal components analysis applied to performance and carcass traits in the chicken. *Anim. Res.* 55 419–425.
- Carrasco, JL ; Hernán, MA. (1993) Estadística multivariante en las ciencias de la vida. Ed. Ciencia 3, S.L. Madrid.
- Chase, K.; Carrier, D.R.; Adler, F.R.; Jarvik, T.; Ostrander, E.A.; Lorentzen, T.D.; Lark, K.G. (2002) Genetic basis for systems of skeletal quantitative traits: Principal component analysis of the canid skeleton. *PNAS* 99: 9930-9935.
- Davies AS. (1989) The structure and function of carcass tissues in relation to meat production. In: Purchas RW, Butler- Hogg BW Davies AS (eds). *Meat production and processing* New Zealand Society of animal production. Occasional publication No 11, New Zealand: 43-60.
- Di Masso, R.J.; Abdala, S.B.; Sánchez, S.M. y Font, M.T. (1991) Respuesta a la selección divergente por conformación corporal en el ratón. *Mendeliana* 9 (2): 79-92.
- Di Masso, RJ; Silva, PS; Font, MT. (2004) Muscle-bone relationships in mice selected for different body conformations. *J Musculoskel Neuron Interact* 4(1):41-47.
- Di Masso, RJ; Zerpa, CM; Silva, PS; Font, MT (2007) Femoral morphometry and femur length in mice selected for different body conformations. A potential animal model suitable for QTLs mapping. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 50 3, 309-319.
- DD Draper, DD; Rothschild, MF; Christ, LL (1992) Effects of divergent selection for leg weakness on muscle and bone characteristics in Duroc swine. *Genet. Sel. Evol.* 34: 363-374.
- Goss RJ. (1986) Modes of growth and regeneration. In: Falkner F, Tanner JM (eds) *Human Growth: A comprehensive treatise*. Plenum Press, NY; Vol. 1:3-26.
- Hooper ACB (1978a) Bone length and muscle weight in mice subjected to genetic selection for the relative length of the tibia and radius. *Life Sci*; 22:283-286.
- Hooper ACB (1978b) Muscles and bones of large and small mice compared at equal body weights. *J. Anat.*; 127:117-123.
- McCune B., Mefford M.J. (1999) PC-ORD. *Multivariate Analysis of Ecological Data*. Version 4.0. MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, USA.
- Schiessl H, Frost HM, Jee WSS. (1998) Estrogen and bone-muscle strength and mass relationships. *Bone* 22:1-6.
- Thompson, D'Arcy W (1917) *On growth and form*. Cambridge University Press. 793 p.