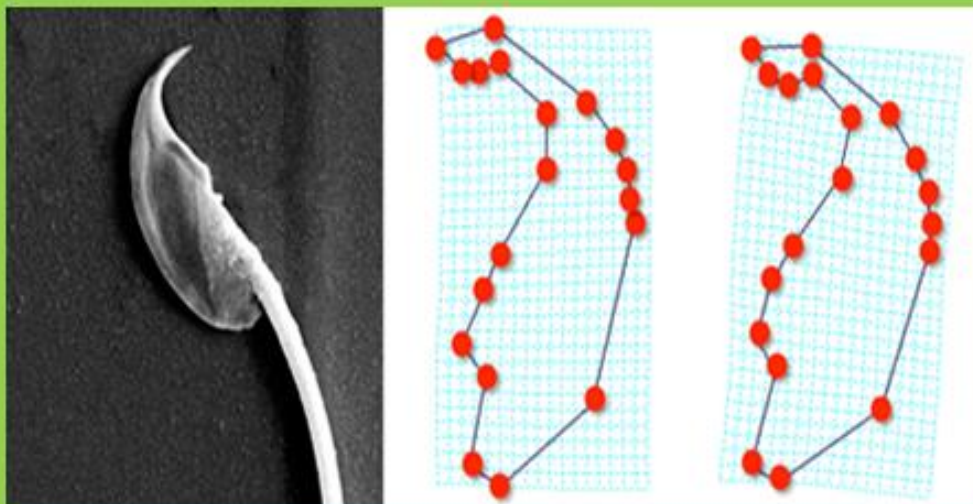




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE MADRID

**Universidad Autónoma de Madrid.  
Departamento de Biología.**

**Morfometría geométrica aplicada al estudio  
evolutivo de los espermatozoides y su relación  
con determinantes de la fertilidad en roedores**



**María Varea Sánchez**

**Museo Nacional de Ciencias Naturales  
(CSIC)**

**Tesis Doctoral**

**Madrid, 2014**

# **Morfometría geométrica aplicada al estudio evolutivo de los espermatozoides y su relación con determinantes de la fertilidad en roedores**

**María Varea Sánchez**



**CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS**

**Museo Nacional de Ciencias Naturales**

**Departamento de Ecología Evolutiva**

**Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción**



**Universidad Autónoma de Madrid**

**Departamento de Biología**



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
MADRID

**Morfometría geométrica aplicada al estudio evolutivo de los espermatozoides y su  
relación con determinantes de la fertilidad en roedores.**

Memoria presentada por María Varea Sánchez para optar al grado de doctora en  
Ciencias Biológicas.

Dirigida por Eduardo Roldan Schuth, Profesor de Investigación en el Consejo Superior  
de Investigaciones Científicas (Museo Nacional de Ciencias Naturales).

Tutelada por Joaquina de la Torre Escudero, Profesora Titular del Departamento de  
Biología de la Universidad Autónoma de Madrid.

**El Doctorando**

María Varea Sánchez

**Vº Bº del Director**

**VºBº del Tutor**

**Eduardo Roldan**

**Joaquina de la Torre**

**Madrid, Mayo de 2014**

*A mis padres,  
de quienes he aprendido las lecciones más importantes.*

# ÍNDICE

	Página
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
Estructura y evolución del espermatozoide.....	9
Selección sexual postcópula y competición espermática.....	13
Coevolución del tracto reproductor masculino y la biología reproductiva de la hembra.....	15
Efectos de la competición espermática.....	17
Morfometría geométrica.....	22
La teoría de medidas.....	24
<i>Landmarks</i> .....	25
Disgregación de una estructura en su forma y tamaño.....	26
Teoría de la forma.....	26
Superposición de Procrustes.....	31
Representación gráfica.....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	35
<b>CAPÍTULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES.</b>	
Animales.....	36
Medidas corporales y extracción del esperma.....	39
Evaluación de los parámetros espermáticos.....	41
Evaluación de la forma de la cabeza mediante morfometría geométrica.....	45
Análisis estadístico.....	46

**CAPÍTULO 3: EFECTO DE LA SELECCIÓN SEXUAL POSTCÓPULA  
SOBRE EL GRADO DE VARIACIÓN DE LAS DIMENSIONES  
ESPERMÁTICAS.**

Introducción.....	50
Material y métodos.....	53
Resultados.....	55
Discusión.....	64

**CAPÍTULO 4: EFECTO DE LA SELECCIÓN SEXUAL POSTCÓPULA  
SOBRE EL GRADO DE VARIACIÓN DE LA VELOCIDAD DE  
NATACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES.**

Introducción.....	68
Material y métodos.....	70
Resultados.....	72
Discusión.....	77

**CAPÍTULO 5: MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DE LA CABEZA DEL  
ESPERMATOZOIDE EN ROEDORES.**

Introducción.....	81
Material y métodos.....	85
Resultados.....	92
Discusión.....	105
Apéndice: efecto de la tinción sobre la forma de la cabeza.....	111

**CAPÍTULO 6: DIFERENCIAS EN LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA  
EN LINAJES DE ROEDORES MUROIdeos.**

Introducción.....	114
Material y métodos.....	117
Resultados.....	119
Discusión.....	128

**CAPÍTULO 7: LA COMPETICIÓN ESPERMÁTICA Y LA EVOLUCIÓN  
DE LA FORMA DE LA CABEZA DE LOS ESPERMATOZOIDEOS EN  
ROEDORES – LA CURVATURA Y LONGITUD DEL GANCHO  
INFLUYEN SOBRE LA VELOCIDAD ESPERMÁTICA.**

Introducción.....	131
Material y métodos.....	134
Resultados.....	139
Discusión.....	151

**CAPÍTULO 8: EL DISEÑO DE LA FORMA DE LA CABEZA  
AFECTA A LA VELOCIDAD Y LA TRAYECTORIA DE  
NATAción DE LOS ESPERMATOZOIDEOS DE ROEDORES.**

Introducción.....	158
Material y métodos.....	162
Resultados.....	165
Discusión.....	173

<b>-CAPÍTULO 9: DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>178</b>
--	------------

<b>-CONCLUSIONES.....</b>	<b>181</b>
---------------------------	------------

<b>-BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>183</b>
---------------------------	------------

## **AGRADECIMIENTOS**

*Una vez terminada la Tesis, llega el momento en que te das cuenta de cuanto tienes que agradecer a tanta gente.*

*En primer lugar agradecer a Eduardo Roldan, profesor de investigación del Museo Nacional de Ciencias Naturales y director de esta Tesis, por darme la oportunidad de empezar en la investigación, por confiar en mí, por todo lo que he aprendido y por continuar al frente del grupo cuando más le necesitábamos.*

*A Markus Bastir investigador del Museo Nacional de Ciencias Naturales, por enseñarme gran parte de lo que sé sobre morfometría geométrica y mantener la ilusión en este proyecto*

*Quiero agradecer a mi tutora de la UAM Joaquina de la Torre por su ayuda con los trámites y por sus revisiones de la versión final de esta Tesis.*

*También quiero agradecer a Montserrat Gomendio por su participación en las primeras etapas de esta Tesis.*

*Agradecer a mis primeros compañeros en el Museo Nacional de Ciencias, Cris, Pepe y Laura, con quienes empecé a trabajar en el laboratorio toda su paciencia.*

*Por supuesto agradecer a mis actuales compañeros por todo lo que hemos vivido durante estos 4 años. A Maxi, por tener siempre soluciones para todo y por todas esas discusiones donde no importa de lo que hablemos si no quien tiene razón; A Javi por hacernos más divertidos los días de experimento; A Lena mi “socia” en esto del sperm race saga, cualquier día nos llaman los de google apps; A Chechu por estar siempre dispuesto a ayudar; A Pilar por toda la compañía que me ha hecho mientras digitalizaba las muestras; A Ester por los bizcochos ricos y todas nuestras horas de zulo; A Dani por estar siempre de buen humor, incluso cuando no le dejamos abrir la ventana; A Juan Antonio por todo su interés en mi trabajo y de quien he aprendido otra forma de ver la morfometría geométrica; A Esperanza por cuidar tan bien de nuestros ratones y del laboratorio de Molecular a Piluchi por preocuparse tanto por mí.*

*Agradecer también a Juan José Luque y Annie Orth su colaboración en este trabajo, ya que sin ellos no hubiese tenido ratones.*



*Y ahora es el turno de todos los que pensábais que lo de los agradecimientos es solo para los que han trabajado en la tesis de forma directa. Tantos años durante los que me animáis en los momentos difíciles y celebráis conmigo los éxitos, no pueden quedar sin reconocimiento, así que aquí vosotros también salís.*

*Agradecer a los que vivís esta Tesis día a día y desde por la mañana: Ana, Susana, Alfonso, Alexia, Nico, Héctor, Tatiana, Eva, Vicen, Santi, Tamara y Rubén. Por estar siempre para todo, por aceptar que aunque no curamos el Alzheimer la competición espermática mola, por vuestro apoyo y por lo orgullosos que estáis de mí.*

*A los que empezasteis este camino conmigo el primer día de colegio y seguís en él el último día de Tesis. A Laura, Pedro, Lucía, Sergio, Eva, Rim, Ramón, Hugo, Álvaro y César. Por tantas cosas.*

*A mis compañeros de Biología de la UAM, María, Cris, Sergio, Patri, Alicia, Mariángeles, Alberto, Sara, Javi y Elisa. Porque sin vosotros lo hubiera dejado en primero.*

*A mis compañeros del Master Nagore, María Elvira y Vanessa, sin vosotros no hubiera sido lo mismo.*

*Y por último, los más importantes, mi familia y en especial a mis abuelos, a los que les hubiera gustado ver terminada esta Tesis.*

*Gracias a todos vosotros, hoy estoy aquí.*

*Una victoria puede quedar en los libros,  
pero la forma de conseguirla  
es lo que permanece en la memoria de la gente.  
Arrigo Sacchi*



La investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral ha sido financiada por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación, del Ministerio de Economía y Competitividad, a través del proyecto CGL2011-26341 (IP: Eduardo Roldán). La doctoranda ha disfrutado de contratos financiados por proyectos de investigación

## RESUMEN

Las diferencias en forma y tamaño que presentan los gametos masculinos en el reino animal son sorprendentes. Se ha propuesto que esta variación es consecuencia de la acción de al menos cuatro factores: (1) la historia filogenética de las especies, (2) las fuerzas selectivas que pueden influir en la eficiencia fecundante de los espermatozoides, (3) el ambiente donde tiene lugar la fecundación (por ejemplo, el tracto reproductor femenino) además de la biología reproductiva de la hembra, y (4) los determinantes de la interacción entre los gametos y que confieren una alta especificidad al proceso de fecundación. En mamíferos el sistema de apareamiento más extendido es la poliginia. Sin embargo, las hembras pueden copular con varios machos (poliandria), tal como demuestran estudios moleculares que han identificado en una misma camada crías procedentes de más de un padre. Cuando las hembras se aparean con dos o más machos, tiene lugar un proceso denominado competición espermática en el que los eyaculados de diferentes machos compiten por fecundar el o los óvulo(s) de la hembra. En la actualidad, es bien conocido que este tipo de selección sexual postcópula es una fuerza evolutiva capaz de modelar la biología reproductiva del macho, así como las características de los espermatozoides.

La competición espermática tiene un efecto importante sobre la variación morfológica de las células espermáticas. Los incrementos en niveles de competición espermática están asociados a un aumento en las dimensiones de los espermatozoides. A su vez, el incremento en tamaño está asociado a una disminución del grado de variación en dichas dimensiones. Si bien el efecto de la competición espermática sobre dimensiones espermáticas está bien caracterizado, no ocurre lo mismo en relación a la evolución de su forma. Esto se debe a que durante mucho tiempo no ha sido posible

disponer de herramientas de análisis de forma con suficiente poder resolutivo para caracterizar diferencias de morfología espermática entre especies. La Morfometría Geométrica es un método de análisis capaz de resolver las limitaciones de la morfometría tradicional cuantificando con precisión diferencias en forma, especialmente cuando se trata de células con morfología compleja. Los espermatozoides de roedores presentan una morfología peculiar cuando se los compara con los de otras especies de mamíferos euterios. El diseño de los espermatozoides de roedores muestra una enorme variación, incluso entre especies muy emparentadas, particularmente en la cabeza, que contiene el núcleo y un único gránulo exocitótico, y en cuyo extremo apical existe uno o varios apéndices en forma de gancho. El impacto de estas diferencias de forma sobre la función espermática es aún motivo de intenso debate.

Esta Tesis Doctoral se centra en el análisis de diferencias morfológicas en distintas especies de roedores y su posible relación con la selección sexual postcópula. Las diferencias en forma se analizaron mediante morfometría tradicional y morfometría geométrica. Se estudiaron también posibles relaciones entre forma de la cabeza espermática y la velocidad de natación de los espermatozoides.

Se encontró que el grado de variación intra-específico (estimado mediante el cálculo de coeficientes de variación), tanto en las dimensiones de los espermatozoides como en su velocidad de natación, está estrechamente relacionado con el nivel de competición espermática. Los espermatozoides de las especies de roedores muroideos estudiadas mostraron fenotipos muy diferentes. De todos modos, fue posible reconocer un patrón de diseño similar para cada uno de los tres linajes de roedores analizados (subfamilias Arvicolinae, Cricetinae y Murinae) aunque hay claras diferencias entre linajes. Se analizó si las diferencias en diseño pueden tener influencias sobre la velocidad de natación. Centrándose en la morfología de la cabeza y en las dimensiones

de otros componentes celulares, se encontró una clara asociación entre las variables de forma y dimensiones, y la velocidad de natación. Además, se encontró que los diferentes componentes celulares tienen efectos distintos sobre la velocidad y sobre la trayectoria de natación. Una de las estructuras que evidenció más diferencias entre especies es el gancho apical de la cabeza espermática. Los cambios en su morfología mostraron una clara asociación con los niveles de competición espermática y, a su vez, con la velocidad de natación.

En conjunto, los resultados de esta Tesis sugieren que la selección sexual postcópula es un factor clave en la evolución de los gametos masculinos, poniendo de manifiesto que esta fuerza selectiva es capaz tanto de modular la morfología espermática como de estabilizarla una vez alcanzado un fenotipo óptimo para maximizar las posibilidades de éxito reproductor en un determinado individuo.

## **SUMMARY**

Sperm cells have shown striking differences in size and shape among the animal kingdom. It has been proposed that these differences are a consequence of, at least, the action of four factors: (1) phylogenetic history, (2) selective forces that might act on the sperm's fertilizing efficiency, (3) the environment where fertilization occurs (i.e. the female tract) as well as female reproductive biology, and (4) determinants of the interaction between gametes (specificity of fertilization). In mammals the most widespread mating system is polygyny. However, molecular studies revealed evidence of multiple paternity of single litters and thus, contrary to the pattern expected, females copulate with various males (polyandry). When females mate with different males in the same reproductive cycle, sperm from rival males compete in the female tract to fertilize the ova in a phenomenon known as sperm competition. It is now well known that that

this type of postcopulatory sexual selection is a powerful selective force which is able to shape male's reproductive biology and sperm traits.

Sperm competition has an important effect over the variation observed in sperm morphology. Increases in sperm competition levels are associated to increases in sperm dimensions. An increase in sperm size is linked to a decrease in the variation of sperm dimensions. Although the effect of sperm competition on sperm dimensions is well characterized, there is still limited knowledge of the evolution of sperm shape. This is because, for a long time, it has not been possible to carry out analysis with tools that provide enough resolution to characterize differences in sperm morphology between species. Geometric morphometric analysis allows one to overcome the limitations of traditional morphometry methods and quantify differences in shape, especially with cells that are morphologically complex. Rodent sperm cells show a peculiar morphology in comparison with spermatozoa of other euterian mammals. Sperm design in rodents shows an enormous variation, even between closely related species, particularly in the sperm head, which contains the nucleus and the acrosome, and bears an apical hook-shaped appendage. The impact of shape differences on sperm function is still a matter of debate.

This Doctoral dissertation focuses on the analysis of differences in sperm morphology in various rodent species and the possible influence of postcopulatory sexual selection on variations in sperm form. Differences in shape have been analyzed by using traditional morphometry and geometric morphometric methods. It also has been explored whether there are relationships between sperm head shape and sperm swimming velocity.

Comparisons at the intra-male level showed that the degree of variation of sperm dimensions and sperm velocity are closely associated with sperm competition. Sperm cells of the species examined in this study showed very different phenotypes. Nevertheless, it was possible to recognize a consistent pattern of design for each of the three lineages of rodents analyzed (subfamilies Arvicolinae, Cricetinae and Murinae) although there are clear differences between lineages. It was also assessed whether sperm design influences sperm swimming speed. Focusing on sperm head morphology and the dimensions of other sperm components, a clear association between shape, dimensions and swimming speed was found. Furthermore, it was observed that different sperm components exert different effects over sperm swimming velocity and sperm trajectory. One of the structures that exhibited more variation among species is the apical hook of the sperm head. Differences in morphology in this head structure showed a clear association with sperm competition levels and, in turn, with sperm swimming speed.

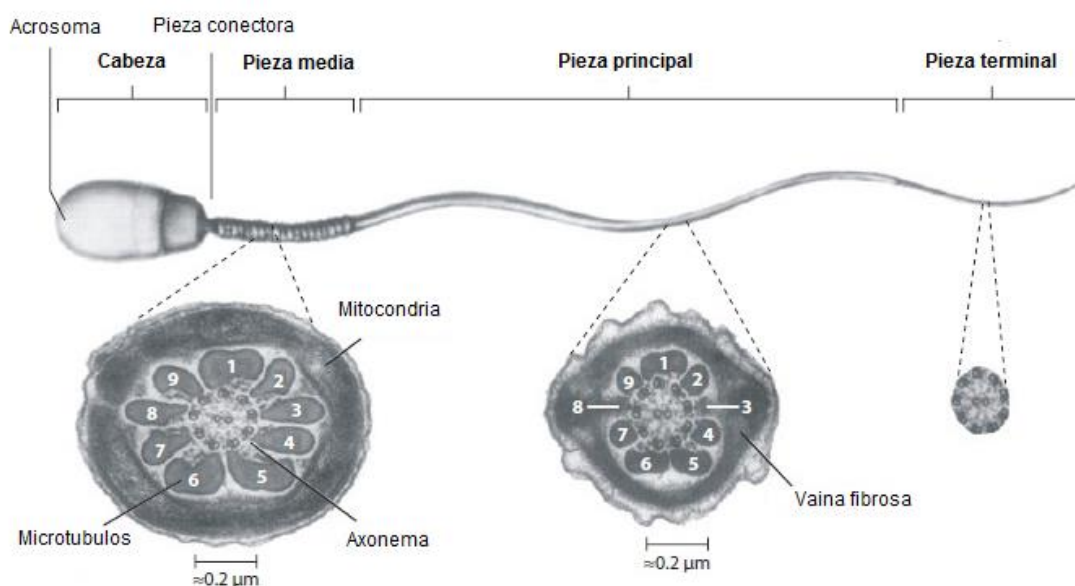
Altogether, the results presented in this dissertation suggest that postcopulatory sexual selection is a key factor in the evolution of male gametes. This selective force is capable of both modelling sperm morphology and stabilizing it once the cell has reached an optimum phenotype required to maximize the chances of reproductive success of an individual.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### Estructura y evolución del espermatozoide

Los espermatozoides son células móviles cuya función es fecundar al óvulo. Cada espermatozoide se compone fundamentalmente de dos estructuras principales. Una de ellas es la cabeza, con un núcleo haploide que contiene el ADN paterno, y el acrosoma, un gránulo exocitótico con enzimas que le ayudan a penetrar las cubiertas del óvulo en el momento de la fecundación. La otra es el flagelo que a su vez está formado por la pieza media, con mitocondrias que generan energía para el movimiento mediante fosforilación oxidativa y la pieza principal que produce energía por vía glicolítica. El flagelo genera además fuerza motriz que es esencial para el movimiento de la célula (Figura 1).

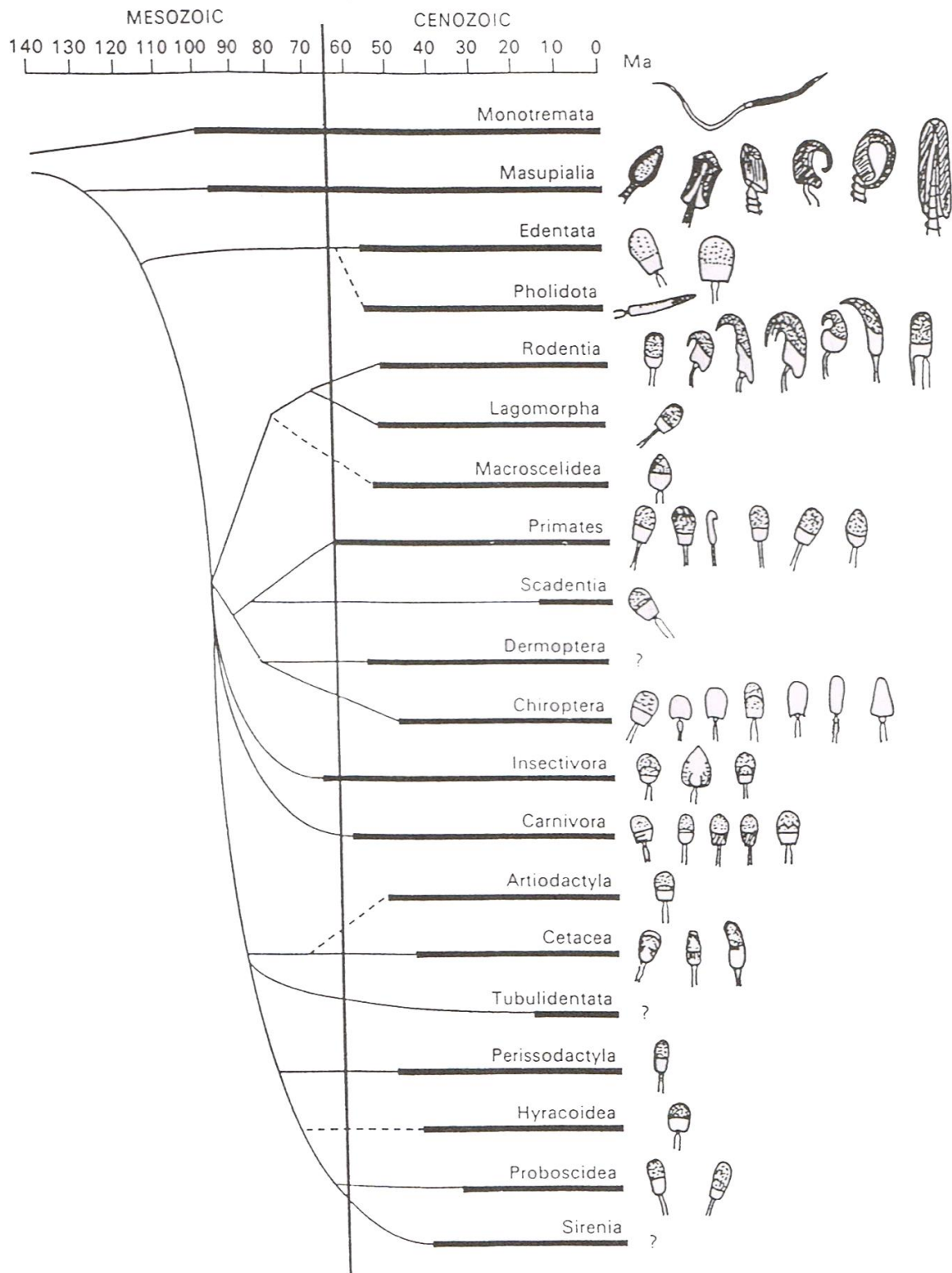


**Figura 1.** Componentes del espermatozoide. Modificado de Gaffney *et al.* (2011).



Para participar en la fecundación, los espermatozoides están adaptados a los distintos ambientes en los que ésta tiene lugar. En consecuencia, los espermatozoides han modificado su diseño básico hasta convertirse en las células más variables dentro del reino animal (Cohen, 1977). Esta diversidad es tal que existen desde especies cuyos espermatozoides no tienen flagelo hasta otras que poseen espermatozoides con uno o varios flagelos. Hay espermatozoides con y sin material genético, siendo la misión de estos últimos la de transportar espermatozoides que sí tienen capacidad de fecundar. Cuando la fecundación es externa, los espermatozoides nadan a través del agua. Este medio, al ser más homogéneo, ha propiciado la evolución de espermatozoides con un diseño simple (Baccetti, 1985). Por el contrario, cuando la fecundación es interna, los gametos masculinos deben adaptarse a multitud de ambientes y estructuras del sistema reproductor femenino, lo que ha favorecido la diversificación de los espermatozoides en una gran variedad de morfologías (Briskie *et al.*, 1997; Presgraves *et al.*, 1999; Pitnick *et al.*, 2003; Minder *et al.*, 2005; Holman *et al.*, 2008).

La evolución de los gametos masculinos en los mamíferos no sigue un patrón común (Figura 2). Los monotremas poseen unos espermatozoides vermiformes que recuerdan a los de reptiles y pájaros, mientras que los marsupiales y euterios tienen espermatozoides en los que se distingue claramente la cabeza del flagelo. Resulta llamativo que en euterios los flagelos difieren en dimensiones, pero es la cabeza el componente que registra un mayor rango de variación en dimensiones y forma. El diseño espermático más común en euterios consiste en una cabeza redondeada o con forma de espátula unida a un flagelo.



**Figura 2.** Árbol filogenético que ilustra las diferencias morfológicas observadas en la cabeza espermática en distintos clados de mamíferos. Extraído de Roldan *et al.* (1992).

En Artiodactyla es frecuente encontrar esta morfología en especies de las familias Bovidae, Camelidae, Cervidae, Giraffidae, Hippopotamidae y Suidae. En Carnivora se han descrito cabezas de espermatozoide en forma de pala dentro de las familias Canidae, Felidae, Mustelidae, Procyonidae y Ursidae. En Cetacea, las especies *Globicephala melas*, *Physeter catodon* y *Tursiops truncatus* poseen espermatozoides simples y redondeados. En Chiroptera hay 4 familias cuyos espermatozoides presentan esta morfología: Molossidae, Phyllostomidae, Pteropodidae y Vespertilionidae. Lo mismo ocurre con respecto a los espermatozoides de Edentata, Insectivora, Hyracoidea, Lagomorpha, Macroscelidea, Perissodactyla, Proboscidea y Primates. Los espermatozoides de las especies pertenecientes al orden Pholidota son muy peculiares, y presentan cabezas espermáticas con morfología puntiaguda y elongada que recuerda a los espermatozoides de monotremas.

La excepción más notable en cuanto a diseño espermático en euterios se da en marsupiales (Marsupialia) y roedores (Rodentia). Su morfología presenta una variación morfológica mayor que la descrita en cualquier otro grupo y lo mismo ocurre con respecto a su complejidad. El tipo de espermatozoide más simple descrito en roedores consiste en una cabeza ovalada, desprovista de apéndices y con un flagelo de pequeñas dimensiones. Este diseño coincide con el prototipo de espermatozoide ancestral de este y otros grupos de metazoos (Frazén, 1977). Mientras que la mayoría de euterios conserva una morfología espermática muy similar a la ancestral, la aparición de cabezas de morfologías complejas, con aparición de apéndices apicales, en forma de gancho, o basales, y elongación de los flagelos, parece haberse producido de forma independiente en varios linajes de roedores a lo largo de la evolución. Existe evidencia a favor de la aparición conjunta del gancho apical y una elongación de la cabeza, que a su vez están

ligadas al crecimiento del flagelo (Roldan *et al.*, 1992). Sin embargo, los detonantes de este proceso, es decir, las fuerzas selectivas subyacentes, quedan aún por esclarecer.

### **Selección sexual postcópula y competición espermática**

El concepto de selección sexual fue enunciado por Darwin (1871) para explicar la existencia de caracteres sexuales secundarios cuya evolución parecía no responder a la selección natural. En líneas generales, este concepto postula que ciertos rasgos son el resultado de la competencia entre individuos del mismo sexo por acceder a la cópula (competencia intra-sexual) y de la selección de estos por parte de un individuo del sexo opuesto (selección inter-sexual). Aunque estos rasgos pueden parecer poco ventajosos en términos de supervivencia, su cometido es aumentar la descendencia del individuo y perpetuar sus genes en la siguiente generación, ya sea incrementando las posibilidades de victoria en encuentros agonísticos o haciendo más atractivo al individuo portador.

La intensidad de la selección sexual podría estar determinada por el esfuerzo que invierte cada sexo en la reproducción y cuidado de la descendencia (Trivers, 1972). La tendencia casi universal es que las hembras invierten un mayor esfuerzo en el cuidado de las crías, lo que a su vez ralentiza y aumenta el costo de su tasa de reproducción y convierte a las hembras en un factor limitante. En este contexto, los machos compiten por aparearse con las hembras disponibles. De ahí las marcadas diferencias en el éxito reproductor de los machos. A diferencia de los machos, las variaciones en éxito reproductor de las hembras son menos acusadas, ya que su éxito reproductor se mide en términos de supervivencia de las crías. Por todo ello, la selección sexual actúa con mayor intensidad en los machos que en las hembras. Mientras que en los machos se favorecen caracteres que les facilitan conseguir un mayor número de fecundaciones, las

estrategias de las hembras están encaminadas a mejorar la calidad genética de sus crías y esto les lleva a ser selectivas con el respecto al macho con el que se aparean.

Los estudios sobre selección sexual han asumido durante mucho tiempo que la competición entre machos finalizaría en el momento de la cópula, limitando la elección de la hembra únicamente a la decisión de con qué macho se aparee. Al demostrarse que la poliandria era el sistema de apareamiento prevalente en muchas especies, dejó de equipararse cópula con éxito reproductor. Por tanto, este hecho supone que la competición entre machos continúa después de la cópula en un proceso denominado competición espermática.

El término competición espermática fue acuñado por Parker (1970) para describir la competición observada entre espermatozoides de machos rivales en el tracto reproductor femenino por fecundar los óvulos disponibles. Las investigaciones de Parker se llevaron a cabo en insectos, pero el fenómeno de la competición espermática pronto fue descrito en otros taxones. Tanto en insectos como en aves, las hembras poseen órganos de almacenamiento donde los espermatozoides de distintos machos pueden permanecer almacenados durante periodos prolongados (Parker, 1970; Birkhead y Hunter, 1990; Briskie y Montgomerie, 1993), siendo en estas estructuras donde parece tener lugar la competición entre eyaculados. En el caso de los mamíferos, donde el sistema de apareamiento más común es la poliginia, las hembras carecen de órganos de almacenamiento y los espermatozoides permanecen un corto periodo en el tracto femenino. En estas circunstancias parecía difícil que pudiese darse competición espermática. Sin embargo los estudios genéticos demostraron que en camadas múltiples es frecuente encontrar crías de distintos padres (Gomendio *et al.*, 1998). El desajuste entre los niveles esperados de competición espermática y los resultados observados

tiene como causa principal el desconocimiento de los mecanismos fisiológicos subyacentes.

## **Coevolución del tracto reproductor masculino y la biología reproductiva de la hembra**

La competición espermática tiene lugar en el tracto reproductor femenino y las características de este definen las reglas del juego, además de determinar cuáles son los rasgos del eyaculado que más contribuyen al éxito reproductivo. Para que se produzca la fecundación los óvulos deben llegar al sitio donde ésta se produce en el momento en que los espermatozoides también llegan al mismo. Aunque este proceso ocurre de forma sincronizada en ambos sexos, a menudo se ve afectado por factores que operan sólo en beneficio de uno de ellos. En especies con fecundación interna el tracto reproductor de la hembra está constituido por varios órganos que varían en el pH de sus secreciones, sistema inmune y una serie de barreras que dificultan a los espermatozoides su llegada hasta el óvulo. De los millones de espermatozoides que contiene un eyaculado la mayoría mueren o son fagocitados en los primeros tramos del sistema reproductor femenino (Hunter, 1988). Solo unos cuantos miles llegan al istmo del oviducto y del orden de 2 a 20 alcanzan la ampolla del oviducto, donde se produce la fecundación (Suarez *et al.*, 1990). Esta drástica disminución en el número de espermatozoides indica que en el tracto reproductor femenino se produce una importante selección de los gametos masculinos. Por su parte los machos eyaculan millones de espermatozoides y a pesar de las barreras del tracto femenino, muchos de ellos son capaces de llegar hasta el óvulo, lo que supone un riesgo de polispermia que resultaría en embriones no viables. La hembra posee barreras a lo largo del tracto femenino que actúan como un filtro para los espermatozoides defectuosos. En presencia de competición, el tracto femenino, y en

particular las barreras del tracto reproductor, pueden funcionar como una "arena" para, de alguna manera, valorar la competitividad de los eyaculados. Los machos, a su vez, responden a la competición espermática desarrollando espermatozoides cada vez más competitivos y con mayor capacidad fecundadora.

Los datos de estudios fisiológicos y morfológicos sugieren la existencia de una coevolución macho-hembra en la morfología de los aparatos reproductores (Dybas y Dybas, 1981; Briskie y Montgomerie, 1992). La drástica disminución en el número de espermatozoides, debido a las barreras del tracto reproductor femenino, podría ser compensada por los machos produciendo un mayor número de gametos (Short, 1981). En los mamíferos, las hembras están en estro durante un período que oscila entre horas y días según la especie. Los óvulos son liberados de forma sincrónica y son fértiles durante un tiempo limitado. Cuando un macho copula con una hembra en estro sus espermatozoides son capaces de sobrevivir en el tracto femenino durante unas horas o unos pocos días, por lo que existe el riesgo de que ninguno de sus espermatozoides esté vivo, y con capacidad de fecundar, en el momento de producirse la ovulación. Se ha sugerido que para maximizar el éxito reproductivo la esperanza de vida del espermatozoide podría estar positivamente relacionada con la duración del estro (Parker, 1984; Gomendio y Roldan, 1993), aunque también es conocido que el estro suele prolongarse hasta después de la ovulación. Los espermatozoides de euterios son los únicos que necesitan experimentar un proceso de preparación que es esencial para la fecundación. Este proceso, denominado capacitación, puede durar varias horas (Yanagimachi, 1994). Se ha observado que en especies cuyos espermatozoides tienen una esperanza de vida más corta sus espermatozoides se capacitan antes que en las especies cuya esperanza de vida es mayor (Gomendio y Roldan, 1993). Además, las interacciones del espermatozoide con el tracto reproductor de la hembra pueden ser

decisivas en su esperanza de vida. Durante el tiempo en que los espermatozoides están en el istmo oviductal, sólo aquellos que se adhieren a las paredes del epitelio son capaces de sobrevivir (Smith y Yanagimachi, 1990). Se ha observado que en las especies con períodos de estro más largos, los espermatozoides presentan una mayor esperanza de vida (Gomendio y Roldan, 1993).

Las características del espermatozoide también pueden coevolucionar con el grosor de la cubierta del óvulo (Bedford, 1991). En euterios la zona pelúcida es especialmente gruesa, en comparación con marsupiales, y está rodeada por una capa adicional, el cúmulo ooforo. En respuesta a este incremento en la complejidad de las cubiertas del óvulo, los espermatozoides de mamíferos han desarrollado una serie de características que incrementan su potencial fecundante. Poseen un acrosoma más grande, una motilidad diferente asociada a la hiperactivación (que se presenta en forma concomitante al momento en que se completa la capacitación), y una mayor estabilidad de la cabeza.

## **Efectos de la competición espermática**

La competición espermática tiene un mayor efecto en los machos, incrementa las diferencias del éxito reproductor entre individuos, e intensifica la acción de la selección sexual en este sexo. En situaciones de competición espermática se ha observado que el éxito reproductivo de los machos con mejores características de la población aumenta y, en consecuencia, el éxito de los menos favorecidos disminuye (Møller, 1998). Por añadidura la competición espermática promueve toda una serie de cambios a nivel genético, fisiológico y comportamental en la biología reproductiva del macho.

Una de las respuestas a la competición espermática mejor documentadas es el incremento del tamaño relativo de los testículos (Birkhead y Møller, 1998; Simmons,



2001; Breed y Taylor, 2000). De forma general, los machos que eyaculan un gran número de espermatozoides tienen una mayor tasa de éxito reproductor. El tamaño de los testículos es un indicador de la inversión del individuo en tejido testicular. De este modo, unos testículos de mayor tamaño albergan un mayor número de túbulos seminíferos y esto incrementa el número de espermatozoides producidos (Rowe y Pruett-Jones, 2011). En consecuencia, cuando los niveles de competición espermática se incrementan, los machos tienden a producir un mayor número de espermatozoides aumentando el tamaño de sus testículos.

Algunos modelos teóricos (Parker, 1970; 1984) asumen que la competición espermática se asemeja a una lotería. Es decir, cuanto mayor sea el número de espermatozoides que eyacula un individuo mayor es su probabilidad de fecundar al óvulo. En especies donde el nivel de competición espermática es elevado aumenta el número de espermatozoides. Esto se ha observado en diferentes taxones y sugiere que el valor competitivo de producir más espermatozoides es una tendencia universal. Sin embargo, el efecto de la competición espermática no se reduce únicamente a incrementar la producción de esperma, sino que promueve una selección de las características que mejoran la calidad seminal.

Se ha observado que en especies poliándricas el número de espermatozoides viables es mayor con respecto a las monoándricas (García-González y Simmons, 2005). Las especies con elevados niveles de competición espermática tienen un mayor número de espermatozoides que presentan integridad del acrosoma (Gómez-Montoto *et al.*, 2011a). La integridad acrosómica garantiza la preservación del gránulo exocitótico, necesario para una eficiente hidrólisis de las cubiertas del óvulo para que el espermatozoide pueda abrirse paso hasta el núcleo y completar la fecundación.

Otro de los factores importante para que la fecundación sea exitosa es la motilidad de los espermatozoides. Al igual que ocurre con la integridad acrosómica, la velocidad de natación de los espermatozoides incrementa en especies poliándricas y está asociada de forma positiva al incremento del tamaño relativo de los testículos (Birkhead *et al.*, 1999). Estudios metabólicos han evidenciado que en presencia de competición espermática también se produce un aumento en la cantidad de ATP sintetizado (Tourmente *et al.*, 2013). En conjunto, las mejoras competitivas que supone una motilidad normal y una mayor cantidad de energía disponible aumentan la velocidad de natación, la cual se incrementa en respuesta a la competición espermática (Fitzpatrick *et al.*, 2009, Lüpold *et al.*, 2009) y es el factor determinante del éxito reproductor del macho (Gage *et al.*, 2004).

La competición espermática también ejerce su efecto modelando la forma y dimensiones de los espermatozoides, lo que explicaría por qué ambas varían de forma tan marcada entre especies (Gomendio y Roldan, 1993; Clark *et al.*, 1999; Byrne *et al.*, 2003; Pitnick *et al.*, 2004). Las dimensiones de los componentes espermáticos están bajo un estricto control genético. Presumiblemente, las dimensiones y morfología de cada espermatozoide se encuentran dentro del rango considerado óptimo para el ambiente en el que ese espermatozoide debe actuar.

A nivel fisiológico hay dos factores que ejercen control sobre la morfología espermática: la localización de los testículos y la expresión génica testicular. Los testículos pueden situarse fuera o dentro del cuerpo para favorecer una temperatura óptima que garantice la homeostasis del esperma durante su desarrollo (Cowles, 1958). Por otro lado, se ha observado que la expresión génica testicular que tiene lugar durante el proceso de diferenciación espermática (espermioogénesis) es en gran medida responsable del fenotipo de los espermatozoides (Eddy, 2002). En roedores, el gancho

apical de la cabeza del espermatozoide es un apéndice que se forma durante el período de diferenciación post-meiótica y depende de genes que sólo se expresan en este estadio (Namekawa *et al.*, 2006; Kleene *et al.*, 2001). La diversidad morfológica del espermatozoide es considerable y ha sido descrita a dos niveles: intra e inter-individual.

La morfología espermática está optimizada para cada macho de una población en función del nivel de competencia espermática y la biología reproductiva de la hembra mediante selección estabilizadora (Morrow y Gage, 2001a). En especies donde la competencia espermática prevalece, se ha observado que existe variación en número de espermatozoides y calidad del espermatozoide entre eyaculados de un mismo macho. Esto es consecuencia de la habilidad de los individuos para ajustar el número de espermatozoides por eyaculado de acuerdo con el nivel de competencia espermática percibido (Wedell *et al.*, 2002). Se ha observado que existe una relación positiva entre el tamaño del espermatozoide y el riesgo de competencia espermática en varios taxones: nematodos (LaMunyon y Ward, 1999); mariposas (Gage, 1994), polillas, (Morrow y Gage, 2000); ranas (Byrne *et al.*, 2003), peces (Montgomerie y Fitzpatrick, 2008) y mamíferos (Gomendio y Roldan, 1991; Tourmente *et al.*, 2011a). Anderson y Dixson (2002) encontraron una relación entre la longitud de la pieza media y el nivel de competencia espermática. Posteriormente, Anderson *et al.* (2005) encontraron una relación positiva entre el volumen de la pieza intermedia y el nivel de competencia espermática. Estudios posteriores en roedores también revelaron que existe una correlación positiva entre la longitud de la cabeza y el nivel de competencia espermática (Gómez-Montoto *et al.*, 2011b).

Las dimensiones del espermatozoide también son muy variables entre machos de la misma especie o incluso de la misma población (Thurston *et al.*, 1999; Pitnick *et al.*, 2003; Bauer y Breed, 2006). Esta variación no se debe a defectos de la espermiogénesis (Hoosken *et al.*, 2003), ni es una consecuencia de alometría, ya que se ha observado que el tamaño de los espermatozoides no se correlaciona con el tamaño corporal en muchas especies (Morrow y Gage, 2001b; Tourmente *et al.*, 2011a). Lo que sí se ha demostrado es que la variación intra e inter-individual entre machos de distintos taxones es menor cuando los niveles de competición espermática aumentan (Breed *et al.*, 2007; Immler *et al.*, 2008). Esto sugiere que la selección sexual postcópula en forma de competición espermática ejerce una fuerza estabilizadora que actúa sobre la espermiogénesis y reduce los errores que generan morfo-anomalías (Hunter y Birkhead; 2002).

A pesar de la tendencia de los espermatozoides a evolucionar hacia unas dimensiones óptimas, siempre persiste una pequeña porción de variación. Un estudio en aves (Calhim *et al.*, 2007) propone una explicación acerca de cómo se mantiene esa variación en dimensiones dentro de la población. Se encontró evidencia de que los individuos cuyos espermatozoides tienen cabezas grandes y un flagelo corto dejan más descendencia cuando se aparean con hembras emparejadas con otros machos. Por otro lado, los machos emparejados con esas hembras producen espermatozoides con flagelos largos y cabezas cortas en proporción a las dimensiones del flagelo. De este modo, aparecen dos patrones opuestos de selección dependiendo del papel del macho en la pareja.

Mantener una parte de la variación morfológica, incluso en situaciones donde la competición espermática es intensa, puede favorecer la evolución de distintos fenotipos espermáticos. El heteromorfismo espermático es un caso de variación morfológica que ha sido descrito en varios taxones (Bacetti, 1972; Silberglied *et al.*, 1984; Dallai *et al.*,

2006). En general, cuando hay casos de dimorfismo, sólo una de las formas es funcional, en el sentido de que es capaz de participar en la fecundación, mientras que los otros fenotipos pueden tener una función diferente. En moluscos, se ha observado que la forma no funcional (paraesperma) sirve como vehículo para el transporte de los espermatozoides con capacidad fecundante (euesperma). Además, el paraesperma retrasa el tiempo en que la hembra vuelve a aparearse, desplaza el esperma de machos rivales y bloquea la entrada en las espermatecas de la hembra (Till-Bottraud *et al.*, 2005). Es posible que en contextos de competición espermática los espermatozoides tengan más funciones que la de fecundar al óvulo. La selección sexual puede modelar un tipo específico de espermatozoide capaz de desarrollar todas estas funciones, o por el contrario, dividir el trabajo y crear distintos fenotipos preparados para llevar a cabo diferentes funciones (Pitnick *et al.*, 2009).

## **Morfometría geométrica**

¿Por qué es necesario cuantificar las variaciones morfológicas de los organismos?

En una era en la que la biología molecular y la secuenciación masiva proporcionan herramientas para conocer la evolución de genes que participan en procesos reproductivos, es importante recordar la necesidad de estudios a otros niveles. Mientras que se avanza en el conocimiento de la función de nuevos genes, también surgen nuevas preguntas que es necesario e importante responder. El análisis de la forma es una parte esencial de muchos estudios biológicos. Estas variaciones en la forma de un organismo son el resultado de multitud de procesos biológicos subyacentes tales como el desarrollo ontogenético, las modificaciones genéticas, la diversificación evolutiva o la adaptación a factores ambientales. Las diferencias en la forma de distintos organismos pueden

revelar procesos de homología, diferentes respuestas a una misma presión selectiva, o diferencias en el proceso de morfogénesis.

De manera frecuente las diferencias en forma de un organismo son descritas asemejando su forma a la de objetos geométricos conocidos. De este modo las estructuras de un organismo son descritas como más o menos circulares o elípticas. Estas comparaciones son poco precisas, especialmente cuando la forma que se intenta describir es compleja y no es del todo coincidente con la del objeto al que se intenta equiparar. Incluso cuando se trata de describir las formas más simples, estas aproximaciones no permiten expresar cuanto más circular es ese objeto. Por todo ello, es necesario caracterizar la forma de un organismo de forma cuantitativa para poder detectar cambios sutiles con una mayor resolución que utilizando un enfoque meramente cualitativo.

La Morfometría es la rama de la Biología que se ocupa de caracterizar y cuantificar las variaciones en forma de los diferentes organismos. El primero en utilizar la morfometría geométrica para caracterizar las variaciones morfológicas en un organismo fue el pintor Alberto Durero en 1528. Su objeto de estudio fueron las proporciones de la cabeza humana. En el siglo XIX los trabajos en biometría de D'Arcy Thompson, Francis Galton o Karl Pearson sentaron algunos de los principios en los que se basa la morfometría actual. A pesar de ser una ciencia de larga tradición, el desarrollo de la morfometría geométrica tal como la conocemos ahora no comenzó hasta finales de la década de 1980 (Bookstein, 1991; Bookstein, 1996).

## La teoría de medidas

La morfometría tradicional mide los cambios morfológicos que se producen en los organismos en base a sus dimensiones lineales. Los resultados que se obtienen de estas variables son datos numéricos que describen fundamentalmente diferencias en tamaño y no permiten la visualización de los cambios en forma. Aplicados a este propósito, los análisis de morfometría geométrica suponen un gran avance. No sólo son capaces de describir los cambios morfológicos de una forma precisa, sino que además permiten su visualización y cuantificación. El cambio más significativo entre la morfometría tradicional y la morfometría geométrica reside en la Teoría de Medidas.

Mediante el uso de dimensiones lineales la morfometría tradicional describe variaciones en ancho, largo o área de un organismo. En algunas ocasiones estas medidas contienen menos información de lo que se esperaría *a priori*, ya que pueden solapar o partir desde un mismo punto, por lo que no es posible garantizar su independencia geométrica. En muchas ocasiones las medidas son redundantes, como pueden ser distintas medidas tomadas a lo largo de un mismo eje. Por otro lado el solapamiento de las medidas dificulta la descripción la variación local en forma. Además, las medidas morfométricas tradicionales no contienen información geométrica del objeto. A estos inconvenientes hay que añadir el problema de la homología. Esto es, las medidas corporales de un organismo pueden no ser comparables entre especies. El esquema de medidas clásico que utiliza la morfometría tradicional puede mejorarse de forma significativa utilizando morfometría geométrica sin alterar en exceso su concepto matemático. Sustituyendo el uso de dimensiones lineales por *landmarks* distribuidos de forma estratégica para capturar toda la variación biológica.

## ***Landmarks* (hitos morfológicos)**

La visión de la forma como un conjunto de *landmarks* es el núcleo de la teoría de morfometría geométrica. Un *landmark* es un locus anatómico discreto que puede ser identificado en todos los individuos que componen la muestra de estudio. En los estudios morfométricos basados en el uso de *landmarks* estos son elegidos *a priori*, dependiendo del organismo de estudio, y una vez concluido el análisis revelan cuáles son las variables biológicamente informativas. Como norma general los *landmarks* elegidos deben ser capaces de cuantificar toda la variación observada y deben cumplir cuatro criterios básicos: (1) deben ser homólogos; (2) todas las configuraciones de la muestra deben tener el mismo número de *landmarks*; (3) deben estar en el mismo plano y (4) deben poder identificarse de forma fiable y repetible.

Los *landmarks* pueden clasificarse en tres tipos (Bookstein, 1991). Los tipo I son aquellos que coinciden con una estructura anatómica concreta. Los de tipo II son aquellos que definen puntos de máxima o mínima curvatura. Los *landmarks* tipo III son *landmarks* poco precisos y se definen en términos geométricos, como *el punto más alejado de*; al contrario de los otros dos tipos de *landmarks* no puede identificarse de forma local, sino que es necesario tomar como referencia la estructura completa.

Los *landmarks* proporcionan una representación simplificada del objeto y cada una de las posibles configuraciones corresponde de forma inequívoca a un individuo. Cuando las coordenadas de cada *landmark* se representan formando una imagen, se obtiene un valor numérico de la morfología de ese individuo. Este enfoque permite describir las diferencias en forma de manera cuantitativa y facilita el análisis estadístico.



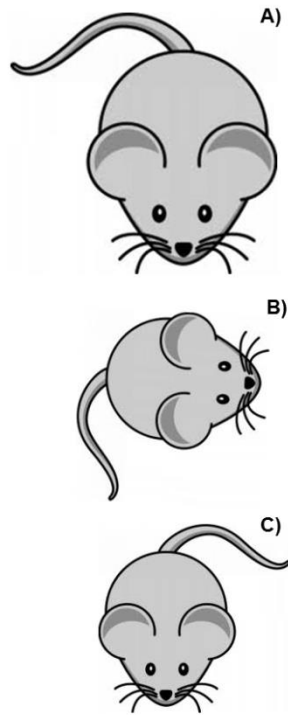
## **Disgregación de una estructura en su forma y tamaño**

La descripción más general de los organismos se realiza en función de su forma y tamaño. Uno de los mayores problemas al que se ha enfrentado la morfometría es la separación de los efectos de ambos. Esta tarea resulta difícil cuando el tamaño del organismo de estudio varía dentro de un rango muy amplio, y aún más cuando las diferencias en términos de forma son sutiles. Cualquier método teórico que sea capaz de analizar ambos factores por separado puede ser discutido utilizando el argumento de que el tamaño separado de la forma no puede ser considerado tamaño. Otro motivo de controversia proviene de los estudios en heterocronía, donde algunos investigadores no encuentran razón biológica alguna para analizar ambos de forma separada (Klinenberg, 1998). Incluso desde la aceptación de la idea de que forma y tamaño presentan una fuerte interdependencia su análisis por separado aporta información sumamente valiosa, ya que no toda la variación en la forma puede ser explicada por variación en el tamaño, pero si puede quedar enmascarada por ella.

## **Teoría de la forma**

El rápido avance de la morfometría geométrica ha sido posible gracias al desarrollo matemático de La Teoría de la Forma (Kendall, 1977). Antes que nada necesitamos un concepto definido de lo que se entiende por forma y tamaño. El tamaño está relacionado con la escala del objeto, mientras que la forma tiene que ver con sus proporciones. Aunque conceptualmente puede resultar sencillo, hay numerosas definiciones propuestas para las variables forma y tamaño en un contexto morfométrico (Bookstein, 1989). La forma de un organismo engloba el conjunto de sus características geométricas exceptuando su tamaño, posición y orientación (Kendall, 1977) (Figura 3).

Por lo tanto estas tres variables se pueden extraer sin riesgo de perder información relativa a la forma del objeto (Dryden y Mardia, 1998), ya que el único criterio para determinar si dos estructuras tienen la misma forma es su similitud geométrica.



**Figura 3.** Representación gráfica que muestra como los cambios en (A) tamaño, (B) posición y (C) orientación no afectan a la forma de un organismo.

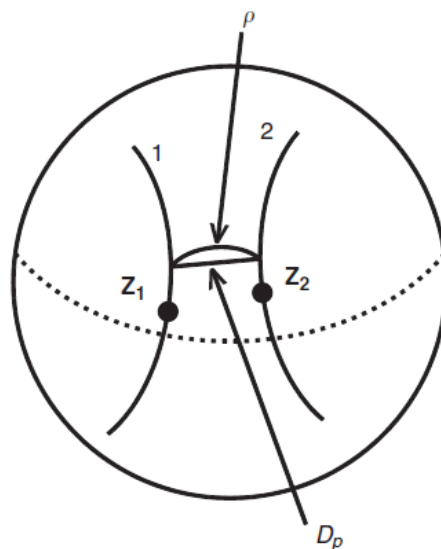
Aplicando morfometría geométrica toda la información referida a forma queda retenida en la configuración de *landmarks*. Un *landmark* individual no puede ser objeto de comparación, ya que no satisface la definición de forma propuesta por Kendall (1977). De este modo, las comparaciones se realizan entre las configuraciones y los resultados del estudio se basan en el conjunto de los datos, en lugar de en una sola variable, como ocurre en la morfometría tradicional. Representar la forma de un organismo mediante su configuración de *landmarks* puede dejar fuera aspectos importantes como la curvatura. La curvatura es una característica inherente a la forma y se mantiene después de filtrar los efectos de la localización, escala y traslación. Sin

embargo, no es capturada de forma eficiente por la configuración de un set de *landmarks*. Para solventar este problema se introdujeron los *semilandmarks*.

El uso de *semilandmarks*, permite el estudio de estructuras curvadas en las que no es posible ubicar *landmarks* de tipo I y II (Bookstein, 1991, 1996). Estos *semilandmarks* requieren un procesamiento específico conocido como *resliding*, para eliminar todo lo que no sea información biológica sobre la curvatura de esa estructura. Los *semilandmarks* se colocan de forma equidistante a lo largo de la curva y el *resliding* los reposiciona de forma que se minimice la energía de deformación entre especímenes con respecto a los *landmarks* tipo I y II de la configuración. Se han descrito dos enfoques para el uso de *semilandmarks* (Zelditch *et al.*, 2004). El primero propone hacer mínima la energía de deformación entre configuraciones de distintos especímenes (Bookstein, 1997; Bookstein *et al.*, 2003). Mientras que el otro enfoque propone minimizar las distancias Procrustes entre las configuraciones de *landmarks* y la forma consenso (Zelditch *et al.*, 2004).

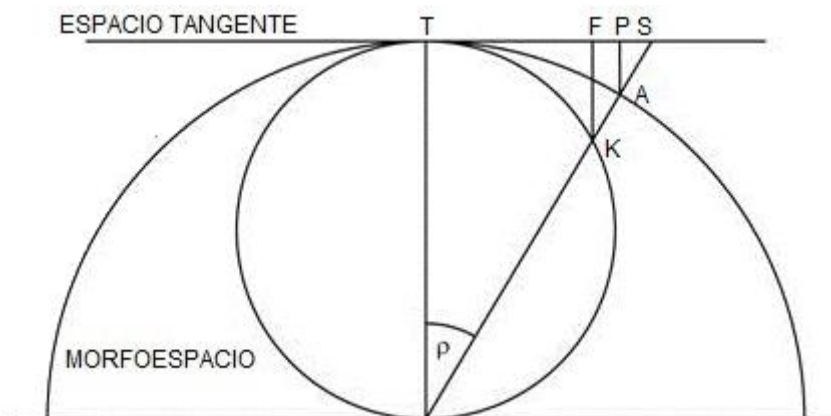
La aplicación de la Teoría de la Forma requiere de dos abstracciones. La primera consiste en reducir la forma del organismo a un conjunto de *landmarks* medible. La segunda, requiere representar cada una de las configuraciones de *landmarks* como un solo punto en el espacio, entendiendo que cada punto representa la forma de un individuo. Algunas de estas configuraciones pueden diferir en tamaño del centroide, y otras en localización (coordenadas del centroide). Para hacer coincidir todas las configuraciones en tamaño y posición es necesario aplicar dos restricciones: (1) centrar todas las configuraciones en el eje de coordenadas y (2) estandarizar a 1 el tamaño del centroide. Mediante estas dos reglas cada configuración de *landmarks* se convierte en una pre-forma. Estas pre-formas se proyectan en un pre-morfoespacio. El pre-

morfoespacio es una hiperesfera de radio 1 donde están proyectadas todas las configuraciones de *landmarks* una vez se han centrado en el origen de coordenadas y se ha escalado a 1 su centroide. Como consecuencia del centrado, las configuraciones de *landmarks* que difieren únicamente en posición se representan como un mismo punto en este pre-morfoespacio. Debido al escalado, las configuraciones que sólo difieren en tamaño del centroide también se representan como un mismo punto en este espacio. Las dimensiones de este espacio son  $KM-(M+1)$ , donde  $K$  es el número de *landmarks* y  $M$  las dimensiones de cada *landmark* (Dryden y Mardia, 1998). En el pre-morfoespacio, el conjunto de configuraciones de *landmarks* que deben ser transformadas mediante rotación se encuentran a lo largo de un arco conocido como fibra que ocupa la superficie de la hiperesfera que constituye el pre-morfoespacio. La distancia entre las formas en el pre-morfoespacio es la longitud del arco más corto que conecta las fibras que representan esas formas y se conoce como distancia Procrustes (Figura 4).



**Figura 4.** Disposición de las fibras en el pre-morfoespacio. Los puntos  $Z_1$  y  $Z_2$  son las localizaciones de dos pre-formas en la hiperesfera. Las curvas 1 y 2 que pasan a través de  $Z_1$  y  $Z_2$ , respectivamente, son fibras de pre-formas que difieren de  $Z_1$  y  $Z_2$  sólo en su rotación. La línea punteada señala el ecuador de la hiperesfera. El arco  $\rho$  es la distancia más corta entre las fibras 1 y 2. La longitud del arco es la distancia Procrustes. La longitud de la cuerda ( $D_p$ ) es la distancia Procrustes parcial. Modificado de Zelditch *et al.* (2004).

Para construir el morfoespacio se selecciona una forma de cada fibra con una orientación adecuada que se utiliza como forma de referencia. El resto de las formas se orientan coincidiendo con esa forma de referencia. Esta orientación debe de ser tal que minimice la raíz cuadrada de la suma de las diferencias al cuadrado entre las coordenadas de los *landmarks* de sus correspondientes configuraciones. Cuando esta minimización se hace simplemente mediante rotación de configuraciones la distancia resultante se conoce como distancia Procrustes parcial y es la longitud de la cuerda del arco entre dos fibras en el pre-morfoespacio. Las configuraciones de *landmarks* que cumplen esta condición se considera que están en superposición de Procrustes parcial con respecto a la referencia. Después de la rotación de las configuraciones en superposición de Procrustes parcial, las diferencias entre las configuraciones de *landmarks* pueden minimizarse aún más mediante el reescalado de estas a el  $\cos(\rho)$ . Cuando las configuraciones de *landmarks* han sido reescaladas se considera que la superposición de Procrustes es completa con respecto a la forma de referencia y la distancia entre las configuraciones de *landmarks* se llama distancia Procrustes. El conjunto de configuraciones en superposición completa comprende una hiperesfera de radio  $\frac{1}{2}$ . Dentro se encuentra la hiperesfera con las formas en superposición parcial de Procrustes (Figura 5). En el punto donde la hiperesfera y el plano son tangentes se sitúa la forma de referencia o consenso, calculada como la forma media resultante a partir de todas las configuraciones de *landmarks* que componen la muestra. El resto de las configuraciones de *landmarks* se sitúan también a lo largo del espacio tangente y se proyectan en el morfoespacio.

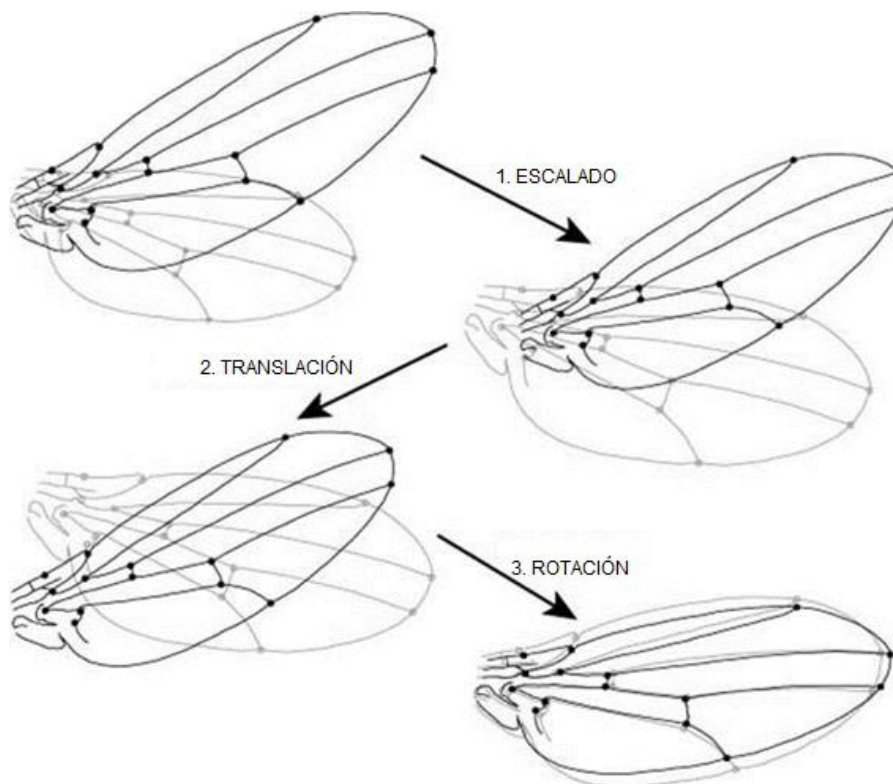


**Figura 5.** Representación geométrica del morfoespacio. El círculo interno es el pre-morfoespacio donde las configuraciones de *landmarks* de la forma representada por K están centradas y escaladas a  $\cos(\rho)$ . El hemisferio exterior es una sección del espacio donde la forma representada por A está centrada y escalada a tamaño de centroide 1. En el punto donde el espacio tangente toca la esfera se encuentra la configuración de *landmarks* consenso (T). F, P y S son otras proyecciones en el espacio tangente de otras configuraciones de *landmarks* de la muestra.

### Superposición de Procrustes

Como se ha mencionado anteriormente, la forma de un organismo es el conjunto de sus características geométricas exceptuando su tamaño, posición y orientación. Para extraer la información relativa a forma, la información acerca de la posición, la orientación y la escala debe de ser eliminada. Existen diferentes soluciones a este problema, pero en su mayoría se basan en realizar cambios a nivel de posición, orientación, y escala en las configuraciones de *landmarks*. Debido a que los procesos de translación, rotación y reescalado no cambian la forma de las configuraciones, se pueden aplicar estas operaciones libremente sin alterar la forma del objeto.

Estos componentes adicionales pueden eliminarse reescalando las configuraciones de *landmarks* a un tamaño estandarizado, desplazándolas a una posición estándar y girándolas a una orientación estándar (Figura 6). La variación que se mantiene en las configuraciones de *landmarks* tras aplicarles estos cambios es exclusivamente variación asociada a forma. Este proceso es conocido como superposición de Procrustes (Gower, 1975; Rohlf y Slice, 1990; Goodall, 1991) y debe su nombre al mito griego de Procrusto.



**Figura 6.** Resumen del proceso de superposición de Procrustes. Los componentes de la variación no relacionados con forma se eliminan reescalando al mismo tamaño las configuraciones de *landmarks*, desplazando a la misma ubicación los centroides, y girando los *landmarks* a una posición común.

El proceso de superposición de Procrustes consta de tres pasos. En el primer paso, todos los objetos se escalan a tamaño de centroide 1. Esto se realiza, para cada objeto, dividiendo las coordenadas de cada *landmark* entre el tamaño del centroide de toda la configuración de puntos de referencia. En el segundo paso, las configuraciones se mueven a una posición común. Para ello, se calculan los promedios de las coordenadas X e Y de todos los *landmarks* y estos promedios se restan de las coordenadas de cada *landmark*. Como resultado, los centros de gravedad (centroide) de las configuraciones de landmarks se desplazan al origen de coordenadas. En el paso final, las configuraciones de *landmarks* se rotan, de modo que la suma de las distancias al cuadrado de los *landmarks* sea mínima.

## **Representación Gráfica**

Habitualmente en los estudios de morfometría geométrica los cambios en la forma se representan mediante una técnica llamada *thin plate spline* (rejilla de deformación plana). Este método fue ideado por D'Arcy Thompson (1961) y desarrollado por Bookstein (1989). En esencia un *thin plate spline* es una interpolación utilizada para predecir las diferencias en la forma entre la configuración de *landmarks* consenso y cualquier otra configuración de *landmarks* de la muestra. Lo que hace esta interpolación es minimizar la energía de deformación entre ambas configuraciones. De manera metafórica, esta energía de deformación se define como la cantidad de energía necesaria para deformar una placa de acero uniforme e infinita entre dos puntos de la misma. Aplicar este concepto a una configuración de *landmarks*, implica modelar el desplazamiento de sus *landmarks* en el plano X e Y, y transferirlos al plano Z para poder visualizarlos. La energía de deformación, además, aporta una medida de escala espacial. Es decir, es necesaria una mayor cantidad de energía para deformar la placa



entre configuraciones de *landmarks*, cuyos *landmarks* están muy juntos, que entre configuraciones con *landmarks* más espaciados.

## OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha consistido en explorar cómo la selección sexual postcópula es capaz de modelar la morfología espermática. Para ello se han estudiado 29 especies de roedores muroideos pertenecientes a distintos géneros, las cuales, a pesar de ser filogenéticamente cercanas, tienen espermatozoides que difieren considerablemente en cuanto a forma y dimensiones y, además, representan un rango amplio en niveles de competición espermática.

Los objetivos específicos han sido:

- Caracterizar las variaciones en dimensiones y velocidad los espermatozoides de especies de roedores y examinar si el coeficiente de variación de ambos parámetros disminuye a medida que aumenta el nivel de competición espermática.
- Aplicar herramientas de morfometría geométrica para evaluar la variación morfológica de los espermatozoides de roedores y se examinar su precisión frente al uso de métodos tradicionales de morfometría y estimaciones de forma a partir de fórmulas que empleas dimensiones lineales, tales como las que se emplean en análisis de morfología espermática asistido por ordenador.
- Evaluar las diferencias y similitudes más destacables en el diseño de espermatozoides de tres linajes de roedores muroideos (Arvicolinae, Cricetinae, Murinae) mediante un análisis comparativo de morfológica de la cabeza del espermatozoide empleando morfometría geométrica.
- Analizar si las diferencias morfológicas del gancho (curvatura, longitud) presente en la cabeza de roedores muroideos están asociadas a diferencias en niveles de competición espermática y si existe relación con otros parámetros de calidad seminal como es la velocidad de natación.
- Explorar posibles relaciones entre forma de la cabeza espermática y la velocidad de natación de los espermatozoides, ateniendo no sólo a la forma, caracterizada mediante análisis de morfometría geométrica, sino también disgregando la velocidad en componentes de velocidad progresiva global y trayectoria de natación.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES**

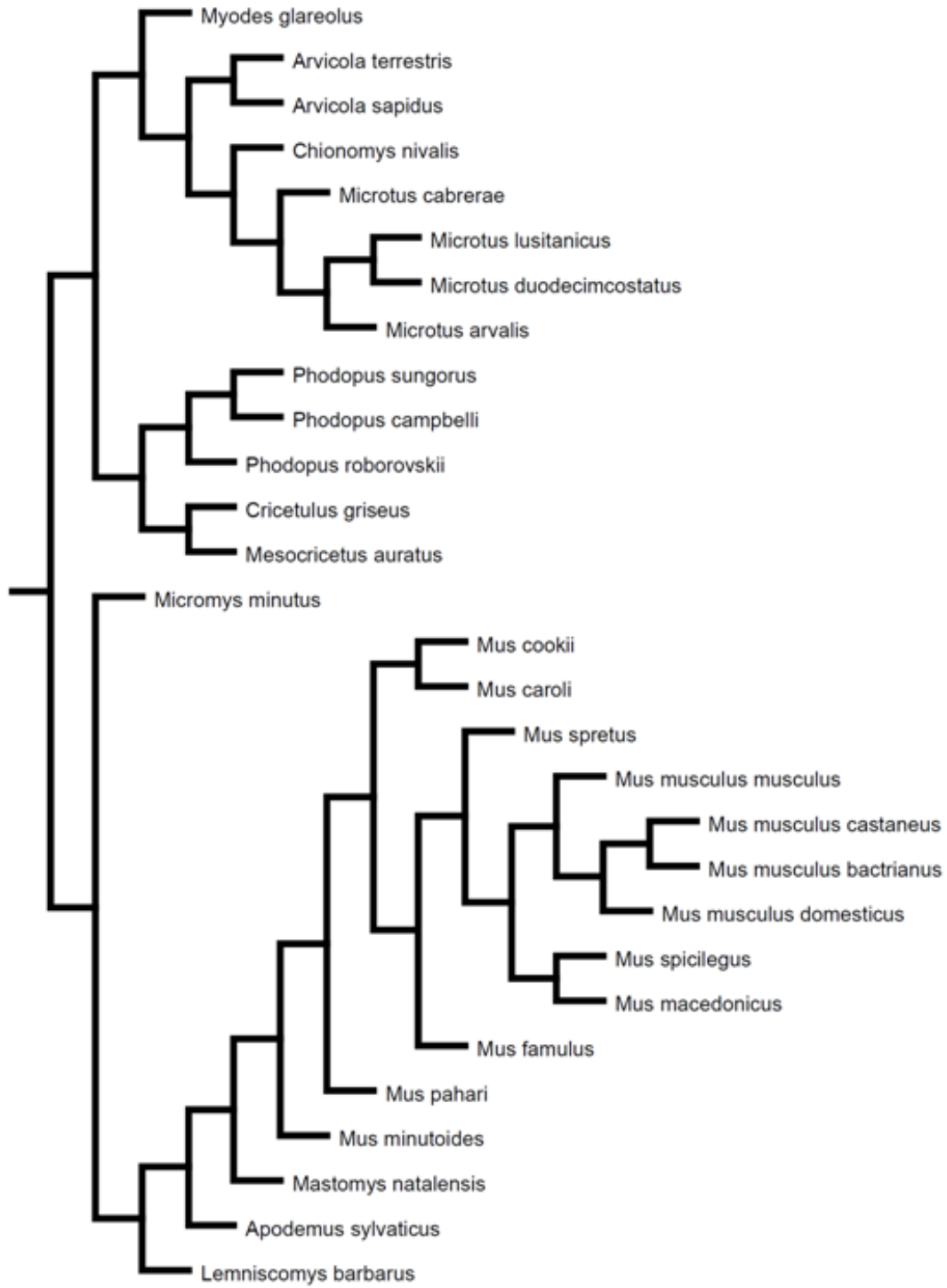
#### **Animales**

Se utilizaron machos adultos de 29 especies de roedores. La procedencia de los animales es diversa. Algunas especies han sido capturadas en el campo durante la época reproductora, con los correspondientes permisos de la Junta de Castilla y León y de la Comunidad Autónoma de Madrid. El resto de especies proceden de colonias establecidas con animales silvestres y mantenidas en cautividad durante algunas generaciones en el Laboratorio de Genoma y Poblaciones de la Universidad de Montpellier (Francia). Las especies utilizadas en el estudio están detalladas en la Tabla 1 y la relación filogenética entre ellas se muestra en la Figura 7.

**Tabla 1.** Especies de roedores muroideos y sus localidades de origen.

<b>Especie</b>	<b>Descripción</b>	<b>Localidad de origen</b>
<i>Apodemus sylvaticus</i>	(Linnaeus, 1758)	Cerrato, Castilla-León, España
<i>Arvicola sapidus</i>	Miller, 1908	Soria, Castilla-León, España
<i>Arvicola terrestris</i>	(Linnaeus, 1758)	Palencia, Castilla-León, España
<i>Chionomys nivalis</i>	(Martins, 1842)	Navacerrada, Madrid, España
<i>Cricetulus griseus</i>	Mine-Edwards, 1867	Kumtagh, China
<i>Lemniscomys barbarus</i>	(Linnaeus, 1766)	Túnez
<i>Mastomys natalensis</i>	Smith, 1834	Durban, Sudáfrica
<i>Mesocricetus auratus</i>	Waterhouse, 1839	Alepo, Siria
<i>Micromys minutus</i>	Pallas, 1771	Ulyanovsk, Rusia
<i>Microtus arvalis</i>	(Pallas, 1778)	Castilla-León, España
<i>Microtus cabrerai</i>	Thomas, 1906	Chapinería, Madrid, España
<i>Microtus duodecimcostatus</i>	de Sélys-Longchamps, 1839	Castilla-León, España
<i>Microtus lusitanicus</i>	(Gerbe, 1879)	El Ventorrillo, Madrid, España
<i>Mus bactrianus</i>	Blyth, 1846	Machad, Irán
<i>Mus caroli</i>	Bonhote, 1902	Indonesia
<i>Mus castaneus</i>	Waterhouse, 1842	Masinagudi, India
<i>Mus cookii</i>	Ryley, 1914	Tailandia
<i>Mus domesticus</i>	Schwartz, 1943	Azzemour, Marruecos
<i>Mus famulus</i>	Bonhote, 1898	Kotagiri, India
<i>Mus macedonicus</i>	Petrov y Ruzic, 1983	Slantchev Briag, Bulgaria
<i>Mus minutoides</i>	Smith, 1834	Ciudad del Cabo, Sudáfrica
<i>Mus musculus</i>	Linnaeus, 1758	Alazani, Georgia
<i>Mus pahari</i>	Thomas, 1915	Tailandia
<i>Mus spicilegus</i>	Petenyi, 1882	Ucrania
<i>Mus spretus</i>	Lataste, 1883	Azzemour, Marruecos
<i>Myodes glareolus</i> (*)	Schereber, 1780	Montseny, Barcelona, España
<i>Phodopus campbelli</i>	Campbell, 1902	Altai, Rusia
<i>Phodopus roborovskii</i>	(Satunin, 1903)	Tuva, Rusia
<i>Phodopus sungorus</i>	(Pallas, 1773)	Kazajistán

(\*) = *Clethrionomys glareolus*



**Figura 7.** Relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas en este trabajo. La filogenia ha sido reconstruida a partir de la publicada por Fabre *et al.* (2012).

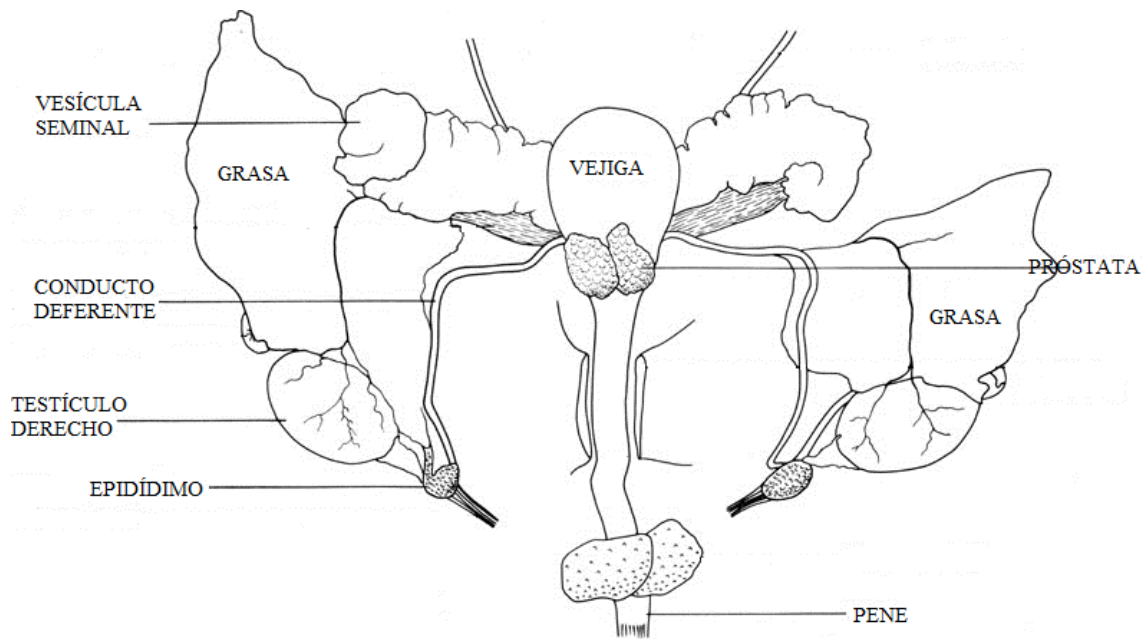
Una vez llegados al animalario del Museo Nacional de Ciencias Naturales, los ratones se mantuvieron de forma individual en jaulas de 30 x 20 x 20 cm, a una temperatura constante entre 20-22 °C, con agua y alimento *ad libitum* y con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Los animales se mantuvieron en el animalario entre 20 y 30 días para su aclimatación. Una vez transcurrido este período se procedió a su estudio.

## **Procesamiento de las muestras**

### **Medidas corporales y extracción del esperma**

Todas las manipulaciones de los animales se hicieron de acuerdo con la normativa vigente según el Real Decreto de Protección de Animales de Experimentación RD1201/2005. Los individuos fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Los procedimientos y las investigaciones a desarrollar fueron informados positivamente por el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Después de sacrificados, los animales fueron pesados en una balanza de precisión. Con un calibre digital se midió la longitud de cabeza-tronco y la longitud de la cola. A continuación se procedió a su disección realizando un corte en la línea media ventral para acceder al aparato reproductor (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema del aparato reproductor masculino en ratón.

Ambos testículos fueron extraídos y pesados. Con un calibre digital se midió su diámetro menor y mayor. Uno de los testículos se dividió en dos mitades y se conservó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El otro se fijó en líquido de Bouin durante 24 horas y posteriormente se conservó en alcohol para utilizarlo en trabajos futuros. Se extrajeron los dos epidídimos y, para permitir que los espermatozoides difundiesen en el medio, se realizaron varias incisiones y se incubaron durante 5 minutos en una placa de Petri con 1-3 ml de medio Tyrode modificado con Hepes (mT-H) precalentado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Este medio está basado en el medio de Tyrode modificado (Fraser, 1983), sin lactato ni piruvato, y está diseñado para ser utilizado bajo atmósfera de aire (Shi y Roldan, 1995). Un total de 100 ml de medio mT-H se compone de: 75ml agua MiliQ; 0,770 g de NaCl (S5886;Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos); 0,020 KCl (P5405; Sigma-Aldrich); 0,010 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10149; BDH, Poole, Gran Bretaña); 0,005 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (106345;Merck, Madrid, España); 0,1 g glucosa (G6152; Sigma-Aldrich); 0,476 g

Hepes (H4034, Sigma-Aldrich); 0,1 ml rojo fenol (P0290; Sigma-Aldrich); 0,005 g kanamicina (K4000; Sigma-Aldrich). En el momento de utilizarlo se añadieron al medio 30  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  y 40  $\mu$ l de la fracción V de albúmina bovina (A4503; Sigma-Aldrich) por cada 5 ml de medio. El pH del medio y la osmolaridad a 37 °C son de 7,4 y 295 mOsm/kg respectivamente.

### **Evaluación de los parámetros espermáticos**

#### **- Motilidad**

Para estimar la motilidad se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l de la suspensión espermática obtenida, se depositó en un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos de 22 x 22 mm. La preparación se observó en un microscopio (Eclipse 50i, Nikon, Tokio, Japón), con pletina caliente a 37° C, para evitar el shock térmico de las células, a aumentos de 10X y 40X en contraste de fase. Acto seguido se procedió a evaluar de forma subjetiva la motilidad, expresando con una escala de 0 a 5 (0, sin motilidad; 5 vigor máximo) la calidad del movimiento. El porcentaje de espermatozoides móviles y el número de células con motilidad progresiva se evaluó de forma subjetiva y se expresó en forma de porcentaje.

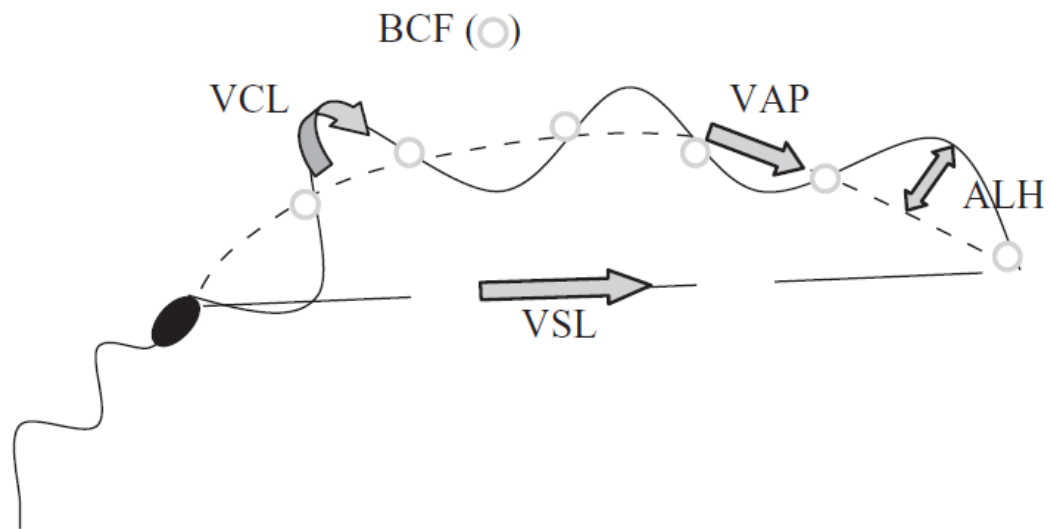


## - Cinética espermática

Se depositaron 6  $\mu\text{l}$  de la suspensión espermática a una concentración aproximada de  $4 - 6 \times 10^6$  espermatozoides/ml, en una cámara Leja (Standard Count-2 Chamber Slide 20-micron, Leja, Nieuw-Vennep, Países Bajos) de 20  $\mu\text{m}$  de profundidad y precalentada a 37° C. Esta muestra se observó a 40X en contraste de fase empleando un microscopio (Eclipse 50i, Nikon, Tokio, Japón) con pletina caliente. Mediante una cámara de video (Basler AG, Ahrensburg, Alemania) conectada al microscopio se filmaron 10 campos distintos de la muestra, utilizando el software Sperm Class Analyzer (SCA, Microptic, Barcelona) y a una velocidad de cuadro de 25 Hz. Los videos obtenidos se utilizaron para evaluar parámetros de velocidad que se describen en la Tabla 2 y se ilustran en la Figura 9.

**Tabla 2.** Descripción de los parámetros que definen la velocidad espermática.

<b>Parámetro</b>	<b>Definición</b>
VCL	Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ )
VAP	Velocidad promedio de la trayectoria ( $\mu\text{m/s}$ )
VSL	Velocidad rectilínea ( $\mu\text{m/s}$ )
LIN	Linearidad (%) = $VSL/VCL \times 100$
STR	Rectitud (%) = $VSL/VAP \times 100$
WOB	Tambaleo (%) = $VCL/VAP \times 100$
ALH	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m/s}$ )
BCF	Frecuencia de batido (Hz)



**Figura 9.** Ilustración del movimiento espermático y los parámetros que lo describen. VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad rectilínea; VAP, velocidad promedio de la trayectoria; BCF, frecuencia de batido del flagelo; ALH, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza. Tomado de Malo *et al.* (2005).

Antes de analizar los datos, se aplicaron filtros para eliminar los casos en los que  $VCL \leq 20 \mu\text{m/s}$ , para evitar células a la deriva que añaden ruido al análisis. También se eliminaron las células cuyo  $VAP > VCL$ . Esta condición es biológicamente imposible, ya que VCL representa el máximo valor de VAP, aunque en algunas ocasiones puede darse este resultado como producto del análisis (Holt y Palomo, 1996).

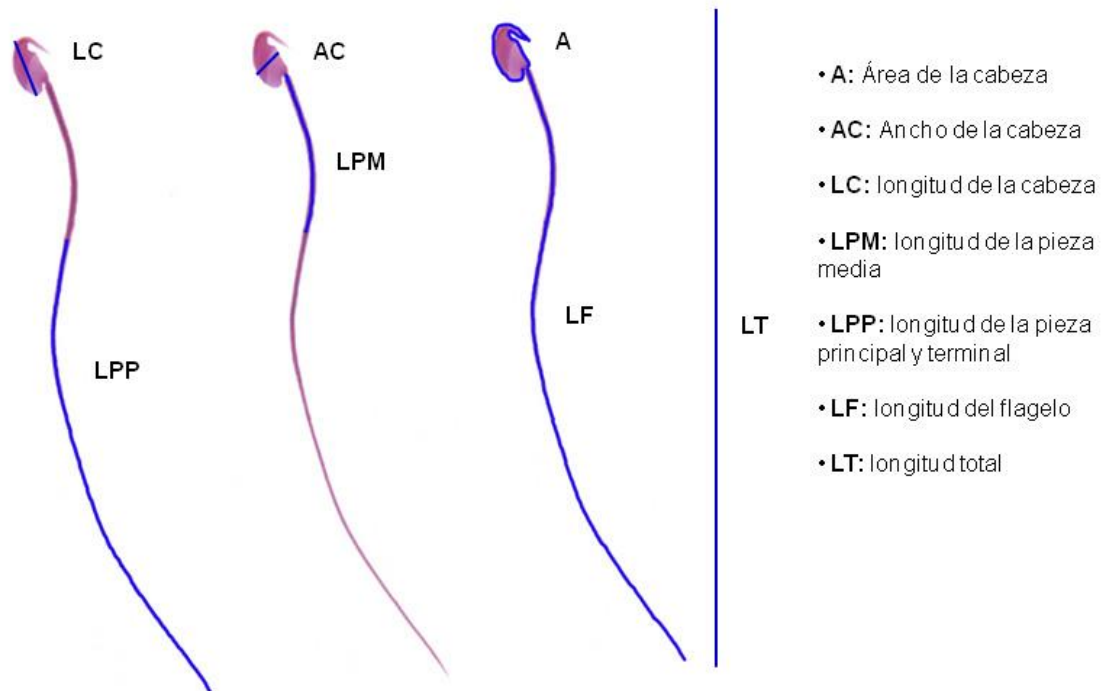
### - Morfología espermática

La morfología de los espermatozoides se analizó en frotis teñidos con Giemsa. Se depositaron  $10 \mu\text{l}$  de la solución espermática en un portaobjetos y se extendió con ayuda de un cubreobjetos de  $24 \times 24 \text{ mm}$ . El proceso se realizó sobre una placa caliente a  $37^\circ\text{C}$ .

Una vez secas las muestras se procedió a su tinción con Giemsa (Watson 1975; Tamuli y Watson, 1994). La fijación se hizo con formaldehído al 4% (211328; Panreac, Barcelona, España) en tampón tartrato-fosfato (TPB). La composición del tampón era la siguiente: 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 77 mM tartrato de sodio y potasio. Se lavaron los frotis en una jarra de Coplin con agua circulante durante 10 minutos y por último con agua destilada. A continuación los frotis se sumergieron en la solución de Giemsa durante 60 minutos. La solución de tinción estaba compuesta de: 4,5 ml de solución stock de Giemsa, 3 ml de tampón TPS y 32,5 ml de agua destilada. La solución stock de Giemsa tenía la siguiente composición: 3,8 g de Giemsa (109203; Merck), 375 ml de metanol absoluto (106009; Merck) y 125 ml de glicerol (104092; Merck). Esta solución stock se dejó reposar durante una semana a 37 °C y agitando 3 veces por día. Los frotis se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Después se montaron con DePeX (360292F; BDH).

Las muestras fueron evaluadas en un microscopio con óptica Pan-Flúor Eclipse E-600 (Nikon, Tokio, Japón) empleando campo claro y con un aumento de 1000X. Las células se fotografiaron mediante una cámara (DS5; Nikon, Tokio, Japón) conectada al microscopio utilizando el software NIS elements v 3.0 (Nikon, Tokio, Japón) específico para captura de imágenes.

De cada una de las células se tomaron medidas de dimensiones lineales para su caracterización morfológica, empleando el software ImageJ v1.41(NIH, Bethesda, Estados Unidos). Las medidas tomadas se ilustran en la Figura 10 y fueron las siguientes: longitud de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ), ancho de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ), área de la cabeza ( $\mu\text{m}^2$ ), longitud de la pieza media ( $\mu\text{m}$ ), longitud de la pieza principal (incluye también la pieza terminal) ( $\mu\text{m}$ ), longitud del flagelo ( $\mu\text{m}$ ), longitud total ( $\mu\text{m}$ ).



**Figura 10.** Descripción de las dimensiones espermáticas medidas en este trabajo.

### **Evaluación de la forma de la cabeza mediante morfometría geométrica**

Con el fin de realizar análisis de forma mediante morfometría geométrica es necesario tomar imágenes del objeto de estudio. Para que estas imágenes sean comparables entre sí deben de tener la misma orientación, la misma escala y estar tomadas al mismo aumento. Para realizar este trabajo se fotografiaron 25 células de cada individuo con su correspondiente escala, en campo claro y a un aumento de 1000X, utilizando el dispositivo de captura de imagen descrito en el apartado anterior. El proceso de digitalización, superposición de Procrustes y análisis estadístico de los datos se detalla en el Capítulo 5.

## **Análisis estadístico**

En los datos unidimensionales se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar que los datos tenían distribuciones normales. En caso de no ser así, los datos se transformaron mediante logaritmos o arcosenos para lograr su ajuste a una curva normal.

## **Regresión de mínimos cuadrados con corrección filogenética (PGLS)**

Debido a la naturaleza de los datos, es importante poder controlar los efectos de la filogenia en los test estadísticos. De este modo, se puede garantizar que las diferencias observadas son producto de la variación biológica y están libres de la influencia del parentesco entre especies. Los análisis se realizaron mediante regresiones múltiples en un módulo de R Caper v 0.5 (Orme *et al.*, 2012) (R Foundation for Statistical Computing), que lleva implementada una herramienta de corrección filogenética. La regresión se realiza mediante el método de mínimos cuadrados. También se estima un parámetro filogenético lambda ( $\lambda$ ) a partir de la longitud de las ramas del árbol filogenético una vez que se han ajustado los datos a un modelo de evolución Browniano. Cuando los valores de  $\lambda$  están cerca de cero, se puede asumir que las variables han evolucionado independientemente de la filogenia. Si por el contrario el valor de  $\lambda$  es próximo a 1 nos indicaría que las variables presentan una fuerte asociación filogenética entre ellas. El valor de máxima verosimilitud de  $\lambda$  se compara frente a dos modelos con  $\lambda = 0$  y  $\lambda = 1$ .

## Índice de competición espermática

Una de las respuestas mejor estudiadas a la selección sexual postcópula es el incremento de la masa testicular con respecto a la masa corporal cuando aumenta el nivel de competición espermática. Esta tendencia se ha observado en varios taxones (Gomendio *et al.*, 1998; Simmons, 2001; Birkhead *et al.*, 2009). En especies que producen varias crías por camada se ha encontrado que el aumento de la masa testicular relativa (al tamaño corporal) está correlacionado con un alto índice de paternidad (Ramm *et al.*, 2005; Soulsbury, 2010). Por lo tanto se puede considerar que un aumento de la masa testicular con respecto a la masa corporal constituye un índice fiable del nivel de competición espermática y como tal se utiliza en algunas regresiones de este trabajo a modo de variable predictora. También se calculó el tamaño relativo de los testículos, utilizando la fórmula para roedores  $Y = 0.031 X^{0.77}$  (Kenagy y Trombulack, 1986), donde Y es la masa en gramos de ambos testículos y X es el peso corporal en gramos. Este índice no se utilizó en los análisis estadísticos pero sí en la representación gráfica de algunos resultados. Los valores de masa corporal, masa testicular y el tamaño relativo de los testículos para cada una de las especies utilizadas en este trabajo se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Valores de masa corporal, masa testicular e índice de competición espermática, medido como tamaño relativo de los testículos (RTS), de las especies utilizadas en este trabajo.

<b>Especie</b>	<b>Masa corporal (g)</b>	<b>Masa testicular (g)</b>	<b>Tamaño relativo de testículos (RTS)</b>
<i>Apodemus sylvaticus</i>	30,46	1,08	2,52
<i>Arvicola sapidus</i>	217,67	2,24	1,14
<i>Arvicola terrestris</i>	91,56	0,41	0,41
<i>Chionomys nivalis</i>	50,33	1,03	1,62
<i>Cricetulus griseus</i>	33,72	1,78	3,83
<i>Lemniscomys barbarus</i>	44,62	0,67	1,15
<i>Mastomys natalensis</i>	81,17	0,92	1,01
<i>Mesocricetus auratus</i>	124,99	3,50	2,75
<i>Micromys minutus</i>	8,09	0,12	0,77
<i>Microtus arvalis</i>	44,26	0,44	0,77
<i>Microtus cabreræ</i>	45,32	0,15	0,26
<i>Microtus duodecimcostatus</i>	29,55	0,08	0,19
<i>Microtus lusitanicus</i>	17,73	0,09	0,33
<i>Mus bactrianus</i>	18,06	0,18	0,61
<i>Mus caroli</i>	18,07	0,14	0,50
<i>Mus castaneus</i>	18,82	0,08	0,26
<i>Mus cookii</i>	23,66	0,31	0,86
<i>Mus domesticus</i>	22,05	0,11	0,32
<i>Mus famulus</i>	27,40	0,05	0,13
<i>Mus macedonicus</i>	20,10	0,30	0,95
<i>Mus minutoides</i>	5,54	0,10	0,90
<i>Mus musculus</i>	21,85	0,14	0,43
<i>Mus pahari</i>	33,15	0,13	0,28
<i>Mus spicilegus</i>	18,10	0,43	1,49
<i>Mus spretus</i>	18,17	0,30	1,04
<i>Myodes glareolus</i>	29,27	0,63	1,50
<i>Phodopus campbelli</i>	48,52	1,93	3,16
<i>Phodopus roborovskii</i>	25,72	1,06	2,82
<i>Phodopus sungorus</i>	46,70	0,99	1,67

## **Estadística univariante**

Con los datos se realizaron regresiones simples, análisis de la varianza (ANOVA), análisis de componentes principales (PCA) y test-*t* apareados.

Las coordenadas Procrustes de Morfometría Geométrica fueron analizadas mediante estadística multivariante y los análisis se describen de forma detallada en cada capítulo.



## CAPÍTULO 3

# **EFFECTO DE LA SELECCIÓN SEXUAL POSTCÓPULA SOBRE EL GRADO DE VARIACIÓN DE LAS DIMENSIONES ESPERMÁTICAS**

## **Introducción**

Diversos estudios comparativos han demostrado que varios taxones responden al aumento en los niveles de competición espermática incrementando las dimensiones de los espermatozoides, y esto a su vez se traduce en un incremento de la velocidad de natación (mamíferos: Gomendio y Roldan, 1991, 2008; Tourmente *et al.*, 2011a y b; peces: Fitzpatrick *et al.*, 2009; aves: Lüpold *et al.*, 2009). En un contexto de competición espermática la capacidad de aumentar la velocidad de natación es un rasgo adaptativo que maximiza el éxito reproductor de un individuo (Birkhead *et al.*, 1999). En mamíferos, los espermatozoides responden a la competición espermática aumentando las dimensiones de todos sus componentes, lo que conlleva un incremento en el tamaño total de la célula (Tourmente *et al.*, 2011a). Un espermatozoide con una cabeza alargada puede ser más eficiente desde el punto de vista hidrodinámico al reducir los efectos de la fuerza de rozamiento; asimismo, las piezas medias más voluminosas pueden albergar más mitocondrias y producir más energía. Mientras que los espermatozoides con una pieza principal más larga pueden generar más fuerza motriz al desplazar mayor cantidad de medio en el batido (Tourmente *et al.*, 2011a, 2013; Humphries *et al.*, 2008; Lüpold *et al.*, 2009). Los estudios realizados comparando especies cercanas, además de otros realizados a nivel intra-específico, sugieren que un primer paso en la evolución del diseño espermático puede ser la modificación de las dimensiones de la cabeza (Malo *et al.*, 2006; Gómez-Montoto *et al.*, 2011b). Estas

modificaciones hacen que el espermatozoide nade de una forma más eficiente reduciendo la resistencia al medio (Gillies *et al.*, 2009). Las modificaciones de la cabeza pueden implicar cambios en su elongación (Malo *et al.*, 2006), un incremento en su área y el desarrollo de apéndices tales como el gancho apical en roedores (Gómez-Montoto *et al.*, 2011b).

La competición espermática es una poderosa fuerza selectiva que promueve cambios en las dimensiones del espermatozoide. Sin embargo, es la tasa metabólica del individuo la que determina las dimensiones que un espermatozoide puede alcanzar (Tourmente *et al.*, 2011b, Gomendio *et al.*, 2011). Por todo esto, el tamaño de los espermatozoides de una especie dependerá de su tamaño corporal. Los mamíferos pequeños, como los roedores, son capaces de responder al aumento en el nivel de competición espermática incrementando las dimensiones de sus espermatozoides. Algo que los mamíferos grandes no pueden hacer.

La variación de las dimensiones espermáticas a nivel intra-específico y en concreto a nivel intra-individuo es una cuestión poco estudiada. En las poblaciones silvestres los machos difieren en su calidad seminal, sus dimensiones espermáticas y la velocidad de natación de sus espermatozoides, siendo estas diferencias las que tienen mayor impacto en la fertilidad de un individuo (Malo *et al.*, 2005; 2006). Los modelos teóricos proponen que existe un prototipo de espermatozoide óptimo para cada nivel de competición espermática (Parker, 1993). Este modelo predice que cuando la presión de la competición espermática es muy intensa, los individuos tienden a producir espermatozoides que se ajustan al modelo óptimo, mientras que cuando la presión selectiva se relaja los eyaculados son más heterogéneos (Parker, 1993).

Los estudios en aves aportan evidencia a favor de lo que proponen los modelos teóricos (Calhim *et al.*, 2007; Kleven *et al.*, 2008; Lijfield *et al.*, 2010). Estos trabajos encontraron que el incremento en el nivel de competición espermática reduce la variación en las dimensiones de los espermatozoides a nivel inter-individual. De todos modos, los trabajos sobre variación de las dimensiones espermáticas en aves han generado resultados contradictorios. Uno de ellos encontró una relación negativa entre el nivel de competición espermática y el grado de variación en las dimensiones (Immler *et al.*, 2008), mientras que otros encontraron una relación débil o no significativa entre las dos variables (Kleven *et al.*, 2008; Lijfield *et al.*, 2010). Además, se ha descrito que puede existir una variación considerable en los espermatozoides de aves paseriformes muy promiscuas (Calhim *et al.*, 2011). La variación en las dimensiones espermáticas a nivel intra-individual también se ha documentado en mamíferos (Breed *et al.*, 2007), aunque la relación entre competición espermática y el nivel de variación en dimensiones no se ha explorado antes en este taxón, con excepción de un trabajo reciente que evidenció una relación negativa entre el nivel de competición espermática y la longitud del gancho apical en roedores (Sanderá *et al.*, 2013). Es importante tener en cuenta que la estructura de la cabeza y el flagelo de mamíferos son particulares (Roldán *et al.*, 1992; Inaba, 2011) por lo que la presión selectiva puede operar de forma diferente en mamíferos a como lo hace en aves.

El objetivo del trabajo desarrollado en este capítulo es examinar, teniendo en cuenta las relaciones filogenéticas, si la competición espermática reduce la variación en las dimensiones de los espermatozoides a nivel intra-individual en roedores. Para este trabajo se ha empleado un grupo de especies de roedores muroideos que responden al incremento en los niveles de competición espermática aumentando las dimensiones del espermatozoide (Tourmente *et al.*, 2011a; Gómez-Montoto *et al.*, 2011b).

## **Materiales y métodos**

### **Preparación de las muestras y medidas de las dimensiones**

Se midieron las dimensiones espermáticas en machos adultos de 26 especies de roedores: *Arvicola terrestris*, *Arvicola sapidus*, *Chionomys nivalis*, *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus cabreae*, *Microtus duodecimcostatus*, *Microtus lusitanicus*, *Apodemus sylvaticus*, *Cricetulus griseus*, *Lemniscomys barbarus*, *Mastomys natalensis*, *Mesocricetus auratus*, *Micromys minutus*, *Mus caroli*, *Mus macedonicus*, *Mus minutoides*, *Mus castaneus*, *Mus domesticus*, *Mus musculus*, *Mus spicilegus*, *Mus spretus*, *Mus pahari*, *Phodopus campbelli*, *Phodopus roborovskii* y *Phodopus sungorus*. El número de individuos por especie fue de 5.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y pesados. Se extrajeron y pesaron ambos testículos. Los epidídimos se colocaron en una placa de Petri con 1-3 ml de medio Tyrode modificado con Hepes e incubados durante 5 minutos para permitir a los espermatozoides nadar hacia el medio. Se realizaron frotis a partir de la suspensión espermática resultante, que se tiñeron con Giemsa. Las muestras fueron observadas en campo claro a un aumento de 1000X (ver Materiales y Métodos Generales para más detalles). De cada individuo se fotografiaron 30 células espermáticas de las que se tomaron las siguientes medidas: longitud de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ), ancho de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ), área de la cabeza ( $\mu\text{m}^2$ ), longitud de la pieza media ( $\mu\text{m}$ ), longitud de la pieza principal (incluye también la pieza terminal) ( $\mu\text{m}$ ), longitud del flagelo ( $\mu\text{m}$ ) y longitud total ( $\mu\text{m}$ ).

### Análisis estadístico

Para cada una de las medidas se calculó el coeficiente de variación (CV) mediante la siguiente fórmula  $CV = (\text{desviación estándar} \times 100) / \text{media}$ . El coeficiente de variación se calculó para cada individuo, utilizando posteriormente estos valores individuales para calcular el valor medio de CV en cada especie. Para establecer una relación entre el grado de variación de los componentes espermáticos se calcularon los siguientes ratios: CV longitud de la cabeza/CV ancho de la cabeza; CV de la pieza media/ CV de la pieza principal; CV longitud de la cabeza/CV longitud del flagelo y CV área de la cabeza/CV longitud del flagelo. Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Todas las variables fueron transformadas mediante logaritmos para lograr distribuciones normales.

El grado de variación en las dimensiones de la cabeza se comparó con el grado de variación de los componentes del flagelo mediante un test-*t* apareado. También se exploraron las diferencias en los patrones de variación de los componentes espermáticos separando las especies por linajes (Arvicolinae, Cricetinae y Murinae). Este análisis se llevó a cabo mediante un ANOVA que lleva implementado una herramienta de corrección filogenética (PGLS ANOVA). Para comprobar si los espermatozoides más largos experimentan un menor grado de variación en sus dimensiones, se realizaron regresiones lineales entre los valores medios de las dimensiones lineales y sus respectivos coeficientes de variación.

Para buscar asociaciones entre el nivel de competición espermática y el grado de variación en las dimensiones del espermatozoide se llevó a cabo una regresión múltiple con corrección filogenética (PGLS) (ver Material y Métodos Generales). Las relaciones filogenéticas de las especies pueden verse en la Figura 7 de la sección Material y

Métodos Generales. Los coeficientes de variación intra-individuales fueron tomados como la variable dependiente y los valores de la masa testicular corregida por la masa corporal (índice de competición espermática) constituyeron las variables predictoras.

Los análisis estadísticos fueron realizados con Caper v 0.5 (Orme *et al.*, 2012) (R Foundation for Statistical Computing) y con InfoStat 2010 (FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los valores  $P$  fueron considerados significativos cuando  $\alpha < 0,05$ .

## Resultados

Los valores de los coeficientes de variación para las dimensiones espermáticas se muestran en la Tabla 4. Los test- $t$  apareados muestran que las dimensiones de la cabeza (longitud, ancho y área) tienen un grado de variación mayor que los componentes del flagelo. Esta tendencia puede observarse en los 3 linajes: múridos ( $t = 10,71$ ;  $P < 0,001$ ), arvicólidos ( $t = 4,76$ ;  $P = 0,002$ ) y cricétidos ( $t = 4,71$ ;  $P = 0,009$ ). De los tres linajes analizados, los valores más altos de CV se encontraron en Arvicolinae y presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores de CV para la longitud y área de la cabeza en los otros dos linajes (Cricetinae y Murinae). No se encontraron diferencias significativas en el grado de variación de los componentes del flagelo en estos tres linajes, con la excepción del CV de la pieza media que es significativamente más alto en Arvicolinae que en Murinae (Tabla 5).

La regresión entre las dimensiones espermáticas y sus respectivos coeficientes de variación reveló asociaciones negativas y estadísticamente significativas para las variables longitud de la cabeza ( $R^2 = 0,17$ ;  $P = 0,037$ ) y longitud del flagelo ( $R^2 = 0,20$ ;  $P = 0,026$ ) (Figura 11). Esto es, a cabezas y flagelos más largos, menor grado de variación en sus dimensiones.

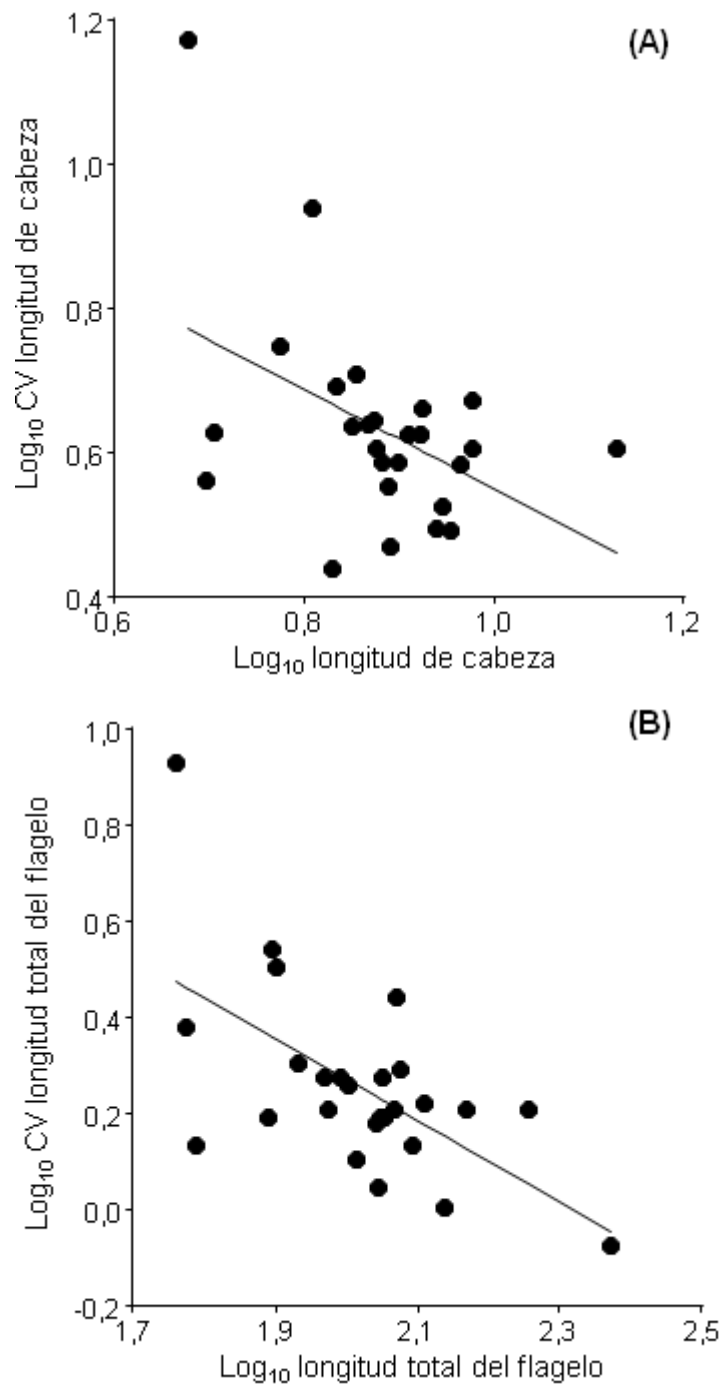
**Tabla 4.** Valores para el coeficiente de variación (CV) intra-individuo de las dimensiones espermáticas en 26 especies de roedores. Los valores del CV están expresados en %.

Especies	CV longitud cabeza	CV ancho cabeza	CV área cabeza	CV longitud pieza media	CV longitud pieza principal	CV longitud flagelo	CV longitud total
<i>Apodemus sylvaticus</i>	3,84	5,77	7,19	3,05	2,41	1,95	1,88
<i>Arvicola sapidus</i>	4,32	5,77	7,02	5,65	2,13	1,51	1,50
<i>Arvicola terrestris</i>	5,11	5,55	9,50	2,27	1,85	1,55	1,52
<i>Chionomys nivalis</i>	4,58	4,93	7,12	6,76	2,92	1,87	1,64
<i>Cricetulus griseus</i>	4,04	7,73	6,55	4,28	3,32	0,84	0,83
<i>Lemmyscomys barbarus</i>	4,20	5,21	4,40	3,06	1,78	1,26	1,18
<i>Mastomys natalensis</i>	4,69	7,07	8,03	3,26	2,32	1,61	1,59
<i>Mesocricetus auratus</i>	3,09	5,81	5,64	6,56	3,12	1,62	1,54
<i>Micromys minutus</i>	4,24	5,29	5,35	3,27	3,03	2,40	2,26
<i>Microtus arvalis</i>	4,92	7,10	7,11	9,48	3,62	2,01	1,96
<i>Microtus cabrerai</i>	8,65	9,84	13,48	8,33	4,81	3,19	2,97
<i>Microtus duodecimcostatus</i>	14,91	15,89	21,54	16,81	9,37	8,50	7,95
<i>Microtus lusitanicus</i>	5,56	8,35	9,40	7,89	5,39	3,48	3,39
<i>Myodes glareolus</i>	3,57	6,60	4,88	6,52	2,86	1,56	1,29
<i>Mus caroli</i>	4,04	4,90	5,95	4,32	1,97	1,60	1,21
<i>Mus musculus castaneus</i>	3,64	5,28	6,43	6,29	1,99	1,35	1,30
<i>Mus musculus domesticus</i>	3,86	4,42	4,89	3,55	1,91	1,61	1,55
<i>Mus musculus musculus</i>	3,85	4,96	6,20	4,85	3,44	2,76	2,52
<i>Mus macedonicus</i>	3,34	4,96	5,50	2,91	2,38	1,89	1,77
<i>Mus minutoides</i>	4,01	5,36	5,58	3,13	2,26	1,66	1,60
<i>Mus pahari</i>	4,21	4,93	5,30	2,31	2,25	1,87	1,80
<i>Mus spicilegus</i>	2,94	4,24	5,07	2,26	2,26	1,81	1,75
<i>Mus spretus</i>	2,73	3,28	4,13	3,35	1,82	1,54	1,48
<i>Phodopus campbelli</i>	4,37	6,06	6,37	2,38	1,55	1,11	1,06
<i>Phodopus roborovskii</i>	3,13	5,51	4,71	5,21	1,66	1,01	0,97
<i>Phodopus sungorus</i>	4,39	10,83	6,24	5,01	2,39	1,35	1,30

**Tabla 5.** Valores medios del coeficiente de variación ( $\pm$  E.S.M.) intra-individuo en tres linajes de roedores. Los superíndices al lado de los parámetros de Arvicolinae indican las diferencias ( $\dagger$  no significativo;  $*P < 0,05$ ; PGLS ANOVA) comparados con Cricetinae (primera posición) y Murinae (segunda posición).

Linaje	CV longitud cabeza	CV ancho cabeza	CV area cabeza	CV longitud pieza media	CV longitud pieza principal	CV longitud del flagelo	CV longitud total
Arvicolinae (N= 13)	6,45 ( $\pm 0,15$ )*,*	8,00 ( $\pm 0,24$ ) $\dagger$ ,*	10,01( $\pm 0,30$ )*,*	7,97( $\pm 0,30$ ) $\dagger$ ,*	4,12( $\pm 0,13$ ) $\dagger$ , $\dagger$	2,96( $\pm 0,11$ ) $\dagger$ , $\dagger$	2,78( $\pm 0,11$ ) $\dagger$ , $\dagger$
Cricetinae (N= 5)	3,81 ( $\pm 0,29$ )	7,19 ( $\pm 0,98$ )	5,90 ( $\pm 0,34$ )	4,69( $\pm 0,68$ )	2,41( $\pm 0,36$ )	1,19( $\pm 0,14$ )	1,14( $\pm 0,13$ )
Murinae (N= 8)	3,81 ( $\pm 1,32$ )	5,05 ( $\pm 1,26$ )	5,69 ( $\pm 1,88$ )	3,51( $\pm 1,47$ )	2,30( $\pm 0,86$ )	1,79( $\pm 0,84$ )	1,69( $\pm 0,78$ )
Todos	4,62 ( $\pm 0,46$ )	6,37 ( $\pm 0,50$ )	7,06 ( $\pm 0,69$ )	5,11( $\pm 0,61$ )	2,88( $\pm 0,31$ )	2,04( $\pm 0,28$ )	1,92( $\pm 0,27$ )





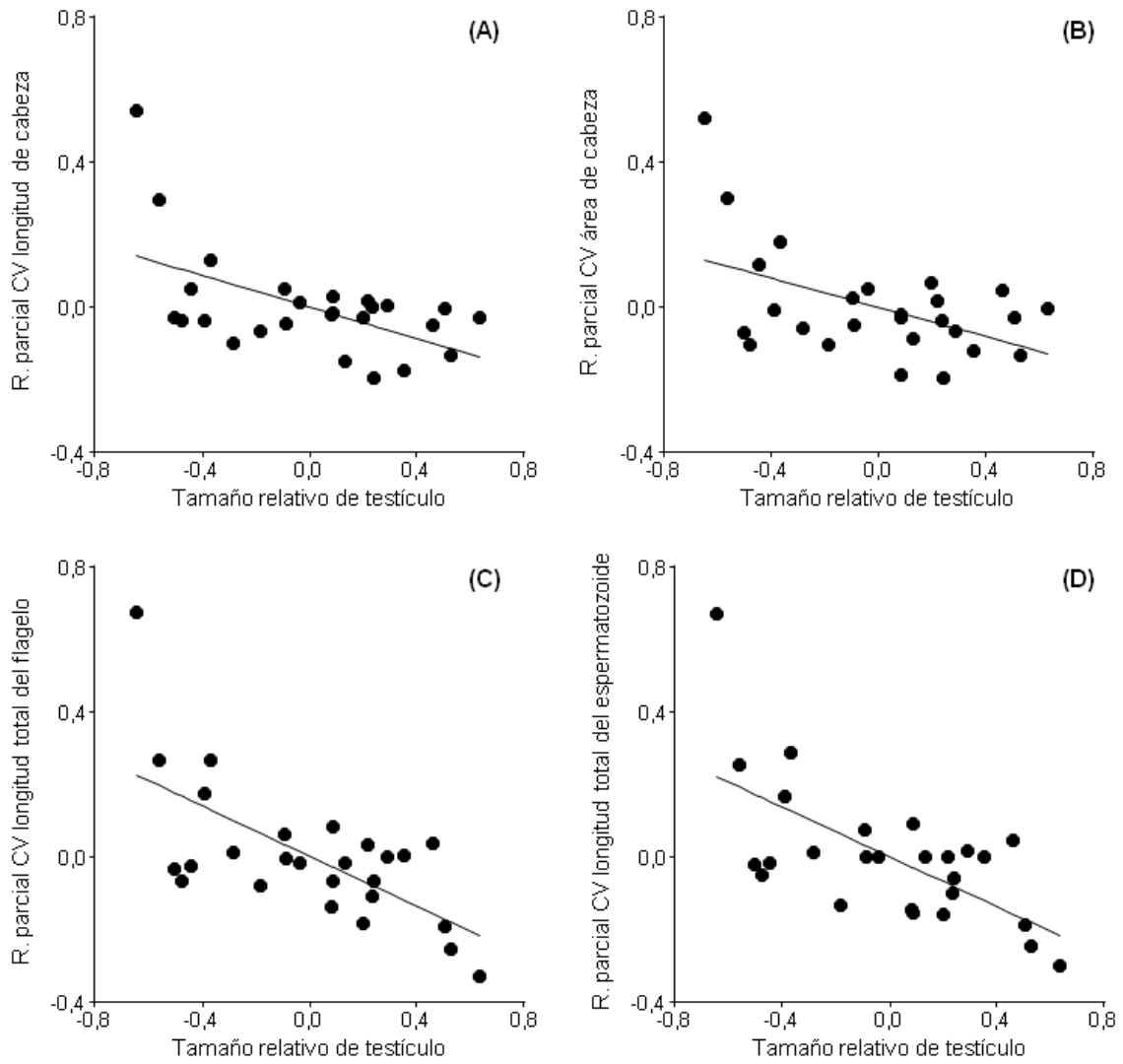
**Figura 11.** Relación entre las dimensiones lineales y el coeficiente de variación de los componentes del espermatozoide. (A) Longitud de la cabeza y CV de la longitud de la cabeza. (B) Longitud del flagelo y CV de la longitud del flagelo.

El análisis de regresión múltiple controlando los efectos filogenéticos reveló una relación negativa y estadísticamente significativa entre la masa testicular corregida por la masa corporal y el CV de las dimensiones longitud de la cabeza, área de la cabeza, longitud del flagelo y longitud total (Tabla 6, Figura 12). El CV del ancho de la cabeza mostró un patrón similar pero no dio un resultado significativo a nivel estadístico (Tabla 6).

La regresión entre la masa testicular corregida por la masa corporal y el ratio CV longitud de la cabeza/ ancho de la cabeza mostró que existe una relación negativa y estadísticamente significativa entre ambos parámetros (Tabla 7, Figura 13). No se encontraron relaciones entre el nivel de competencia espermática y el resto de ratios: CV longitud de la pieza media/CV longitud de la pieza principal, CV longitud de la cabeza/CV longitud del flagelo y CV área de la cabeza/CV longitud del flagelo (Tabla 7).

**Tabla 6.** Regresión múltiple con control filogenético entre los coeficientes de variación (CV) de las dimensiones espermáticas en relación a masa corporal y testicular. Todos los análisis han sido realizados con 23 grados de libertad. Los superíndices que acompañan el valor de  $\lambda$  indican el nivel de significación (<sup>†</sup>n.s.; \* $P < 0,05$ ) frente a los modelos de  $\lambda = 0$  (primera posición) y  $\lambda = 1$  (segunda posición). El tamaño del efecto  $r$  ha sido calculado a partir de los valores de  $F$ ; también se dan los valores de los intervalos de confianza al 95% (IC). Los intervalos que excluyen el 0 indican relaciones estadísticamente significativas. Los valores  $P$  e intervalos de confianza estadísticamente significativos se muestran en negrita. Abreviaturas: LC, longitud de la cabeza; AC ancho de la cabeza; A, área de la cabeza; LPM, longitud de la pieza media; LPP, longitud de la pieza principal; LF, longitud del flagelo; LT, longitud total.

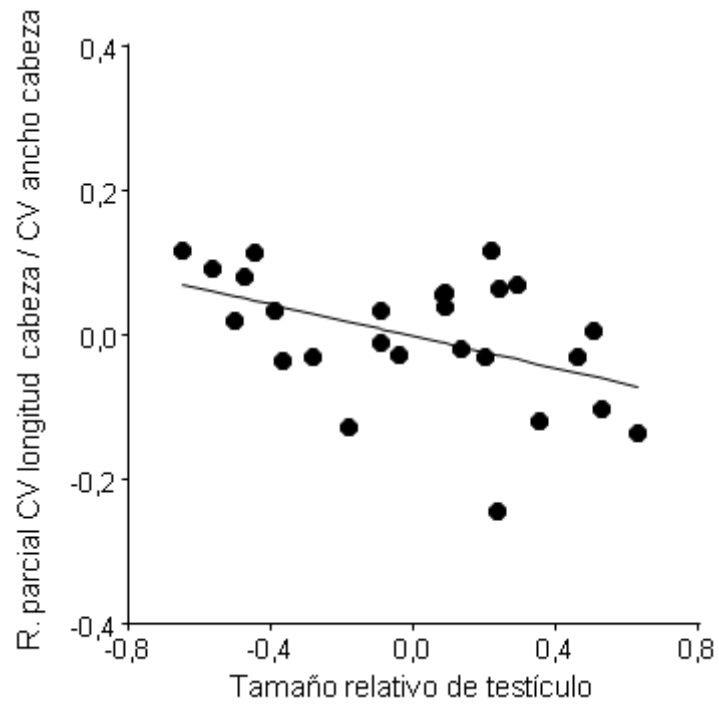
Variable dependiente	Predictor	$R^2$ ajustado	Pendiente	$F$	$P$	Lambda ( $\lambda$ )	Tamaño del efecto ( $r$ )	Intervalo de confianza (IC)
CV LC	Masa corporal	0,34	0,21	0,007	0,91	0,48 <sup>*,*</sup>	0,02	(-0,38 - 0,42)
	Masa testicular		-0,24	14,68	<b>&lt;0,001</b>		0,61	<b>(0,32 - 1,14)</b>
CV AC	Masa corporal	0,05	0,13	0,02	0,87	0,79 <sup>*,†</sup>	0,02	(-0,37 - 0,44)
	Masa testicular		-0,15	3,70	0,06		0,36	(-0,02 - 0,79)
CV A	Masa corporal	0,21	0,23	0,72	0,40	0,39 <sup>†,*</sup>	0,16	(-0,23 - 0,57)
	Masa testicular		-0,20	7,78	<b>0,01</b>		0,50	<b>(0,14 - 0,95)</b>
CV LPM	Masa corporal	-0,06	0,06	0,003	0,95	0,68 <sup>*,†</sup>	0,01	(-0,39 - 0,42)
	Masa testicular		-0,06	0,26	0,60		0,11	(-0,30 - 0,52)
CV LPP	Masa corporal	0,04	0,04	0,96	0,32	0,96 <sup>*,†</sup>	0,20	(-0,20 - 0,61)
	Masa testicular		-0,13	2,45	0,12		0,31	(-0,08 - 0,73)
CV LF	Masa corporal	0,38	0,17	2,42	0,12	0,18 <sup>†,*</sup>	0,31	(-0,09 - 0,73)
	Masa testicular		-0,32	14,82	<b>&lt;0,001</b>		0,62	<b>(0,32 - 1,14)</b>
CV LT	Masa corporal	0,36	0,19	1,85	0,18	0,16 <sup>†,*</sup>	0,26	(-0,13 - 0,68)
	Masa testicular		-0,32	14,54	<b>&lt;0,001</b>		0,62	<b>(0,32 - 1,14)</b>



**Figura 12.** Relación entre el residuo parcial del índice de competición espermática (masa relativa de testículos) y los residuos parciales de los coeficientes de variación (CV) de los componentes espermáticos. (A) CV longitud de la cabeza, (B) CV área de la cabeza, (C) CV longitud del flagelo, y (D) CV longitud total.

**Tabla 7.** Regresión múltiple con control filogenético entre los ratios de los coeficientes de variación (CV) de las dimensiones espermáticas en relación a masa corporal y testicular. Todos los análisis han sido realizados con 23 grados de libertad. Los superíndices que acompañan el valor de  $\lambda$  indican el nivel de significación (<sup>†</sup>n.s.; \* $P < 0,05$ ) frente a los modelos de  $\lambda = 0$  (primera posición) y  $\lambda = 1$  (segunda posición). El tamaño del efecto  $r$  ha sido calculado a partir de los valores de  $F$ ; también se dan los valores de los intervalos de confianza al 95% (IC). Los intervalos que excluyen el 0 indican relaciones estadísticamente significativas. Los valores  $P$  e intervalos de confianza estadísticamente significativos se muestran en negrita. Abreviaturas: LC, longitud de la cabeza; AC ancho de la cabeza; A, área de la cabeza; LPM, longitud de la pieza media; LPP, longitud de la pieza principal; LF, longitud del flagelo; LT, longitud total.

Variable dependiente	Predictor	$R^2$ ajustado	Pendiente	$F$	$P$	Lambda ( $\lambda$ )	Tamaño del efecto ( $r$ )	Intervalo de confianza (IC)
CV LC/CV AC	Masa corporal	0,32	0,12	0,75	0,39	0,00 <sup>†,*</sup>	0,18	(-0,38 – 0,43)
	Masa testicular		-0,16	13,30	<b>0,001</b>		0,60	<b>(0,28 – 1,11)</b>
CV LC/CV LF	Masa corporal	0,18	0,02	4,76	<b>0,04</b>	0,00 <sup>†,*</sup>	0,40	<b>(0,02 – 0,85)</b>
	Masa testicular		0,11	2,67	0,11		0,32	(-0,06 – 0,72)
CV A/CV LF	Masa corporal	0,33	0,09	10,86	<b>0,003</b>	0,00 <sup>†,*</sup>	0,56	<b>(0,21 – 1,04)</b>
	Masa testicular		0,12	3,50	0,06		0,35	(-0,03 – 0,79)
CV LPM/CV LPP	Masa corporal	0,07	0,12	3,74	0,06	0,00 <sup>†,*</sup>	0,36	(-0,02 – 0,80)
	Masa testicular		0,03	0,12	0,73		0,06	(-0,33 – 0,47)



**Figura 13.** Relación entre el residuo parcial de el índice de competición espermática (masa relativa de testículo) y el residuo parcial del ratio CV longitud de la cabeza/ CV ancho de la cabeza.

## Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que a medida que aumenta la presión de la competición espermática los individuos tienden a uniformar el tamaño de los espermatozoides que producen. Esta reducción en el grado de variación de las dimensiones se observa tanto para las dimensiones de la cabeza como para los componentes del flagelo, aunque en términos generales las variaciones en la cabeza son mayores que las del flagelo. También se ha observado que el incremento en el nivel de competición espermática está asociado a una reducción en el grado de variación del ratio CV longitud de la cabeza/CV ancho de la cabeza.

Los resultados muestran que la reducción en el grado de variación de las dimensiones espermáticas está bajo el control de la selección sexual. El hecho de que las especies que producen espermatozoides más largos tiendan a reducir el grado de variación en sus dimensiones, puede deberse a que la competición espermática ejerce un control estricto sobre el proceso de producción de los espermatozoides. Las modificaciones en el tamaño de la cabeza pueden alcanzarse por cambios evolutivos en los genes que controlan la condensación de la cromatina y el tamaño del núcleo. Parece, que, a medida que aumenta la presión de la competición espermática, los espermatozoides son más eficientes condensando su ADN, lo cual resultaría en cabezas más elongadas con un núcleo más compacto (Martin-Coello *et al.*, 2009). Una mayor similitud en las secuencias de las protaminas 1 y 2 (proteínas nucleares que condensan el ADN) se asocia a cabezas más pequeñas en relación a la longitud total del flagelo y más elongadas (Lüke *et al.*, 2014 a). Estos resultados sugieren que, una vez alcanzado el diseño óptimo en una especie para un determinado contexto de competición espermática, las proteínas implicadas en modelar la forma de la cabeza tenderían a

reducir el grado de variación en sus secuencias. Por otro lado, el incremento en la longitud del flagelo podría resultar en una mayor fuerza motriz que incrementaría la velocidad de natación (Gomendio y Roldan, 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009) aumentando el éxito reproductivo del individuo (Birkhead *et al.*, 1999).

Los análisis no revelaron ninguna relación entre el nivel de competición espermática y los ratios CV de la pieza media/CV de la pieza principal, o CV longitud de la cabeza/CV longitud del flagelo. Por el contrario, se observó que a medida que aumenta la competición espermática el grado de variación de la longitud de la cabeza con relación a su ancho (CV longitud de la cabeza/CV ancho de la cabeza) disminuye de forma significativa. Los resultados muestran, por lo tanto, que los distintos componentes del espermatozoide responden de forma diferente a la competición espermática. En conjunto, la cabeza parece ser el componente más variable del espermatozoide y el más sensible a la selección sexual postcópula. Esto puede ser debido a que es una estructura muy relevante para la velocidad de natación (Malo *et al.*, 2006).

Los análisis comparativos realizados en aves han demostrado que el incremento en la longitud del espermatozoide también está acompañado de una reducción en su grado de variación, lo cual puede estar propiciado por la acción de la selección sexual postcópula (Immler *et al.*, 2008; Kleven *et al.*, 2008). En aves de la misma especie se ha observado una tendencia similar, y el incremento en longitud también conlleva una reducción en el grado de variación en presencia de competición espermática (Laskemoen *et al.*, 2012). Es posible que la respuesta de los componentes del espermatozoide a la competición espermática no se produzca de forma simultánea sino secuencial. Esta secuencialidad podría aplicarse de forma extensiva al grado de variación en las dimensiones. Un estudio realizado en aves sobre trayectorias evolutivas



de las características del espermatozoide reveló que la pieza media y el flagelo responden de una forma similar a la selección, mientras que la cabeza sigue un patrón independiente (Immler *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con las observaciones anteriores y aportan evidencia de que, en roedores, las dimensiones de la cabeza tienen un mayor grado de variación que los componentes del flagelo, lo que sugiere diferentes trayectorias evolutivas al igual que ocurre en aves. En un marco evolutivo la competición espermática parece tener un papel estabilizador, permitiendo a las células incrementar sus dimensiones hasta llegar a alcanzar un óptimo. Este óptimo puede estar determinado por el nivel de competición espermática y limitado por la tasa metabólica del individuo (Gomendio *et al.*, 2011; Tourmente *et al.*, 2011b).

En situaciones de estrés genético puede romperse el control sobre la espermatogénesis y darse la tendencia opuesta. Este fenómeno se observa en poblaciones muy endogámicas donde los machos presentan una elevada tasa de anomalías espermáticas y, en consecuencia, un aumento en la variación de las dimensiones (Roldan y Gomendio, 2009). Este caso también ocurre cuando disminuyen los niveles de competición espermática, la presión selectiva se relaja y los espermatozoides se hacen más pleiomórficos. La plasticidad fenotípica del espermatozoide en condiciones de baja competición espermática ha sido documentada en distintos géneros de roedores (Breed *et al.*, 2007; Van der Horst *et al.*, 2012; Van der Horst y Marea, 2013). Entre las especies incluidas en este trabajo puede observarse pleiomorfismo espermático en *Microtus duodecimcostatus*; esta especie tiene niveles bajos de competición espermática y su CV es alto para todas sus dimensiones. Estas observaciones apuntan a que la competición espermática ejerce una presión estabilizadora sobre el grado de variación de la forma y las dimensiones.

Como conclusión a este capítulo, se puede afirmar que, a medida que aumenta la competición espermática, los componentes del espermatozoide responden incrementando su tamaño y reduciendo el grado de variación de sus dimensiones a nivel intra-individual. En roedores, la respuesta a la selección sexual postcópula es una modificación en las dimensiones del flagelo, produciendo espermatozoides que se ajustan al estándar de diseño óptimo lo que puede resultar en una mayor fuerza motriz que aumenta la velocidad de natación. Esta modificación puede ir acompañada de un incremento en las dimensiones de la cabeza y una reducción en el grado de variación de sus dimensiones, de este modo todos los espermatozoides comparten un diseño similar y nadan de forma más eficiente. Los resultados de este trabajo ayudan a mejorar el conocimiento acerca de cómo la competición espermática actúa sobre las dimensiones de los distintos componentes del espermatozoide y sobre el control de la espermatogénesis.

## CAPÍTULO 4

# **EFFECTO DE LA SELECCIÓN SEXUAL POSTCÓPULA SOBRE EL GRADO DE VARIACIÓN DE LA VELOCIDAD DE NATACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES**

### **Introducción**

Las diferencias en el diseño espermático son notables entre los diferentes taxones (Roldan *et al.*, 1992; Breed, 2005; Pitnick *et al.*, 2009). Estas diferencias pueden ser la respuesta a la presión selectiva que ejerce la selección sexual postcópula en forma de competición espermática (Gomendio y Roldan, 1991; Snook, 2005). Uno de los efectos mejor documentados de la competición espermática es el incremento del tamaño testicular en relación al tamaño corporal (Harcourt *et al.*, 1981; Simmons, 2001; Birkhead *et al.*, 2009), el cuál suele ir acompañado de una mejora significativa en la calidad del esperma (Gómez-Montoto *et al.*, 2011a; revisado por: Simmons y Fitzpatrick, 2012). Se ha comprobado que cuando se elevan los niveles de competición espermática los individuos producen espermatozoides que nadan más rápido (Lüpold *et al.*, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Tourmente *et al.*, 2011a). La velocidad de natación de un espermatozoide puede estar determinada por su forma y dimensiones (Gomendio y Roldan, 2008; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Tourmente *et al.*, 2011a; revisado por Simmons y Fitzpatrick, 2012).-Los individuos procedentes de poblaciones silvestres muestran una variación considerable en las dimensiones y velocidad de sus espermatozoides (Malo *et al.*, 2006; Firman *et al.*, 2010; Fitzpatrick *et al.*, 2010; Ramón *et al.*, 2013; Simpson *et al.*, 2013). Estas diferencias se observan tanto a nivel intra como inter-individual. Según proponen los modelos teóricos, a medida que aumenta el nivel de competición espermática los individuos tienden a producir espermatozoides que se ajustan al estándar de diseño óptimo (Parker, 1993). Esta optimización puede traducirse en

espermatozoides que son más uniformes con respecto a su velocidad de natación y a sus dimensiones.

Estudios comparativos en aves han revelado que el nivel de competición espermática está relacionado negativamente las variaciones inter e intra-individuales en las dimensiones espermáticas (Calhim *et al.*, 2007; Immler *et al.*, 2008; Kleven *et al.*, 2008; Lifjeld *et al.*, 2010). Esta relación ha sido poco estudiada en mamíferos, con alguna excepción (Sanderá *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta el presente no hay estudios que hayan examinado la relación entre el nivel de competición espermática y la variación intra-individual en la velocidad de natación del espermatozoide.

El objetivo de este capítulo es examinar la hipótesis de que los elevados niveles de competición espermática promueven una reducción en los niveles de variación de los parámetros que definen la velocidad de natación de los espermatozoides de un mismo individuo. Se realizó un estudio centrado en un grupo de especies de roedores filogenéticamente cercanas, las cuales tienen diferentes niveles de competición espermática. Estudios previos sobre estas especies mostraron una relación positiva entre el nivel de competición espermática y los parámetros que definen la velocidad de natación de los espermatozoides (Gómez Montoto *et al.*, 2011b).

## Material y métodos

### Obtención y análisis de espermatozoides

En este trabajo se evaluaron los parámetros de velocidad descritos por Mortimer (1994).

Estos parámetros fueron cuantificados en machos adultos de 19 especies de roedores tomando 5 individuos de las siguientes especies: *Apodemus sylvaticus*, *Chionomys nivalis*, *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Lemniscomys barbarus*, *Mesocricetus auratus*, *Micromys minutus*, *Mus caroli*, *Mus macedonicus*, *Mus minutoides*, *Mus castaneus*, *Mus domesticus*, *Mus musculus*, *Mus spicilegus*, *Mus spretus*, *Mus pahari*, *Phodopus campbelli*, *Phodopus roborovskii* y *Phodopus sungorus*

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y pesados. Inmediatamente después ambos testículos fueron extraídos y pesados. También se extrajeron los epidídimos y se procesaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (ver Material y Métodos Generales). Mediante un sistema de evaluación de la cinética espermática asistido por ordenador (Sperm Class Analyzer v.4.0, Microptic, Barcelona, España) se cuantificaron los siguientes parámetros: velocidad curvilínea, VCL ( $\mu\text{m/s}$ ); velocidad rectilínea, VSL ( $\mu\text{m/s}$ ); velocidad promedio de trayectoria, VAP ( $\mu\text{m/s}$ ); linealidad, LIN (%); rectitud, STR (%); tambaleo, WOB (%); amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, ALH ( $\mu\text{m}$ ) y frecuencia de batido, BCF (Hz). Para cada uno de los individuos se analizaron un mínimo de 200 trayectorias.

### Análisis estadístico

Para hacer una comparación entre especies de la variación en la velocidad de natación del espermatozoide se calculó el coeficiente de variación intra-individuo (CV) para cada uno de los 8 parámetros de velocidad con la siguiente fórmula  $CV = (\text{desviación estándar} \times 100) / \text{media}$ . Los datos fueron transformados mediante la fórmula  $\arcsen(\sqrt{CV/100})$  para lograr una distribución normal. La normalidad se evaluó por el test de Kolmogorov–Smirnov. Se calculó la media del CV para cada individuo y con esos valores se calculó la media del CV para la especie.

Se realizó una regresión simple, entre los valores medios de VCL, VSL y VAP para cada especie y sus respectivos valores de CV, para examinar la hipótesis de que las especies cuyos espermatozoides son más rápidos tienen unos valores más bajos en los coeficientes de variación de los parámetros de velocidad.

La asociación entre el nivel de competición espermática y el grado de variación en los parámetros de velocidad fue analizada utilizando una regresión múltiple en la que se implementó una herramienta de corrección filogenética (PGLS). En la regresión se utilizó el método de mínimos cuadrados generalizados y la filogenia se reconstruyó a partir de datos procedentes de fuentes publicadas (Figura 7 de Material y Métodos Generales).

Los coeficientes de variación de los parámetros de velocidad fueron utilizados como variable dependiente, mientras que la masa testicular y la masa corporal fueron las variables predictoras, tomadas como indicador de nivel de competición espermática (ver Material y Métodos Generales).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con Caper v 0.5 (Orme *et al.*, 2012) (R Foundation for Statistical Computing) y con InfoStat 2010 (FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## Resultados

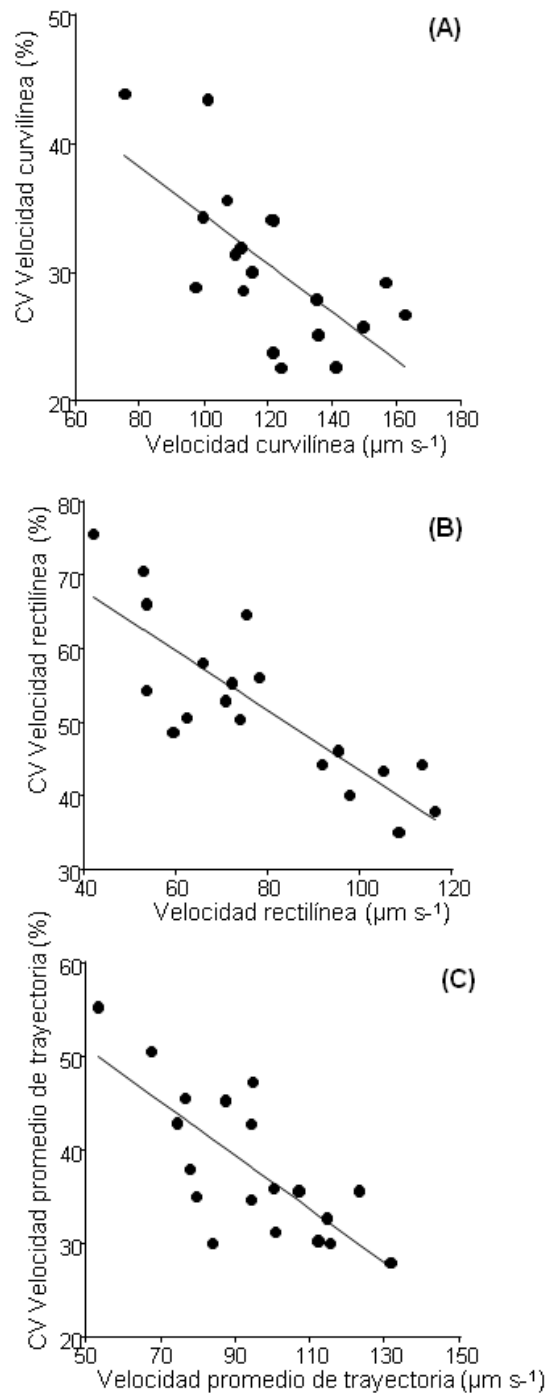
Los valores para masa corporal, masa testicular y los coeficientes de variación para cada uno de los parámetros de velocidad se presentan en la Tabla 8. La regresión simple entre los valores medios de velocidad y sus coeficientes de variación reveló que existe una relación negativa entre los parámetros de velocidad y su grado de variación para los siguientes parámetros: VCL ( $R^2 = 0,45$ ;  $P = 0,001$ ), VSL ( $R^2 = 0,69$ ;  $P < 0,0001$ ) y VAP ( $R^2 = 0,56$ ;  $P = 0,0002$ ) (Figura 14).

La regresión múltiple controlada filogenéticamente demostró que existe una relación negativa y estadísticamente significativa entre el nivel de competición espermática y el grado de variación en los siguientes parámetros VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB y BCF. No se obtuvieron resultados significativos para el parámetro ALH. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 9 y en la Figura 15. Estos resultados indican que a medida que aumenta el nivel de competición espermática se reduce la variación en los parámetros de velocidad en los espermatozoides de un mismo individuo.

**Tabla 8.** Coeficientes de variación intra-individuo para los parámetros de velocidad en 19 especies de roedores. Los valores de los coeficientes de variación están expresados en porcentajes. Abreviaturas: VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad rectilínea; VAP, velocidad promedio de la trayectoria; LIN, linealidad; STR, rectitud; WOB, tambaleo; BCF, frecuencia de batido; ALH, amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza.

<b>Especies</b>	<b>VCL</b>	<b>VSL</b>	<b>VAP</b>	<b>LIN</b>	<b>STR</b>	<b>WOB</b>	<b>ALH</b>	<b>BCF</b>
<i>Apodemus sylvaticus</i>	22,50	35,18	30,11	24,35	18,21	15,81	29,98	39,02
<i>Chionomys nivalis</i>	27,92	44,25	35,61	33,88	26,49	18,77	26,51	44,01
<i>Lemniscomys barbarus</i>	25,16	43,48	32,67	33,08	25,01	17,79	25,67	40,77
<i>Mesocricetus auratus</i>	33,98	54,27	35,05	47,68	37,43	21,61	34,76	51,03
<i>Micromys minutus</i>	22,59	38,03	28,05	30,14	24,89	14,15	27,76	40,48
<i>Microtus arvalis</i>	28,53	44,30	35,88	31,36	24,37	17,75	25,78	40,04
<i>Mus caroli</i>	34,04	64,66	47,25	48,61	37,05	23,77	27,11	52,44
<i>Mus macedonicus</i>	31,42	66,03	42,84	54,24	39,75	24,82	30,63	48,39
<i>Mus minutoides</i>	23,75	39,96	30,33	29,73	23,17	14,45	29,26	38,29
<i>Mus musculus</i>	43,81	75,59	55,25	51,45	38,13	28,19	33,51	56,07
<i>Mus castaneus</i>	34,25	58,05	45,52	45,27	34,53	26,50	28,58	48,95
<i>Mus domesticus</i>	28,81	50,63	37,88	39,93	31,57	20,97	27,61	45,20
<i>Mus pahari</i>	43,45	70,56	50,44	52,59	40,32	27,59	34,05	57,90
<i>Mus spicilegus</i>	35,63	55,33	45,21	40,43	31,01	23,28	29,96	49,54
<i>Mus spretus</i>	31,90	56,08	42,78	42,32	32,49	22,31	30,02	50,09
<i>Myodes glareolus</i>	29,98	46,10	35,59	29,44	23,81	13,59	32,87	38,69
<i>Phodopus campbelli</i>	26,64	50,51	31,24	44,36	36,47	18,23	24,66	44,65
<i>Phodopus roborovskii</i>	25,73	48,64	30,04	42,93	35,35	17,68	24,01	43,48
<i>Phodopus sungorus</i>	29,17	52,94	34,76	47,08	37,46	21,11	28,62	48,43

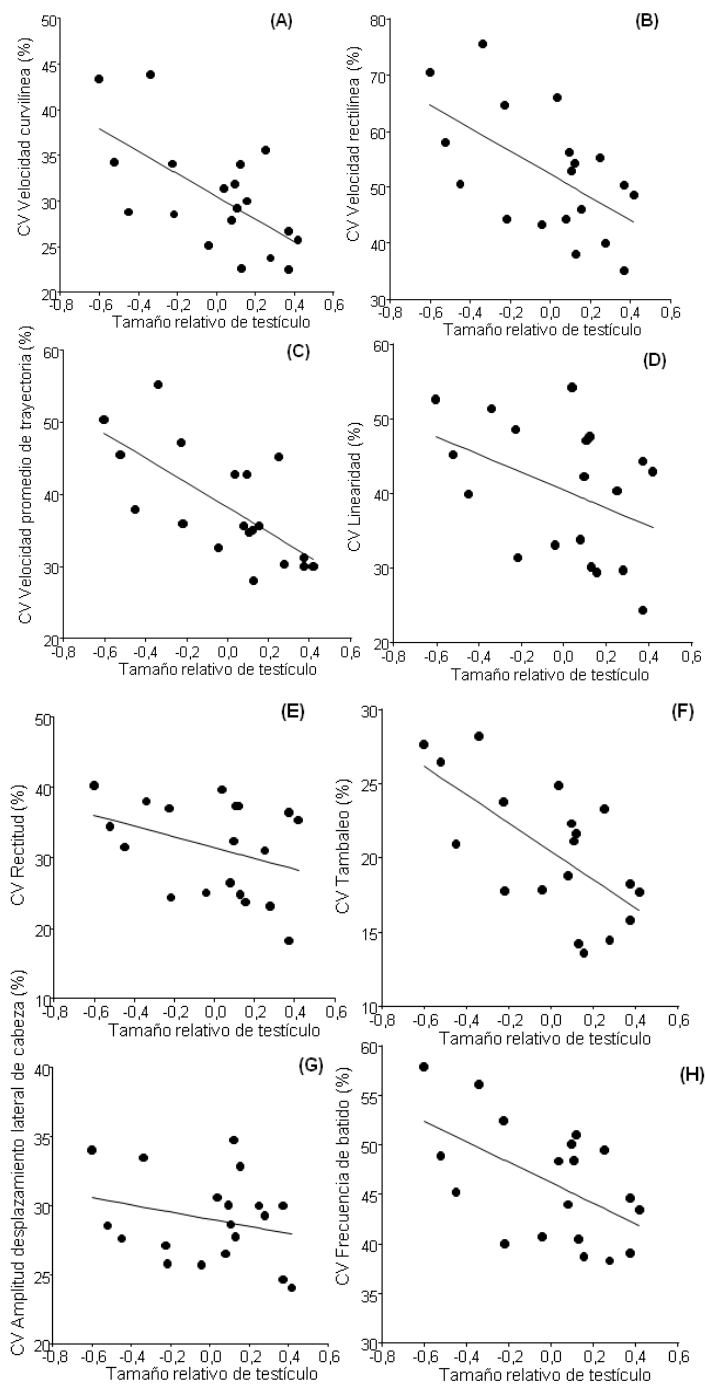




**Figura 14.** Relación entre los valores medios de los parámetros de velocidad y su coeficiente de variación (CV). (A) Velocidad curvilínea (VCL). (B) Velocidad rectilínea (VSL). (C) Velocidad promedio de la trayectoria (VAP).

**Tabla 9.** Regresión múltiple controlada filogenéticamente entre los coeficientes de variación (CV) de los parámetros de velocidad espermática en relación a la masa corporal y masa testicular. Todos los análisis han sido realizados con 15 grados de libertad. Los superíndices que acompañan el valor de  $\lambda$  indican el nivel de significación ( $\dagger$ n.s.;  $*P < 0,05$ ) frente a los modelos de  $\lambda = 0$  (primera posición) y  $\lambda = 1$  (segunda posición). El tamaño del efecto  $r$  ha sido calculado a partir de los valores de  $F$ ; también se dan los valores de los intervalos de confianza al 95% (IC). Los intervalos que excluyen el 0 indican relaciones estadísticamente significativas. Los valores  $P$  e intervalos de confianza estadísticamente significativos se muestran en negrita. Abreviaturas: VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad rectilínea; VAP, velocidad promedio de la trayectoria; LIN, linearidad; STR, rectitud; WOB, tambaleo; ALH, amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza; BCF, frecuencia de batido.

Variable dependiente	Predictor	$R^2$ ajustado	Pendiente	$F$	$P$	Lambda ( $\lambda$ )	Tamaño efecto (r)	Intervalo confianza (IC)
CV VCL	Masa corporal	0,44	0,19	8,70	0,009	0,80 $\dagger,\dagger$	0,60	(0,21 - 1,19)
	Masa testicular		-0,10	6,92	<b>0,02</b>		0,55	<b>(0,14 - 1,12)</b>
CV VSL	Masa corporal	0,43	0,28	6,12	0,02	1,00 $^*,\dagger$	0,54	(0,11 - 1,08)
	Masa testicular		-0,18	8,59	<b>0,01</b>		0,60	<b>(0,201 - 1,19)</b>
CV VAP	Masa corporal	0,43	0,17	6,88	0,02	0,88 $^*,\dagger$	0,55	(0,13 - 1,11)
	Masa testicular		-0,11	8,53	<b>0,01</b>		0,60	<b>(0,21 - 1,19)</b>
CV LIN	Masa corporal	0,31	0,23	4,86	0,03	0,97 $^*,\dagger$	0,49	(0,04 - 1,02)
	Masa testicular		-0,12	4,73	<b>0,05</b>		0,49	<b>(0,03 - 1,01)</b>
CV STR	Masa corporal	0,26	0,16	3,41	0,07	1,00 $^*,\dagger$	0,42	(-0,02 - 0,95)
	Masa testicular		-0,11	4,92	<b>0,03</b>		0,48	<b>(0,04 - 1,02)</b>
CV WOB	Masa corporal	0,55	0,15	16,68	0,0009	0,93 $^*,\dagger$	0,72	(0,43 - 1,41)
	Masa testicular		-0,07	7,28	<b>0,02</b>		0,56	<b>(0,16 - 1,14)</b>
CV ALH	Masa corporal	-0,06	0,03	0,94	0,33	0,00 $\dagger,\dagger$	0,23	(-0,24 - 0,74)
	Masa testicular		-0,01	0,09	0,75		0,08	(-0,40 - 0,57)
CV BCF	Masa corporal	0,40	0,17	8,70	0,009	1,00 $^*,\dagger$	0,60	(0,20 - 1,18)
	Masa testicular		-0,07	4,63	<b>0,05</b>		0,48	<b>(0,03 - 1,02)</b>



**Figura 15.** Relación los coeficientes de variación (CV) de los parámetros de velocidad y el valor residual de la masa testicular. (A) CV de la velocidad curvilínea (VCL). (B) CV de la velocidad rectilínea (VSL). (C) CV de la velocidad promedio de la trayectoria (VAP. (D) CV de la linealidad (LIN). (E) CV de la rectitud (STR). (F) CV del tambaleo (WOB). (G) CV de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH). (H) CV de la frecuencia de batido (BCF).

## Discusión

Los resultados de este trabajo revelan que existe una asociación negativa entre el grado de variación de los parámetros de velocidad y los niveles de competición espermática. De ello podemos inferir que, según aumenta el nivel de competición espermática, los individuos tienden a producir espermatozoides que son muy similares en lo que a velocidad se refiere. Por otro lado, los resultados muestran que en las especies que producen espermatozoides más rápidos, éstos tienen un grado de variación menor a nivel intra-individual comparado con las especies que producen espermatozoides más lentos. Estos hallazgos sugieren que la selección sexual es la responsable de los cambios evolutivos que permiten esta reducción en el grado de variación de los parámetros de velocidad del espermatozoide a nivel intra-individual.

La heterogeneidad es una característica frecuente dentro de los eyaculados de mamíferos. Por ejemplo, se han identificado distintas subpoblaciones espermáticas dentro de un mismo eyaculado basándose en descriptores de la velocidad de natación (Ramón *et al.*, 2013). Se ha propuesto que estas subpoblaciones pueden ser el resultado de diferencias en el proceso de ensamblaje de los espermatozoides que tienen lugar durante la espermatogénesis, o bien por diferencias en los grados de maduración que se dan en los epidídimos. A la luz de los resultados obtenidos en este estudio, es posible que la competición espermática actúe como una fuerza estabilizadora de estos procesos que tienen lugar en testículos y epidídimos. De este modo, en el momento que un carácter ventajoso, como puede ser el producir espermatozoides más rápidos, aparece en la población, la presión selectiva reforzaría el control sobre la espermatogénesis disminuyendo el grado de variación.

Los espermatozoides adquieren motilidad durante su tránsito por los epidídimos; sin embargo, no se activan ni muestran motilidad hasta que no son liberados del tracto reproductor masculino. Los espermatozoides de mamíferos tienen que superar varias barreras (p. ej. el cervix o la unión utero-tubárica) (Suarez *et al.*, 2008) hasta llegar al óvulo. Se ha propuesto la hipótesis de que alcanzar velocidades de natación altas ayuda a los espermatozoides a superar estas barreras y, además, se ha postulado que la velocidad de natación es uno de los principales determinantes del éxito reproductor (Gomendio *et al.*, 2007). Existe una asociación positiva entre el nivel de competición espermática y la velocidad de natación, como se ha observado en diferentes taxones tales como mamíferos (Gomez-Montoto *et al.*, 2011b), peces (Fitzpatrick *et al.*, 2009) y aves (Kleven *et al.*, 2009).

La motilidad espermática y la velocidad de natación son el resultado de la interacción de varias fuerzas. Simplificando al máximo las leyes físicas que operan en el espermatozoide, podemos decir que la fuerza motriz que genera el batido del flagelo impulsa a la célula hacia delante. Por otro lado, la fuerza de rozamiento que actúa sobre la cabeza del espermatozoide se opone al avance. Siguiendo este razonamiento, se ha propuesto que el ratio entre el área de la cabeza y la longitud del flagelo podría ser un predictor fiable de la velocidad de natación (Humphries *et al.*, 2008), aunque no se han encontrado evidencias empíricas que apoyen esta idea. Un estudio comparativo realizado en aves paseriformes reveló que la longitud del flagelo corregida por el tamaño de la cabeza no era un mejor predictor de la velocidad de natación que cualquier otro parámetro, como por ejemplo, la longitud del flagelo (Lüpold *et al.*, 2009). Otro trabajo comparativo realizado en mamíferos encontró una relación inversa entre el ratio longitud de la cabeza/longitud del flagelo y la velocidad de natación (Tourmente *et al.*, 2011a), en apoyo de la idea de Humphries *et al.*. Por otra parte, los espermatozoides con

cabezas más elongadas (según el ratio longitud de la cabeza/ancho de la cabeza) podrían ser capaces de nadar más deprisa que los que presentaban cabezas más redondeadas. Esta hipótesis ha recibido apoyo a través de estudios a nivel-intraespecífico en mamíferos (Malo *et al.*, 2006; Gillies *et al.*, 2009).

A pesar de las ventajas de un diseño eficiente en términos hidrodinámicos, la producción de energía es esencial para el movimiento espermático. La energía en forma de ATP se genera en el flagelo, bien por fosforilación oxidativa en las mitocondrias de la pieza media o por glicolisis en la pieza principal (Storey, 2008). La hidrólisis del ATP por las dineínas del axonema produce la energía necesaria para el movimiento de la célula, por lo que los niveles de ATP intracelular están directamente relacionados con la velocidad de natación (Jeulin y Soufir, 1992). Un estudio comparativo reciente realizado en roedores (Tourmente *et al.*, 2013) mostró que las especies con altos niveles de competición espermática producen una mayor cantidad de ATP. Además, este contenido en ATP una vez corregido por el tamaño del flagelo está positivamente correlacionado con la velocidad de natación.

El bajo grado de variación observado en las especies con espermatozoides rápidos puede ser el resultado de factores que operan a diferentes niveles. Las dimensiones del espermatozoide influyen en la velocidad de natación, por lo que unos tamaños celulares más uniformes podrían resultar a su vez en velocidades más uniformes. Además, las velocidades de natación más uniformes pueden estar asociadas a una mayor uniformidad en la producción de energía y en su utilización.

El trabajo presentado en este capítulo aporta la primera evidencia sobre una disminución de la variación de los parámetros de velocidad a nivel intra-individual a niveles elevados de competición espermática. La reducción en la variabilidad de la velocidad de natación puede ser el resultado de un ajuste fino en el proceso de

producción y maduración del espermatozoide enfocado en un estricto control sobre la producción de gametos masculinos. Todos estos cambios pueden llevar a una optimización tanto en las dimensiones y forma de los espermatozoides como en su metabolismo.

## CAPÍTULO 5

### **MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE EN ROEDORES**

#### **Introducción**

Los espermatozoides poseen una extraordinaria diversidad en forma y tamaño entre los diferentes taxones del reino animal (Cummins y Woodal, 1985; Roldan *et al.*, 1992 y Pitnick *et al.*, 2009). La evolución en cuanto a tamaño y forma de los gametos masculinos podría estar modulada por dos fuerzas selectivas: la competición espermática (Gomendio y Roldan, 1991; Roldan *et al.*, 1992; Birkhead *et al.*, 2009) y la biología reproductiva de la hembra (Gomendio y Roldan, 1993; Clark *et al.*, 1999; Schärer *et al.*, 2011; Higginson *et al.*, 2012). Cuando una hembra copula con varios machos durante el mismo ciclo reproductivo los espermatozoides de machos rivales compiten en el tracto femenino por fecundar los óvulos disponibles. Este hecho favorece que los espermatozoides de un eyaculado sean más competitivos. A su vez, la competición espermática, como fuerza selectiva, impulsa una mejora en los caracteres del esperma para maximizar las posibilidades de alcanzar una fecundación exitosa (Gómez-Montoto *et al.*, 2011a).

Los roedores son el grupo que registra una mayor diversidad en cuanto a tamaño de los espermatozoides dentro los mamíferos (Roldan *et al.*, 1992; Gomendio *et al.*, 2011). Esta diversidad afecta también a la forma. Los espermatozoides de roedores tienen morfologías muy variadas que van desde células simples, con cabezas ovaladas, hasta formas complejas que terminan en uno o varios ganchos en la región apical, o que presentan apéndices basales (Roldan *et al.*, 1992; Breed, 2004, 2005).



Tradicionalmente las morfologías de las cabezas de los espermatozoides se han analizado de forma manual, utilizando medidas unidimensionales de longitud, ancho o área de la cabeza (Cummins y Woodall, 1985; Davis y Gravance, 1994). En cualquier caso, la precisión de estos análisis depende de varios factores (Meschede *et al.*, 1993; García-Herreros, 2006; Van der Horst y Maree, 2009; Maree *et al.*, 2010) y, por ello, los resultados pueden diferir entre laboratorios (Baker y Clarke, 1987; Ridell *et al.*, 2005). Con la implementación de los métodos de análisis de imagen asistidos por ordenador (Katz *et al.*, 1986), el análisis automatizado de la morfología espermática (ASMA) supuso una mejora en la precisión de los resultados (Jagoe *et al.*, 1986). Este método automatizado caracteriza las cabezas de los espermatozoides mediante medidas de dimensiones lineales, que expresan tamaño, y calcula una serie de parámetros (denominados también “funciones”) a partir de fórmulas matemáticas en un intento de expresar forma. Este método se ideó originalmente para espermatozoides humanos (Moruzzi, 1988) y, posteriormente, se ha adaptado a otras especies (Gravance *et al.*, 1996; Rijsselaere *et al.*, 2004; Soler *et al.*, 2005; Maroto-Morales *et al.*, 2010). Otro método con el que se ha intentado evaluar la forma de la cabeza del espermatozoide es el análisis de Fourier (Ostermeier *et al.*, 2001; Thurston *et al.*, 2001; Severa *et al.*, 2010). Su uso está menos extendido que el de los parámetros calculados con ASMA y está basado en una sucesión de puntos, localizados mediante un sistema de coordenadas, que se transforman para ajustar el perímetro de la célula a una función de Fourier.

Tanto los parámetros (funciones) de ASMA como el análisis de Fourier son métodos capaces de detectar mejor las características morfológicas de la cabeza que aquellos basados solo en dimensiones lineales. Sin embargo, ninguna de las técnicas descritas anteriormente puede igualar la precisión de la morfometría geométrica a la hora de analizar la forma de una estructura. Los métodos morfométricos tradicionales

son limitados a la hora de capturar toda la complejidad morfológica presente en las cabezas de espermatozoides con estructuras muy elaboradas como son las de roedores, por lo que es necesario emplear un nuevo enfoque como es la morfometría geométrica.

La morfometría geométrica (Rohlf y Slice, 1990; Bookstein, 1991; Goodall, 1991; O'Higgins, 2001; Zelditch *et al.*, 2004) puede resolver las limitaciones de la morfometría tradicional a la hora de cuantificar la complejidad morfológica de una estructura y sus variaciones. Este método estudia las variaciones en la forma de una estructura a través de un conjunto de *landmarks* que definen la posición exacta de un punto en el espacio. Este análisis morfométrico se ha desarrollado partiendo de la Teoría de la Forma (Kendall, 1977). De acuerdo con ella, la forma definida por una configuración de *landmarks* no varía cuando se le aplican los procesos de reescalado, rotación y traslación. Al final de este proceso se obtiene por separado la información relativa a forma y la relativa a tamaño, lo que posibilita analizar ambos de forma independiente.

Los métodos morfométricos basados en análisis de Procrustes (Gower, 1975; Rohlf y Slice; 1990, Bookstein; 1991, Goodall, 1991; O'Higgins, 2000; Zelditch *et al.*, 2004) pueden ser utilizados para evaluar las variaciones morfológicas de las cabezas de espermatozoides complejos, mediante el análisis de sus configuraciones de *landmarks*. Durante el proceso de superposición de Procrustes, se extrae toda la información que no está relacionada con la forma del objeto, como puede ser la posición, la orientación y la escala del mismo. Las variables resultantes contienen toda la información relativa a forma y pueden analizarse mediante análisis estadístico multivariante (Bookstein, 1991; O'Higgins, 2000; Zelditch *et al.*, 2004). A continuación, los cambios en forma pueden visualizarse mediante *thin plate spline* (TPS). La utilización de esta técnica hace posible observar y cuantificar los cambios en forma que tienen lugar entre las configuraciones

de *landmarks* y supone otra ventaja de la morfometría geométrica sobre otros métodos analíticos.

La morfometría geométrica nunca se ha aplicado anteriormente a estudios comparativos de morfología espermática. Estudios previos realizados sólo en una especie, *Mus domesticus*, han empleado morfometría geométrica para evaluar modularidad en la cabeza espermática (Medarde *et al.*, 2013b). Otros estudios realizados también en *Mus domesticus* han utilizado esta herramienta para evaluar el efecto de la competición espermática sobre la morfología de la cabeza. Estos trabajos estaban centrados, principalmente, en el grado de curvatura del gancho y no se encontró ninguna relación entre ambos parámetros (Firman y Simmons, 2009; Firman *et al.*, 2011).

En este capítulo se hace una descripción y un análisis detallados de cómo se puede aplicar el método de morfometría geométrica para evaluar morfología espermática. Debido a que la morfometría geométrica es un método más sensible para cuantificar diferencias en forma, en este capítulo también se compara el poder analítico de este método contra otros métodos de uso muy común en morfometría tradicional de espermatozoides, como son las cuantificaciones de dimensiones lineales y los parámetros (funciones) utilizados en ASMA

## **Material y métodos**

### **Colección y preparación del esperma**

En este estudio se utilizaron cuatro especies de roedores: *Arvicola sapidus*, *Arvicola terrestris*, *Microtus arvalis* y *Myodes glareolus*.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se pesaron inmediatamente. Tras la disección, los dos epidídimos fueron depositados en una placa de Petri con 1-3 ml de medio Tyrode modificado con Hepes precalentado a 37 °C. La suspensión espermática obtenida se utilizó para realizar frotis que fueron fijados con formaldehído al 4 % y teñidos con Giemsa (ver Material y Métodos Generales). Las células fueron fotografiadas a un aumento de 1000X en campo claro. El dispositivo para la toma de imágenes estaba compuesto por un microscopio, una cámara digital y un software para captura de imágenes. Cada individuo contribuyó a la muestra con 25 medidas tomadas de 25 células diferentes, por lo que no hay pseudoréplicas en el set de datos.

### **Dimensiones lineales**

Las medidas de dimensiones lineales se obtuvieron a partir de las imágenes capturadas y utilizando el software ImageJ v 1.14. Se tomaron las medidas correspondientes a longitud, ancho, área y perímetro de la cabeza.

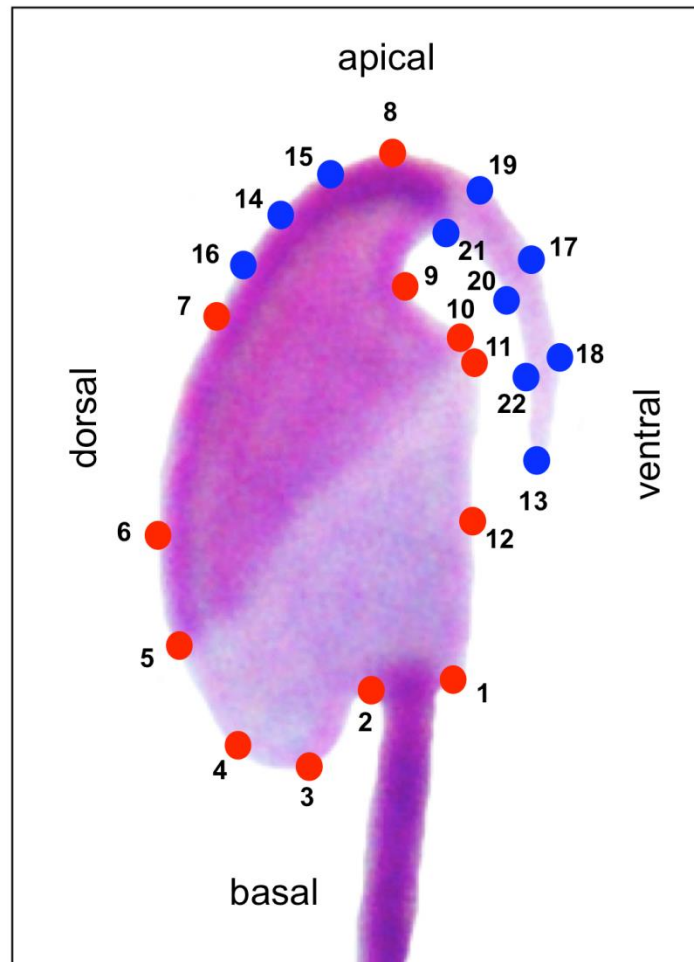
### Análisis de la forma mediante morfometría geométrica

El método que se utiliza normalmente para estos análisis es la superposición de Procrustes por mínimos cuadrados (Goodal, 1991, Zelditch *et al.*, 2004). Consiste en transformar la configuración de *landmarks*, que define una estructura, mediante reescalado, rotación y translación (ver Introducción General). De este modo se extrae toda la información que no es relativa a la forma (como el tamaño) y se minimizan las diferencias y las distancias Procrustes entre todas las configuraciones de *landmarks* de la muestra (Bookstein, 1991).

Para este trabajo se definieron 12 *landmarks* y 10 *semilandmarks* (Tabla 10, Figura 16) que están distribuidos a lo largo del perímetro de la cabeza del espermatozoide y que demarcan estructuras relevantes.

**Tabla 10.** Descripción de los *landmarks* y *semilandmarks* utilizados para evaluar las variaciones en forma de la cabeza del espermatozoide. Abreviaturas: LM, *landmark*.

<i>Landmark</i>	Descripción	Tipo
1	Punto de inserción del flagelo en la zona ventral del anillo posterior	I
2	Punto de inserción del flagelo en la zona dorsal del anillo posterior	I
3	Punto de máxima longitud de la cabeza (posición basal)	I
4	Comienzo de la curvatura de la cabeza en la región pos acrosomal	I
5	Limite basal de la región ecuatorial del acrosoma	I
6	Máxima anchura de la cabeza en la zona dorsal	I
7	Punto de inserción del gancho en la zona dorsal	I
8	Punto de máxima longitud de la cabeza (posición apical)	I
9	Punto de inserción del gancho en la zona ventral	I
10	Punto de inflexión de la zona ventral de la cabeza	I
11	Limite apical de la región ecuatorial del acrosoma	I
12	Máxima anchura de la cabeza en la zona ventral	I
13	Punta del gancho	<i>semilandmark</i>
14	Punto equidistante de los LM 7 y 8	<i>semilandmark</i>
15	Punto equidistante de los LM 7 y 14	<i>semilandmark</i>
16	Punto equidistante de los LM 8 y 14	<i>semilandmark</i>
17	Punto equidistante de los LM 8 y 13	<i>semilandmark</i>
18	Punto equidistante de los LM 17 y 13	<i>semilandmark</i>
19	Punto equidistante de los LM 8 y 17	<i>semilandmark</i>
20	Punto equidistante de los LM 9 y 13	<i>semilandmark</i>
21	Punto equidistante de los LM 9 y 20	<i>semilandmark</i>
22	Punto equidistante de los LM 13 y 20	<i>semilandmark</i>



**Figura 16.** Distribución de *landmarks* y *semilandmarks* en la cabeza del espermatozoide. Los círculos rojos indican los *landmarks* y los azules los *semilandmarks*.

Los *landmarks* fueron digitalizados mediante el software TPSdig2 v 2.16 (James Rohlf, Departamento de Ecología y Evolución, Universidad de Stony Brook, Nueva York, Estados Unidos) para extraer sus coordenadas. Estas coordenadas fueron sometidas a un proceso de reorientación de todas las configuraciones utilizando una versión beta del software Morpheus *et al.* (Dennis Slice, Universidad de Wake Forest, Winston-Salem, Carolina del Norte, Estados Unidos). El Proceso de superposición de Procrustes fue realizado con Relwarp v 1.53 (James Rohlf, Departamento de Ecología y

Evolución, Universidad de Stony Brook, Nueva York, Estados Unidos). Durante la superposición de Procrustes, los *semilandmarks* fueron deslizados para minimizar la energía de deformación entre la forma consenso y las configuraciones individuales de cada espécimen. Además se obtuvo información relativa al tamaño del centroide que expresa tamaño. El tamaño del centroide se define como la raíz cuadrada de la suma de cuadrados entre todos los landmarks y su centro de gravedad (centroide). En ausencia de alometría, el tamaño del centroide es la única medida que no está relacionada con forma (Bookstein, 1991).

### **Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software para datos morfométricos MorphoJ (Klingberg, 2011) y con el paquete Statistica v 6.0 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos).

Para evaluar el error de medida intra-observador se digitalizaron las mismas configuraciones en 5 ocasiones, sin incluir los *semilandmarks*. Con estas coordenadas se realizó un Procrustes ANOVA (Palmer, 1994; Klingenberg *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 11 y 12. De ellos podemos inferir que la variación debida a las repetidas digitalizaciones de los landmarks es menor que la variación biológica. Por tanto, podemos asumir que el error de medida es aceptable.

**Tabla 11.** Evaluación del error de medición mediante Procrustes ANOVA para el parámetro tamaño del centroide. Abreviaturas: SC, suma de cuadrados; MC, media cuadrática.

	SC	Grados de libertad	MC	F	P
Individuo	10,43	15	0,69	5,98	<0,001
Error	7,43	64	0,12		

**Tabla 12.** Evaluación del error de medición mediante Procrustes ANOVA para las coordenadas de los *landmarks*. Abreviaturas: SC, suma de cuadrados; MC, media cuadrática.

	SC	Grados de libertad	MC	F	P
Individuo	0,94	600	0,001	5,56	<0,001
Error	0,72	2560	<0,001		

### Protocolo de análisis

En este apartado se detalla el procedimiento seguido para realizar una comparación rigurosa entre el método de morfometría geométrica y los métodos de morfometría tradicional. Este protocolo consta de tres pasos:

- (1) Análisis utilizando morfometría tradicional: se tomaron medidas de las dimensiones lineales (morfometría tradicional) de los siguientes parámetros: longitud (LC,  $\mu\text{m}$ ), ancho (AC,  $\mu\text{m}$ ), área (A,  $\mu\text{m}^2$ ) y perímetro (P,  $\mu\text{m}$ ) de la cabeza espermática. Además se calcularon 4 parámetros utilizados para evaluar forma en los métodos ASMA. Estos parámetros son: Elipticidad =  $\text{LC}/\text{AC}$ , Elongación =  $(\text{LC}-\text{AC})/(\text{LC}+\text{AC})$ , Regularidad =  $\pi \text{LC AC}/4\text{A}$  y Rugosidad =



$4 \Pi A/P^2$ . Esta última fórmula es la inversa de la fórmula conocida como P2A descrita por Sailer *et al.* (1996).

(2) Estandarización: siguiendo el proceso descrito por Benazzi *et al.* (2011). Los datos fueron estandarizados por las variables morfométricas tradicionales para eliminar la variación en forma asociada a ellas. La estandarización de los datos se consigue mediante un modelo de regresión multivariante donde se regresa forma sobre la variable. La ecuación general del modelo es  $(Y_1, Y_2, \dots, Y_n) = (m_1, m_2, \dots, m_n) X + (b_1, b_2, \dots, b_n) + (r_1, r_2, \dots, r_n)$ , donde Y son las 44 coordenadas Procrustes que contienen la información relativa a forma, X es la variable por la que estandarizamos, m, b y r son los vectores que indican la pendiente de la recta, el intercepto y los residuos respectivamente. Lo que queda tras la regresión son los residuos estandarizados por cada una de las variables morfométricas tradicionales.

(3) Análisis mediante morfometría geométrica de los residuos estandarizados: siguiendo el protocolo de Jonke *et al.* (2003) se mezclan en un mismo análisis estadístico datos morfométricos y variables lineales unidimensionales. Mediante la regresión realizada en el paso 2 las diferencias debidas a las variables tradicionales han sido eliminadas quedando sólo la variación residual. De este modo, si el método de morfometría geométrica es capaz de detectar diferencias asociadas a la forma en el análisis de los residuos supondrá que la morfometría geométrica tiene una mayor resolución analítica que los métodos morfométricos tradicionales.

### **Comparación de las coordenadas Procrustes y dimensiones lineales**

Se hizo una regresión entre las coordenadas Procrustes extraídas de los *landmarks* y las variables que se utilizan en morfometría tradicional para describir la cabeza del espermatozoide: longitud, ancho y área de la cabeza. Se llevó a cabo un ANOVA con corrección de Bonferroni para examinar la hipótesis de que las muestras no difieren en sus medias. Para comprobar si la variación en forma se mantiene tras estandarizar todas las células por su longitud, ancho y área de la cabeza, se calcularon las distancias Procrustes entre todos los residuos de regresión y la configuración de *landmarks* consenso para cada especie.

### **Comparación de las coordenadas Procrustes y los parámetros (funciones)**

#### **utilizados en ASMA**

Este análisis se llevó a cabo para determinar si las funciones empleadas en ASMA son descriptores adecuados de forma de cabezas espermáticas de roedores. Se realizó una ANOVA con correcciones de Bonferroni, una correlación y una regresión entre las coordenadas Procrustes y los datos obtenidos de las siguientes fórmulas: Elipticidad =  $LC/AC$ , Elongación =  $(LC-AC)/(LC+AC)$ , Regularidad =  $\pi LC AC/4A$ , y Rugosidad =  $4\pi A/P^2$ . Para garantizar que las diferencias entre individuos se deben a su forma se calcularon las distancias Procrustes entre los residuos y el consenso para cada una de las especies.

## Resultados

### *Comparación entre coordenadas Procrustes y los valores de las dimensiones lineales (forma vs tamaño).*

Los valores de las dimensiones lineales para las distintas especies varían en un rango de 2,05  $\mu\text{m}$  en longitud de cabeza, 1,37  $\mu\text{m}$  en ancho de cabeza y 8,29  $\mu\text{m}^2$  en área (Tabla 13). El análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 14, Figura 17) reveló diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) para todas las variables de dimensiones lineales, excepto ancho de la cabeza.

**Tabla 13.** Estadísticos descriptivos de las dimensiones de la cabeza y tamaño del centroide para las especies: *Arvicola sapidus*, *Arvicola terrestris*, *Microtus arvalis* y *Myodes glareolus*.

	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desviación Estándar</b>
<b><i>Arvicola sapidus</i></b>					
Longitud cabeza	25	7,10	6,52	7,72	0,30
Ancho cabeza	25	3,95	3,67	4,30	0,21
Área	25	20,45	19,05	21,88	0,85
Tamaño centroide	25	11,63	11,16	12,09	0,25
<b><i>Arvicola terrestris</i></b>					
Longitud cabeza	25	6,63	6,20	7,05	0,23
Ancho cabeza	25	3,61	3,19	4,09	0,21
Área	25	17,63	15,89	19,59	1,01
Tamaño centroide	25	11,14	10,43	11,89	0,34
<b><i>Myodes glareolus</i></b>					
Longitud cabeza	25	7,13	6,76	7,49	0,20
Ancho cabeza	25	3,59	3,10	3,93	0,19
Área	25	22,69	21,34	25,51	0,89
Tamaño centroide	25	11,97	11,54	13,63	0,44
<b><i>Microtus arvalis</i></b>					
Longitud cabeza	25	6,96	6,56	7,49	0,31
Ancho cabeza	25	3,25	2,79	3,68	0,23
Área	25	20,31	18,06	22,56	1,27
Tamaño centroide	25	11,76	11,11	12,59	0,32
<b>TODOS</b>					
Longitud cabeza	100	7,23	6,43	8,48	0,35
Ancho cabeza	100	3,62	2,93	4,31	0,28
Área	100	21,07	17,43	25,73	1,77
Tamaño centroide	100	11,62	10,43	13,62	0,45

**Tabla 14.** ANOVA de los valores obtenidos para dimensiones lineales: longitud, ancho y área de la cabeza y tamaño del centroide. Abreviaturas: SC, suma de cuadrados; MC, media cuadrática.

	SC	Grados libertad	MC	F	P
Longitud cabeza	4,14	3	1,37	22,08	<0,0001
Ancho cabeza	0,01	3	0,005	0,122	0,95
Área	3,32	3	110,70	81,6	<0,0001
Tamaño centroide	9,42	3	3,14	25,91	<0,0001

a) Longitud de cabeza					b) Ancho de cabeza				
ESPECIE	AS	AT	MG	MA	ESPECIE	AS	AT	MG	MA
AS		<b>0,000000</b>	1,000000	1,000000	AS		1,000000	1,000000	1,000000
AT	<b>0,000000</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	AT	1,000000		1,000000	1,000000
MG	1,000000	<b>0,000000</b>		1,000000	MG	1,000000	1,000000		1,000000
MA	1,000000	<b>0,000000</b>	1,000000		MA	1,000000	1,000000	1,000000	

c) Área					d) Tamaño centroide				
ESPECIE	AS	AT	MG	MA	ESPECIE	AS	AT	MG	MA
AS		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	0,655919	AS		<b>0,000015</b>	0,005131	1,000000
AT	<b>0,000000</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>	AT	<b>0,000015</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
MG	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>		<b>0,000008</b>	MG	0,005131	<b>0,000000</b>		0,244096
MA	0,655919	<b>0,000000</b>	<b>0,000008</b>		MA	1,000000	<b>0,000000</b>	0,244096	

**Figura 17.** Correcciones de Bonferroni entre especies. Los valores en negrita son significativos ( $P < 0,001$ ). AS (*Arvicola sapidus*), AT (*Arvicola terrestris*), MA (*Microtus arvalis*), MG (*Myodes glareolus*).

La regresión entre las coordenadas Procrustes y los valores de las dimensiones lineales (Tabla 15), mostró relaciones significativas entre los parámetros longitud de la cabeza, área y tamaño del centroide ( $P < 0,001$ ). La variable más informativa es el área, aunque explica el 17,72% ( $P < 0,001$ ) de la varianza total, seguida por el tamaño del centroide, que explica 7,47% ( $P < 0,001$ ) y por último la longitud de la cabeza que

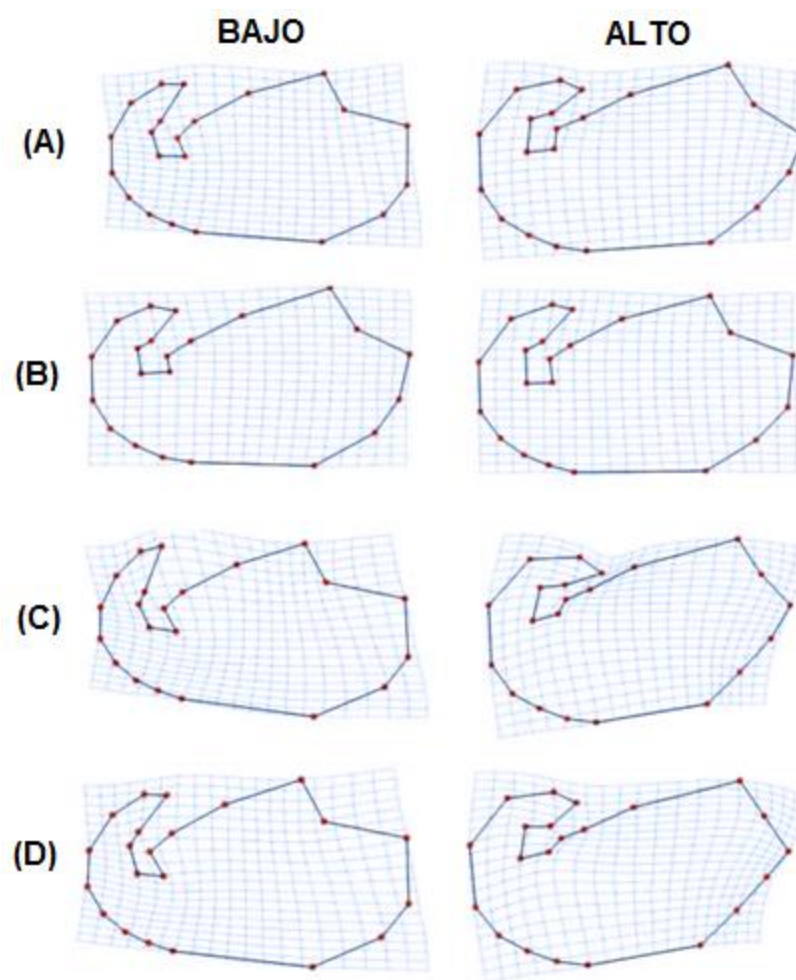
explica el 4,23% ( $P < 0,001$ ). No se obtuvieron resultados significativos para la variable ancho de la cabeza.

**Tabla 15.** Resultados del análisis de regresión entre dimensiones lineales y coordenadas Procrustes.

<b>Variable</b>	<b>% explicado</b>	<b>P</b>
Largo de la cabeza	4,23	<0,001
Ancho de la cabeza	0,96	0,437
Área	17,72	<0,001
Tamaño del centroide	7,47	<0,001

La Figura 18 ilustra las variaciones en la forma de la cabeza debidas a su longitud. En las cabezas más largas el gancho está más plegado y el flagelo está insertado en una zona más baja que en otras cabezas más cortas. La curvatura que se observa en la zona dorsal de la cabeza, y que viene definida por los *landmarks* 4, 5 y 6, es más aplanada en las cabezas largas, mientras que tiene una forma redondeada en las cortas. La zona ventral donde se localizan los *landmarks* 10, 11, 12 y 1 tiende a ser recta. Este patrón de variación en forma se conserva también para las variables área y tamaño del centroide donde, además, observamos un rasgo adicional que varía. La estructura definida por el *landmark* 10 es menos prominente en las cabezas elongadas. En resumen, a valores bajos de área, longitud de cabeza y tamaño del centroide los espermatozoides tienen cabezas más redondeadas, que van estrechándose a medida que aumenta el valor de estas tres variables.

Para asegurar que las diferencias en la forma se mantienen entre especies, se calcularon las distancias Procrustes (Tabla 16). Todas ellas resultaron ser distintas de cero una vez que se estandarizaron todas las medidas en función de la longitud, área y tamaño del centroide para evitar el llamado “efecto del tamaño”. El resultado pone de manifiesto que esta variación en forma se mantiene una vez que se estandariza por tamaño, por lo que forma y tamaño tienen un efecto independiente sobre la cabeza del espermatozoide.

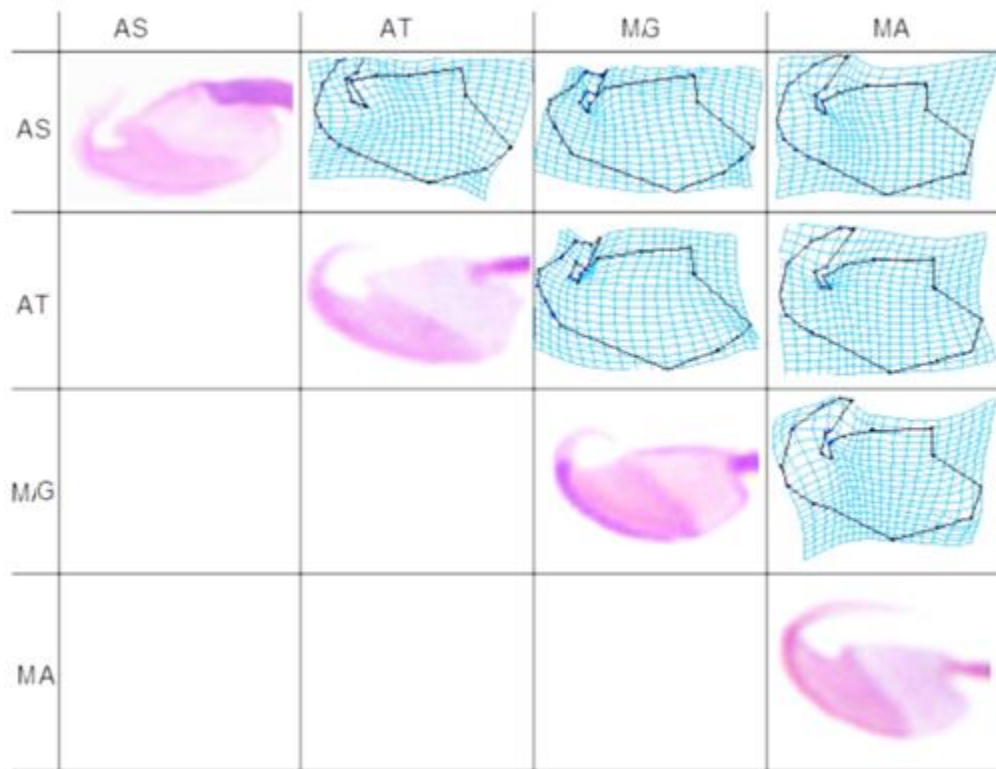


**Figura 18.** Cambios en la forma asociados a valores bajos y altos de: (A) longitud de la cabeza; (B) ancho de la cabeza; (C) área; (D) tamaño del centroide .

**Tabla 16.** Distancias Procrustes entre configuraciones de *landmarks* de distintas especies (significativas a  $P < 0,0001$ ) (1000 permutaciones) una vez que se ha estandarizado en función de la longitud, ancho, área de la cabeza y tamaño del centroide. AS (*Arvicola sapidus*), AT (*Arvicola terrestris*), MA (*Microtus arvalis*) y MG (*Myodes glareolus*).

<b>Longitud de la cabeza</b>			
	AS	AT	MG
AT	0,08		
MG	0,17	0,12	
MA	0,15	0,11	0,11
<b>Ancho de la cabeza</b>			
	AS	AT	MG
AT	0,09		
MG	0,17	0,16	
MA	0,15	0,14	0,11
<b>Área</b>			
	AS	AT	MG
AT	0,10		
MG	0,13	0,05	
MA	0,14	0,08	0,11
<b>Tamaño del centroide</b>			
	AS	AT	MG
AT	0,09		
MG	0,15	0,10	
MA	0,14	0,11	0,11





**Figura 19.** Principales patrones de deformación en la cabeza del espermatozoide. Las gráficas indican la magnitud y zonas de la cabeza en las que debería deformarse el espermatozoide para adoptar la forma de la cabeza de un espermatozoide de otra especie. AS (*Arvicola sapidus*), AT (*Arvicolá terrestris*), MA (*Microtus arvalis*) y MG (*Myodes glareolus*).

**Comparación entre las coordenadas Procrustes y los parámetros (funciones) utilizadas en ASMA como descriptores de forma**

El software de equipos de ASMA (por ejemplo, módulo de morfometría del Sperm Class Analyzer, SCA, Microptic, Barcelona) incluye habitualmente fórmulas para calcular 4 parámetros. La Elipticidad y Elongación se calculan mediante dos fórmulas distintas que generan una proporción la cual mide la elongación de la cabeza con respecto a su ensanchamiento. La Regularidad mide cuánto se parece la forma de la cabeza a una elipse. Por último, la Rugosidad varía en un rango entre 0 y 1 y expresa cuánto se parece la cabeza del espermatozoide a un círculo (rugosidad = 0).

El mayor rango de variación en las cabezas de los arvicólidos analizados se encontró en Elipticidad (0,30) y Regularidad (0,43). La Elongación y la Rugosidad varían en un rango de 0,17 y 0,30, respectivamente (Tabla 17). El análisis de la varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) en las variables Elongación y Regularidad (Tabla 18, Figura 20).

**Tabla 17.** Estadísticos descriptivos de los valores obtenidos para las fórmulas Elipticidad, Elongación, Regularidad y Rugosidad para cuatro especies de arvicólidos que presentan gancho.

	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desviación Estándar</b>
<b><i>Arvicola sapidus</i></b>					
Elipticidad	25	1,79	1,64	1,96	0,08
Elongación	25	0,28	0,24	0,32	0,02
Regularidad	25	1,08	0,92	1,28	0,10
Rugosidad	25	0,49	0,41	0,56	0,04
<b><i>Arvicola terrestris</i></b>					
Elipticidad	25	2,28	2,12	2,53	0,11
Elongación	25	0,39	0,36	0,43	0,02
Regularidad	25	0,98	0,81	1,10	0,06
Rugosidad	25	0,44	0,32	0,44	0,33
<b><i>Myodes glareolus</i></b>					
Elipticidad	25	1,99	1,74	2,33	0,12
Elongación	25	0,33	0,27	0,40	0,02
Regularidad	25	0,88	0,79	0,95	0,03
Rugosidad	25	0,52	0,49	0,61	0,03
<b><i>Microtus arvalis</i></b>					
Elipticidad	25	1,94	1,67	2,28	0,12
Elongación	25	0,32	0,25	0,39	0,02
Regularidad	25	0,95	0,86	1,05	0,04
Rugosidad	25	0,46	0,35	0,57	0,04
<b>TODOS</b>					
Elipticidad	100	1,93	1,61	2,33	0,14
Elongación	100	0,31	0,23	0,40	0,03
Regularidad	100	0,97	0,79	1,22	0,08
Rugosidad	100	0,47	0,31	0,61	0,06

**Tabla 18.** ANOVA de valores calculados empleando las fórmulas utilizadas en ASMA que expresan forma (Elipticidad, Elongación, Regularidad y Rugosidad). Abreviaturas: SC, suma de cuadrados; MC, media cuadrática.

	SC	Grados de libertad	MC	F	p
Elipticidad	0,314	3	0,105	5,745	0,011
Elongación	0,018	3	0,006	6,133	0,000
Regularidad	0,417	3	0,139	40,82	0,000
Rugosidad	0,244	3	0,081	4,187	0,008

a) Ellipticity

ESPECIE	AS	AT	MG	MA
AS		<b>0,011396</b>	1,000000	1,000000
AT	<b>0,011396</b>		<b>0,001287</b>	<b>0,039594</b>
MG	1,000000	<b>0,001287</b>		1,000000
MA	1,000000	<b>0,039594</b>	1,000000	

b) Elongation

SPECIE	AS	AT	MG	MA
AS		<b>0,008800</b>	1,000000	1,000000
AT	<b>0,008800</b>		<b>0,000823</b>	<b>0,025425</b>
MG	1,000000	<b>0,000823</b>		1,000000
MA	1,000000	<b>0,025425</b>	1,000000	

c) Regularity

ESPECIE	AS	AT	MG	MA
AS		<b>0,000042</b>	<b>0,000000</b>	0,388731
AT	<b>0,000042</b>		<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>
MG	<b>0,000000</b>	<b>0,000000</b>		<b>0,000265</b>
MA	0,388731	<b>0,000000</b>	<b>0,000265</b>	

d) Roughness

ESPECIE	AS	AT	MG	MA
AS		0,066959	1,000000	1,000000
AT	0,066959		<b>0,006109</b>	0,350990
MG	1,000000	<b>0,006109</b>		0,861730
MA	1,000000	0,350990	0,861730	

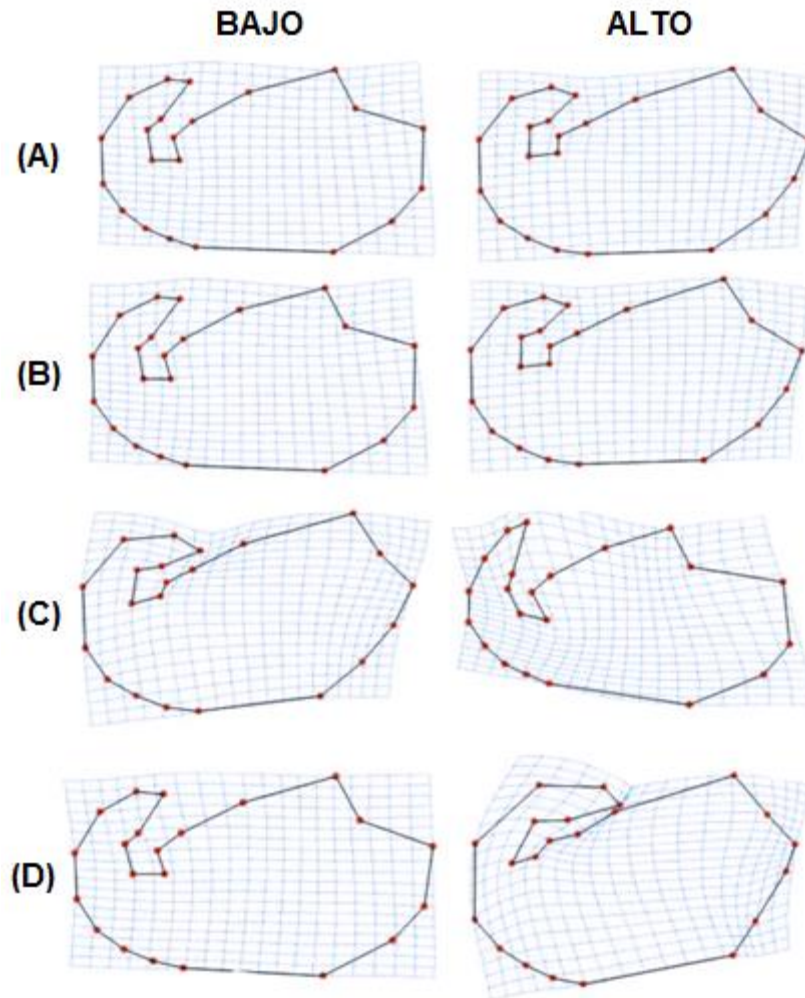
**Figura 20.** Correcciones de Bonferroni entre especies. Los valores en negrita son estadísticamente significativos ( $P < 0,001$ ). AS (*Arvicola sapidus*), AT (*Arvicola terrestris*), MA (*Microtus arvalis*) y MG (*Myodes glareolus*).

Tras el análisis de regresión se observó que el mejor descriptor de forma es Regularidad (15,4%;  $P < 0,001$ ). Rugosidad es el segundo mejor descriptor (4,6%;  $P = 0,001$ ). Elipticidad y Elongación explican un porcentaje muy pequeño de la varianza (1,6%;  $P = 0,135$  y 1,8%;  $P = 0,095$  respectivamente) (Tabla 19).

**Tabla 19.** Análisis de regresión entre las coordenadas Procrustes y las fórmulas utilizadas en ASMA.

<b>Variable</b>	<b>% explicado</b>	<b><i>P</i></b>
Elipticidad	1,6	0,135
Elongación	1,8	0,095
Regularidad	15,4	<0,001
Rugosidad	4,6	0,001

Las gráficas de deformación de la Figura 21 ilustran los resultados obtenidos en la regresión. El patrón de deformación que sigue Regularidad es completamente opuesto al que siguen las otras tres variables. A valores altos de Regularidad la cabeza del espermatozoide tiene una forma redondeada, el flagelo se inserta en un punto más alto y el gancho no está plegado. Para valores bajos esta tendencia se invierte y la célula muestra una silueta más alargada, con el gancho plegado y una inserción del flagelo más basal.

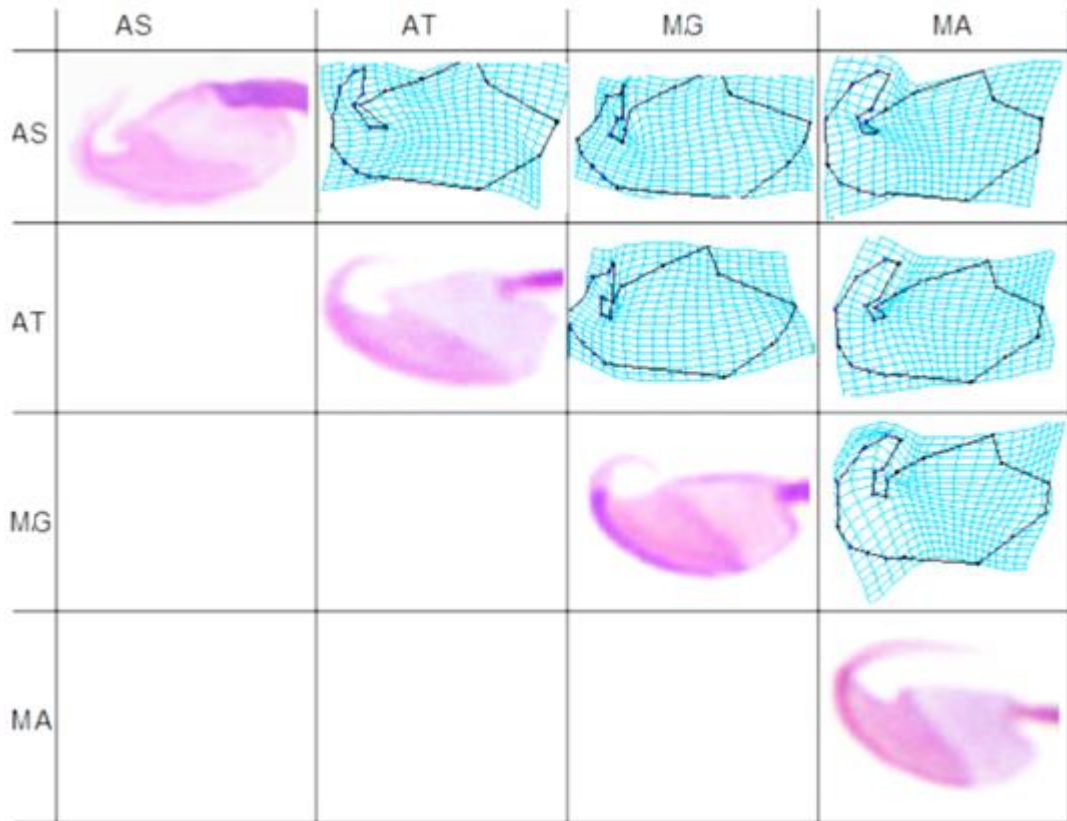


**Figura 21.** Cambios en la forma asociados a valores bajos y altos de: (A) Elipticidad; (B) Elongación; (C) Regularidad; (D) Rugosidad.

Para comprobar que la variación que observamos está libre de la influencia de “efecto tamaño” se calcularon las distancias Procrustes (Tabla 20) habiendo estandarizado previamente por Elipticidad, Elongación, Regularidad y Rugosidad. Todas las distancias resultaron ser distintas de cero, por lo que se puede afirmar que existe una variación en la forma de la cabeza del espermatozoide que es independiente del tamaño.

**Tabla 20.** Valores de las distancias Procrustes entre configuraciones de *landmarks* de las distintas especies (significativas a  $P < 0,0001$ ) (1000 permutaciones) una vez que se ha estandarizado en función de Elipticidad, Elongación, Regularidad y Rugosidad). AS (*Arvicola sapidus*), AT (*Arvícula terrestre*), CG (*Clethrionomys glareolus*), MA (*Microtus arvalis*).

<b>Elipticidad</b>			
	AS	AT	MG
AT	0,08		
MG	0,17	0,15	
MA	0,15	0,13	0,11
<b>Elongación</b>			
	AS	AT	MG
AT	0,08		
MG	0,17	0,14	
MA	0,15	0,13	0,11
<b>Regularidad</b>			
	AS	AT	MG
AT	0,09		
MG	0,13	0,06 ( $P=0,010$ )	
MA	0,15	0,09	0,10
<b>Rugosidad</b>			
	AS	AT	MG
AT	0,08		
MG	0,17	0,14	
MA	0,15	0,13	0,11



**Figura 22.** Patrones de deformación de la cabeza después de estandarizar por la variable Regularidad. Las gráficas indican la magnitud y zonas de la cabeza en las que debería deformarse el espermatozoide para adoptar la forma de la cabeza de un espermatozoide de otra especie. AS (*Arvicola sapidus*), AT (*Arvicola terrestris*), MA (*Microtus arvalis*) y MG (*Myodes glareolus*).

## Discusión

El estudio realizado demuestra que la morfometría geométrica es una herramienta que proporciona un análisis más sofisticado de la morfología espermática. Este método es capaz de capturar diferencias sutiles en forma y puede ser aplicado a otras cuestiones biológicas, como pueden ser la variación morfológica en espermatozoides de distintos linajes taxonómicos, el fenotipado de espermatozoides en distintas cepas de roedores modificados genéticamente, o la caracterización de los daños estructurales que ocasionan los agentes reprotóxicos en células de la línea germinal.

Las diferencias en la forma de la cabeza del espermatozoide pueden ser considerables incluso a nivel interespecífico. Especies muy emparentadas pueden tener diferencias substanciales en lo que a morfología espermática se refiere (Vitullo *et al.*, 1988; Breed, 2004; 2005), y las diferencias en la forma de la cabeza pueden ayudar a identificar especies crípticas (Landry *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2006). En ratón se ha observado que las deleciones del cromosoma Y (Ward *et al.*, 2006), las translocaciones robertsonianas (Medarde *et al.*, 2013a), así como otro tipo de mutaciones (Mendoza-Lujambio *et al.*, 2002; Ward, 2005) o la manipulación genética (Adham *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2012), pueden provocar cambios en la morfología espermática. Además, los agentes químicos también pueden inducir cambios en la morfología de la cabeza del espermatozoide (Wyrobek y Bruce, 1975). Para detectar estos daños, identificar los agentes químicos que producen disfunciones en la espermatogénesis y evaluar su posible efecto carcinógeno se desarrolló un test de morfología espermática (Wyrobek *et al.*, 1983). Para ayudar a evaluar el impacto de alteraciones genéticas o efectos de agentes tóxicos se han propuesto clasificaciones para las anomalías morfológicas más frecuentes que se dan en la cabeza del espermatozoide



(Krzanowska *et al.*, 1975; Burrell *et al.*, 1996). Estas clasificaciones categorizan, *grosso modo*, las anomalías espermáticas. La posibilidad de detectar cambios sutiles en la morfología espermática implantando herramientas de morfometría geométrica dotaría a estos test de una mayor sensibilidad.

Los *landmarks* definidos en este trabajo cubren todas las estructuras susceptibles de sufrir variación. Los *landmarks* 1 y 2 definen dónde se inserta el flagelo. Este punto de inserción puede tener implicaciones biomecánicas capaces de conferir estabilidad a la célula, a medida que nada. Los pares de *landmarks* 3 y 8, y 6 y 12, definen longitud y ancho de cabeza, respectivamente, y se utilizan como *landmarks* control sobre los valores obtenidos por dimensiones lineales. Los *landmarks* 4 y 10 definen dos estructuras opuestas que varían de forma análoga; son prominentes y redondeadas en algunas especies y más aplanadas en otras, con un papel importante en la hidrodinámica celular. Los *landmarks* 5 y 11 indican el límite entre la región acrosómica (apical) y la región post-acrosómica (basal). Los *semilandmarks* se emplearon para definir la forma del gancho. En roedores esta es la estructura del espermatozoide que experimenta una mayor variación incluso a nivel intra-individual. El gancho tiene un papel importante durante los procesos que culminan con la fecundación, permitiendo a los espermatozoides adherirse a las paredes del tracto reproductor femenino (Suarez, 1987; Smith y Yanagimachi, 1990). Las diferencias morfológicas que presenta el gancho entre las distintas especies de roedores pueden ser producto de la competición espermática (Roldan *et al.*, 1992; Immler *et al.*, 2007; Firman y Simmons, 2009; Firman *et al.*, 2011). Estudios realizados en ratón doméstico (*Mus domesticus*) han encontrado diferencias en el grado de curvatura del gancho en diferentes líneas de ratón, en las que se ha inducido la competición espermática de forma experimental (Firman y Simmons, 2009; Firman *et al.*, 2011). Estos estudios utilizaron sólo 4 *landmarks* para identificar

estructuras claves en la cabeza del espermatozoide y el resto del perímetro fue cubierto con semilandmarks. Esta disposición de los *landmarks* puede haber reducido la sensibilidad analítica del método, por lo que la detección de la variación morfológica quizá fue menos precisa.

Se han realizado multitud de estudios comparativos dentro de un marco evolutivo en los que se caracterizó a los espermatozoides mediante el uso de dimensiones lineales (Tourmente et al., 2011a y b). Con el objetivo de mejorar la calidad y rapidez del análisis se introdujo el análisis automatizado de la morfología espermática (ASMA). Bajo el nombre genérico de ASMA se comercializan varios softwares capaces de evaluar en unos pocos minutos cientos de células. Estos sistemas se han desarrollado para espermatozoides de morfología simple, debido a que el método funciona peor en células con formas complejas como en el caso de roedores. Independientemente de si se utiliza ASMA o dimensiones lineales para evaluar morfología espermática, la caracterización de los espermatozoides se basa en las medidas de largo, ancho, área y perímetro de la cabeza (Cummins y Woodall, 1985; Roldan *et al.*, 1992; Gómez-Montoto *et al.*, 2011b; Tourmente *et al.*, 2011a y b). En el caso de ASMA, estas medidas lineales se combinan en fórmulas que intentan dar una aproximación a forma. En ocasiones también se utilizan ratios como longitud de la cabeza/ancho de la cabeza para discriminar morfotipos celulares, sobre todo a nivel intraespecífico (Malo *et al.*, 2006). Es importante tener en cuenta que todos estos parámetros son esencialmente descriptores de tamaño, y, por lo tanto, no son capaces de describir las variaciones en forma de una manera precisa, como ponen de manifiesto los resultados del presente trabajo.

Eliminando todo efecto relativo al tamaño en las configuraciones de *landmarks*, pueden observarse aún diferencias en varias estructuras de la cabeza del espermatozoide como por ejemplo: en la zona de inserción del flagelo, las zonas de curvatura dorsal y ventral definidas por los *landmarks* 4 y 10, y la forma del gancho. Los espermatozoides que poseen cabezas cortas tienen una morfología más ovalada, que se va elongando a medida que la cabeza del espermatozoide crece en longitud. Por otra parte, no se observaron diferencias relativas al ancho de la cabeza.

En muchas especies, los espermatozoides comparten valores similares de dimensiones lineales mientras que sus diferencias en forma son considerables. En este trabajo se ha simulado esta situación mediante la estandarización de las células por sus dimensiones lineales. El análisis de los residuos estandarizados reveló que hay zonas de la cabeza del espermatozoide que son más susceptibles de experimentar variación morfológica que otras. Además, las regiones en las que ocurren los cambios están fuera del rango de medida de las dimensiones lineales, por lo que estos cambios pasan desapercibidos. Los resultados de este trabajo apuntan a que utilizando sólo dimensiones lineales se limita considerablemente la percepción de los cambios en aquellos espermatozoides con morfologías complejas, como es el caso de los roedores. La forma es el principal rasgo de variación entre los espermatozoides de distintos taxones. Por este motivo, su análisis detallado permitirá un mejor conocimiento acerca de la repercusión que tienen los factores biomecánicos, e hidrodinámicos, sobre el movimiento y la estructura de estas células.

En este trabajo también se comparó la eficiencia a la hora de describir cambios en forma que ofrecen las fórmulas utilizadas en ASMA (Elipticidad, Elongación, Regularidad y Rugosidad) en relación a las coordenadas Procrustes. Los resultados obtenidos demuestran que Elipticidad y Elongación son dos parámetros que describen el

mismo fenómeno: el ratio entre la elongación y el ensanchamiento de la cabeza. Por tanto, aportan información redundante, aunque en algunas estudios ambos parámetros se miden y son analizados como dos descriptores de forma independientes (Hidalgo *et al.*, 2008; Maree *et al.*, 2010). La Regularidad mide cuánto difiere la forma de un espermatozoide de una elipse. Este parámetro es el mejor descriptor de forma de los 4 que se han examinado en este trabajo. La presencia del gancho apical en los espermatozoides de arvicólidos analizados hace que su forma sea más elíptica que la de los espermatozoides de humanos y ungulados, que son las especies frecuentemente evaluadas con ASMA. De ahí que esta fórmula sea el mejor descriptor de forma para espermatozoides de roedores.

La Rugosidad mide cuánto se parece la cabeza del espermatozoide a un círculo, al contrario que la Regularidad, y sería un buen descriptor de forma para espermatozoides ovalados, pero captura muy poca información en espermatozoides con forma de elipse.

A la luz de estos resultados podemos decir que las coordenadas Procrustes son mejores descriptores de forma que cualquiera de las fórmulas que incorporan los módulos de ASMA. Esto se debe a que el método de ASMA se desarrolló originalmente para espermatozoides ovalados y con cabezas simples y se basa en un conjunto de fórmulas que tratan de asemejar el perímetro de la célula al de una figura geométrica. Esta aproximación a forma no es capaz de capturar la variación en espermatozoides con formas más complejas, ni de analizar estructuras por separado como sí puede hacerse mediante morfometría geométrica.

Como conclusión a este capítulo, los resultados demuestran que, la morfometría geométrica aplicada a la evaluación de la morfología espermática aporta tres ventajas sobre los métodos empleados hasta la fecha:

- a) Permite evaluar por separado forma y tamaño, además de ser capaz de eliminar el efecto del tamaño sobre la forma del objeto.
- b) Es capaz de mostrar dónde ocurren los principales cambios morfológicos en la cabeza del espermatozoide.
- c) Supone un método fiable y con una alta resolución para detectar y cuantificar las variaciones en forma del espermatozoide cuya aplicación no está limitada por la complejidad del diseño celular.
- d) La morfometría geométrica puede aplicarse como herramienta de análisis al fenotipado de espermatozoides para evaluar los efectos que las mutaciones o los distintos agentes reprotóxicos tienen sobre su morfología.

## APÉNDICE CAPÍTULO 5

### **EFEECTO DE LA TINCIÓN SOBRE LA FORMA DE LA CABEZA**

Para evaluar si el método de tinción puede producir variación en el tamaño y forma de las células se compararon espermatozoides fijados y teñidos con Giemsa, con espermatozoides fijados con glutraldehido-cacodilato y sin teñir. Para este análisis se utilizaron 6 especies de arvicólidos: *Arvicola sapidus*, *Arvicola terrestris*, *Microtus arvalis*, *Microtus cabreræ*, *Microtus lusitanicus* y *Myodes glareolus*.

Estas especies tienen diferencias morfológicas muy acusadas. De todas ellas, la más evidente es la presencia / ausencia del gancho apical característico en roedores. Uno de los requerimientos para poder comparar configuraciones de *landmarks* es que su número sea equivalente en todas ellas. Para solventar este problema, el análisis se llevó a cabo utilizando sólo los *landmarks* (ver Tabla 10), puesto que son comunes a todas las especies y eliminando los *semilandmarks* (que definen la forma del gancho).

Se realizó una ANOVA con los valores de los tamaños de los centroides para analizar diferencias en tamaño, y una MANOVA, usando los valores de los componentes principales, para buscar diferencias en cuanto a forma.

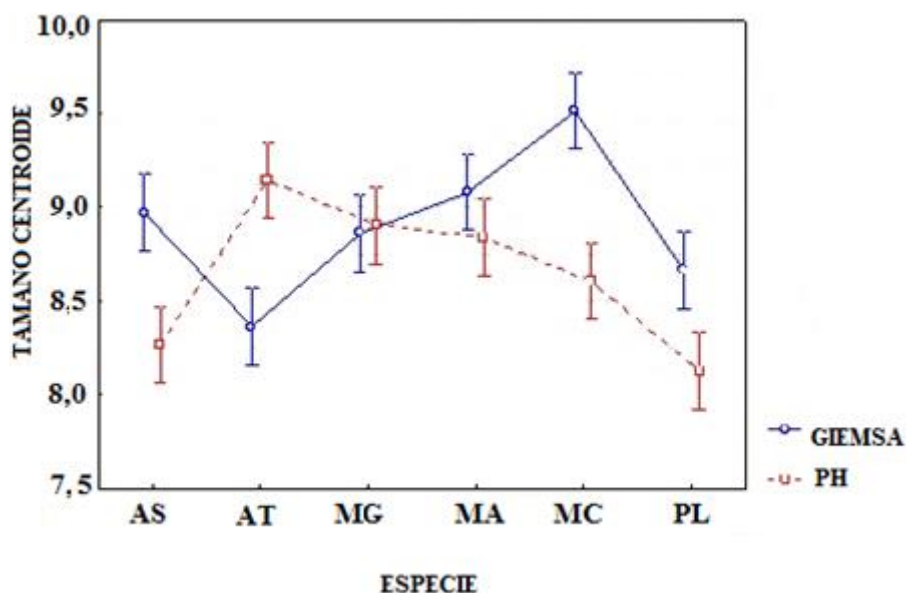
El ANOVA muestra que existen diferencias en tamaño entre las especies analizadas debidas al método de tinción (Tabla 21). Los espermatozoides teñidos con Giemsa son más grandes que los que están únicamente fijados (Figura 23).

El análisis multivariante de la varianza (MANOVA) mostró diferencias significativas entre la forma de las cabezas debidas al método de tinción (Tabla 22). Sin embargo, estas diferencias no mantienen un patrón constante (Figura 24). Teniendo en cuenta que no hay un patrón constante en estas diferencias es importante utilizar

siempre un mismo método de tinción para obtener resultados consistentes al evaluar diferencias morfológicas.

**Tabla 21.** Diferencias en tamaño entre espermatozoides fijados y teñidos. Comparación del tamaño de los centroides. ANOVA, todos los valores obtenidos son estadísticamente significativos ( $P < 0,001$ ). Abreviaturas: SC, suma de cuadrados; MC, media cuadrática.

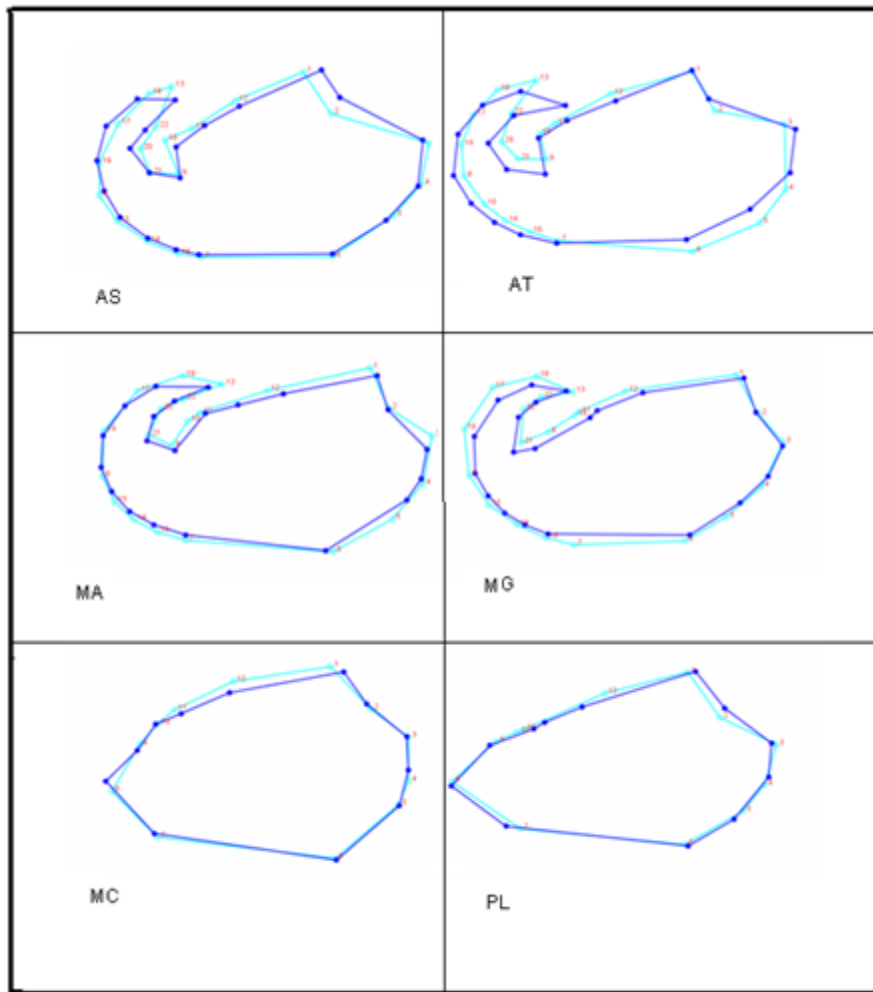
	SC	Grados libertad	MC	F	P
Intercepto	22306,71	1	22305,71	128740,6	<0,0001
Especie	9,44	5	1,89	10,9	<0,0001
Método	3,27	1	3,27	18,9	<0,0001
Especie*método	14,98	5	3,00	17,3	<0,0001
Error	49,90	288	0,17		



**Figura 23.** Diferencias en el tamaño de los centroides según el método de tinción.  $F$  (5,28);  $P < 0,0001$ ). Las barras verticales indican intervalos de confianza al 95%. Los símbolos (cuadrados o círculos) representan el valor de la media. GIEMSA = giemsa, PH = muestras en fresco observadas bajo contraste de fase. AS (*Arvicola sapidus*), AT (*Arvicola terrestris*), MA (*Microtus arvalis*), MC (*Microtus cabreræ*) y PL (*Pitymys lusitanicus*) y MG (*Myodes glareolus*).

**Tabla 22.** Diferencias en la forma observada entre espermatozoides frescos y teñidos. MANOVA, todos los valores obtenidos son estadísticamente significativos ( $P < 0,001$ ).

	Test	Valor	F	Efecto	Error	P
Intercepto	Wilks	1		20	269	
Especie	Wilks	0,0	14,24	100	1316,98	<0,0001
Método	Wilks	1		20	269	
Especie*método	Wilks	0,05	11,11	100	1316,98	<0,0001



**Figura 24.** Diferencias en la forma debido a la tinción. Las líneas en color turquesa corresponden a espermatozoides teñidos con Giemsa y las líneas azules a espermatozoides fijados pero no teñidos. AS (*Arvicola sapidus*), AT (*Arvicola terrestris*), MA (*Microtus arvalis*), MC (*Microtus cabreræ*) y PL (*Pitymys lusitanicus*) y MG (*Myodes glareolus*).



## CAPÍTULO 6

### **DIFERENCIAS EN LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA EN LINAJES DE ROEDORES MUROIDEOS**

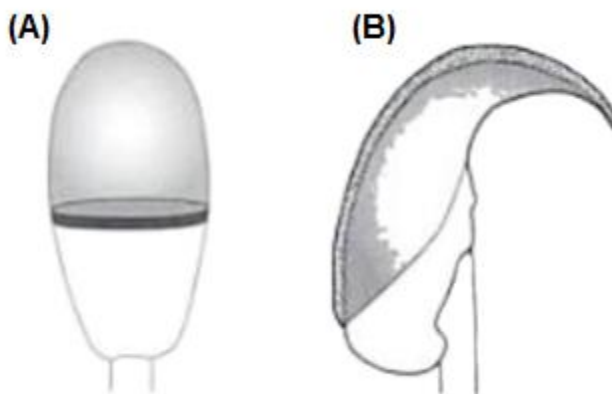
#### **Introducción**

Durante el Cenozoico los roedores experimentaron un proceso de radiación adaptativa. A consecuencia de ello, los roedores agrupan a más de la mitad de las 4400 especies de mamíferos existentes en la actualidad (Wilson y Reeder, 2005). La superfamilia Muroidea consta de alrededor de 1300 especies de origen monofilético (De Bry y Sagel, 2001) diversificadas por Asia, América, Europa, África y Australia. Muroidea comprende 19 subfamilias entre las que se encuentran Arvicolinae, Murinae y Cricetinae. Los arvicolinos tienen distribución holártica, es decir, en la región que incluye la ecozona Paleártica, consistente en África del Norte y toda Eurasia, con la excepción del sudeste asiático y el subcontinente indio, y la ecozona Neártica, que comprende toda Norteamérica hasta el norte de México. Las especies pertenecientes a Murinae son originarias de África, Australia, Europa y Asia. Por otra parte, los Cricetinos proceden de Oriente Medio.

Además de una distribución extensa los roedores también han desarrollado una gran variedad de adaptaciones ecológicas y morfológicas que les han permitido colonizar distintos hábitats. Esta diversidad se hace evidente también en sus espermatozoides, ya que este grupo registra el mayor nivel de variación interespecífica descrito en mamíferos (Roldan *et al.*, 1992; Breed, 2005).

A nivel de ultraestructura, la cabeza del espermatozoide contiene un núcleo donde está condensado el ADN. Por encima del núcleo se encuentra el acrosoma que tiene dos componentes: una región que contiene las enzimas hidrolíticas y un segmento ecuatorial que estabiliza la membrana plasmática. Entre el acrosoma y el núcleo hay una

región subacrosomal, de material citoesquelético, cuya función puede ser conectar ambas estructuras. Por último, en algunas especies ese material citoesquelético se extiende hacia la región apical, formando el perforatorium.



**Figura 25.** Morfología de la cabeza de espermatozoides de mamíferos euterios. Nótese la diferencia entre (A) la cabeza aplanada dorso-ventralmente en espermatozoide de conejo, que es similar a la encontrada en un gran número de especies de euterios, en relación a (B) la forma de la cabeza aplanada latero-lateralmente de roedores muroideos tales como ratón.

En cuanto a morfología, por lo general, la cabeza del espermatozoide en mamíferos euterios es aplanada dorso-ventralmente, tiene forma de pala o espátula y el núcleo está cubierto por un acrosoma simétrico de dimensiones variables (Bedford y Hoskins, 1990; Eddy y O'Brien, 1994; Yanagimachi, 1994). La morfología de los espermatozoides de roedores es, en general, muy diferente del diseño básico encontrado en euterios. La cabeza es falciforme y asimétrica (Bishop y Walton, 1960) y está aplanada en sentido latero-lateral (Figura 25). Lo más característico de los espermatozoides de roedores es el desarrollo de estructuras anexas a la cabeza a modo de apéndices. Estos apéndices pueden localizarse bien en posición basal, como los caviomorfos del género *Ctenomys* (Vitullo *et al.*, 1988) o bien en posición apical como se observa en miomorfos muroideos. Las especies que poseen ganchos en posición

apical pueden tener sólo un gancho, como ocurre en las familias Muridae y Cricetidae (Breed, 2005) o disponer de varios ganchos dispuestos uno debajo del otro, como en los conilurinos australianos de los géneros *Dasymys*, *Hydromys* y *Pseudomys* (Breed, 1997). En los roedores muroideos, el acrosoma se encuentra en posición apical-rostral ocupando parte de la estructura denominada gancho, que contribuye a la asimetría de la cabeza espermática, al contrario que en el resto de mamíferos euterios.

Las variaciones en las dimensiones del espermatozoide de distintas especies de roedores se han descrito en numerosos estudios (Friend 1936; Cummins y Woodall 1985; Gordon y Watson, 1986; Breed, 1995; Gómez-Montoto *et al.*, 2011b). Sin embargo, las diferencias en cuanto a forma de la cabeza no han sido cuantificadas con anterioridad en ningún estudio comparativo, si bien se han realizado descripciones de forma de la cabeza espermática y esfuerzos para comprender la dirección de la evolución de este componente (Roldan *et al.*, 1992; Breed *et al.*, 2014).

El objetivo del trabajo desarrollado en este capítulo es hacer un estudio de la morfología espermática en tres linajes de roedores, Arvicolinae, Cricetinae y Murinae. Se ha desarrollado un análisis mediante herramientas de morfometría geométrica con el fin de cuantificar estas diferencias aportando valores numéricos con evidencia más robusta que la basada únicamente en la observación. Se ha analizado la cabeza en conjunto y, también, la región de la cabeza que no contiene el gancho, así como solamente la región del gancho con el fin de lograr un análisis más detallado.

## **Material y métodos**

La variación en la forma de la cabeza se evaluó en cinco individuos adultos de especies pertenecientes a tres linajes de roedores muroideos. Las especies de la subfamilia Arvicolinae fueron *Arvicola sapidus*, *Arvicola terrestris*, *Chionomys nivalis*, *Microtus arvalis* y *Myodes glareolus*. Las de la subfamilia Cricetinae comprendieron *Mesocricetus auratus*, *Phodopus campbelli*, *Phodopus roborovskii* y *Phodopus sungorus*. Finalmente, las especies de Murinae fueron *Apodemus sylvaticus*, *Lemniscomys barbarous*, *Mus caroli*, *Mus castaneus*, *Mus domesticus*, *Mus macedonicus*, *Mus musculus*, *Mus spicelus*, *Mus spretus* y *Mus pahari*.

### **Obtención de las muestras**

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y diseccionados para extraer ambos epidídimos. Los epidídimos fueron incubados durante 5 minutos en una placa con 1-3 ml de medio Tyrode modificado con Hepes y precalentado a 37°C. A partir de esta suspensión espermática se realizaron frotis que se dejaron secar al aire.

Posteriormente se fijaron con formaldehído al 4% en tampón fosfato y se tiñeron con Giemsa.

Se fotografiaron un total de 25 células de cada individuo a una aumento de 1000X en campo claro, mediante un microscopio conectado a una cámara digital y empleando el software ImageJ. A continuación las imágenes fueron digitalizadas según se detalla en el capítulo 5.

### Análisis estadístico

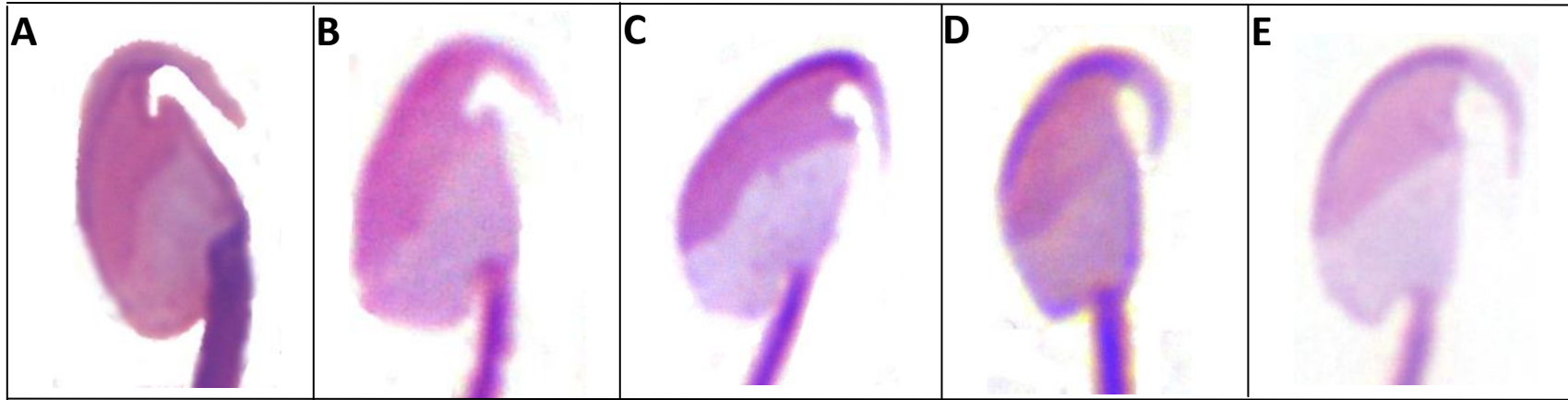
La variación morfológica existente entre los tres linajes se cuantificó en términos de distancia Procrustes (ver Introducción General). Cuando esta distancia es distinta de cero, se interpreta que hay diferencias en forma entre las configuraciones de *landmarks*. Cada uno de los valores de distancia lleva asociado un valor de significación para el test de permutación.

Para describir las diferencias en la forma de la cabeza se agruparon las especies por linajes (subfamilias). La descripción y los análisis se realizaron en tres niveles. En un primer análisis se cuantificó la forma global de la cabeza tomando la configuración completa de *landmarks* (ver Tabla 10 y Figura 16). En los dos análisis posteriores se dividió cada configuración completa de *landmarks* en dos grupos. En uno se trató de analizar únicamente las diferencias en la forma del cuerpo principal de la cabeza, sin incluir el gancho. En el otro, se realizó un análisis examinando posibles diferencias en la forma del gancho. Las diferencias en formas se visualizaron por medio de los gráficos de deformación.

## Resultados

### Linaje Arvicolinae

Las imágenes tomadas al microscopio óptico mostraron que los espermatozoides de las especies de este linaje tienen una cabeza asimétrica (Figura 26), y con una inserción del flagelo desplazada con respecto al eje principal de la cabeza. Todas las especies presentan una curvatura pronunciada de la parte dorsal de la región postacrosomal, con excepción de *Myodes glareolus*, donde esta zona es muy aplanada. Esta curvatura hace que la cabeza sea más ancha en la región basal y vaya estrechándose hacia la región apical, donde se encuentra el gancho en posición rostral. El punto de inflexión ventral de la cabeza es especialmente prominente en *Arvicola sapidus*, *Arvicola terrestris* y *Chionomys nivalis*, siendo mucho menos pronunciado en *Microtus arvalis* y aún menos en *Myodes glareolus*.



**Figura 26.** Morfología de la cabeza en espermatozoides de las especies pertenecientes al linaje de la subfamilia Arvicolinae: (A), *Arvicola sapidus*; (B), *Arvicola terrestris*; (C), *Chionomys nivalis*; (D), *Myodes glareolus*; (E), *Microtus arvalis*. Todas las imágenes fueron tomadas a un aumento de 1000X.

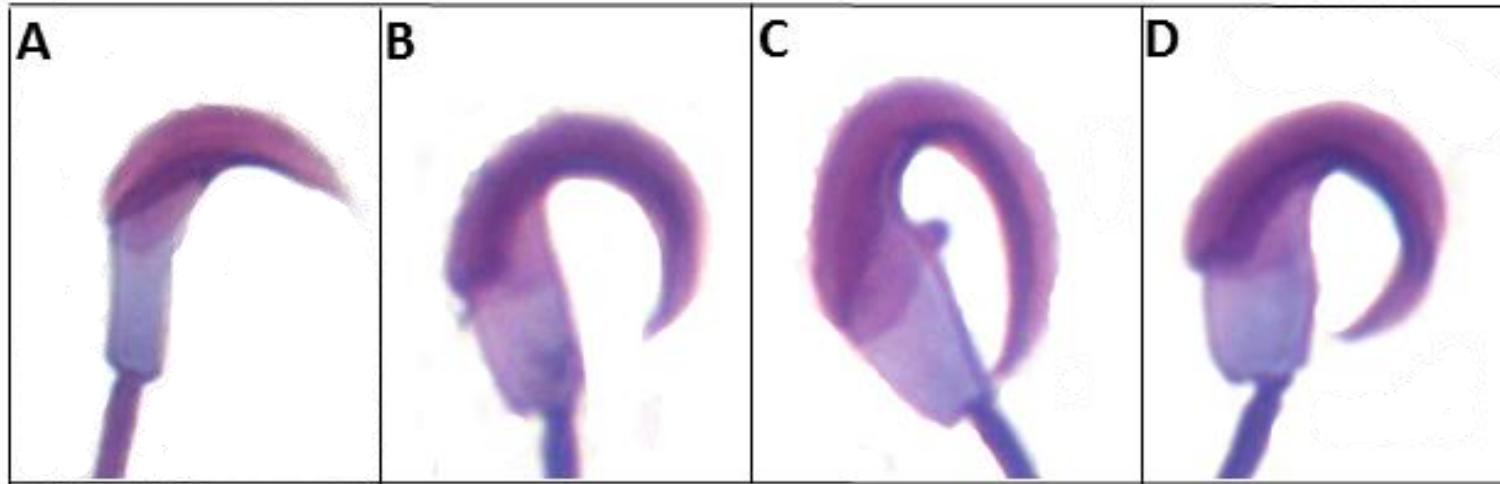
### Linaje Cricetinae

Los espermatozoides de este linaje tienen un gancho en posición rostral muy prominente que confiere a la cabeza la asimetría típica de roedores (Figura 27). La inserción del flagelo está desplazada respecto al eje principal de la cabeza, a excepción de *Mesocricetus auratus*, cuyo flagelo se encuentra insertado en posición central. Las cabezas tienen el mismo ancho desde su región basal hasta la posición apical donde se inserta el gancho. *Mesocricetus auratus* posee la cabeza más estrecha de las cuatro especies, mientras que los tres *Phodopus* tienen un ancho de cabeza similar. *Phodopus roborovskii* es la especie cuyo punto de inflexión en la zona ventral de la cabeza es más pronunciado (similar al de arvicólidos). Esta especie también es la que presenta un gancho más largo, el cual se extiende por todo el área ventral hasta la zona de inserción del flagelo, en contraste con *Mesocricetus auratus*, cuyo flagelo es más corto.

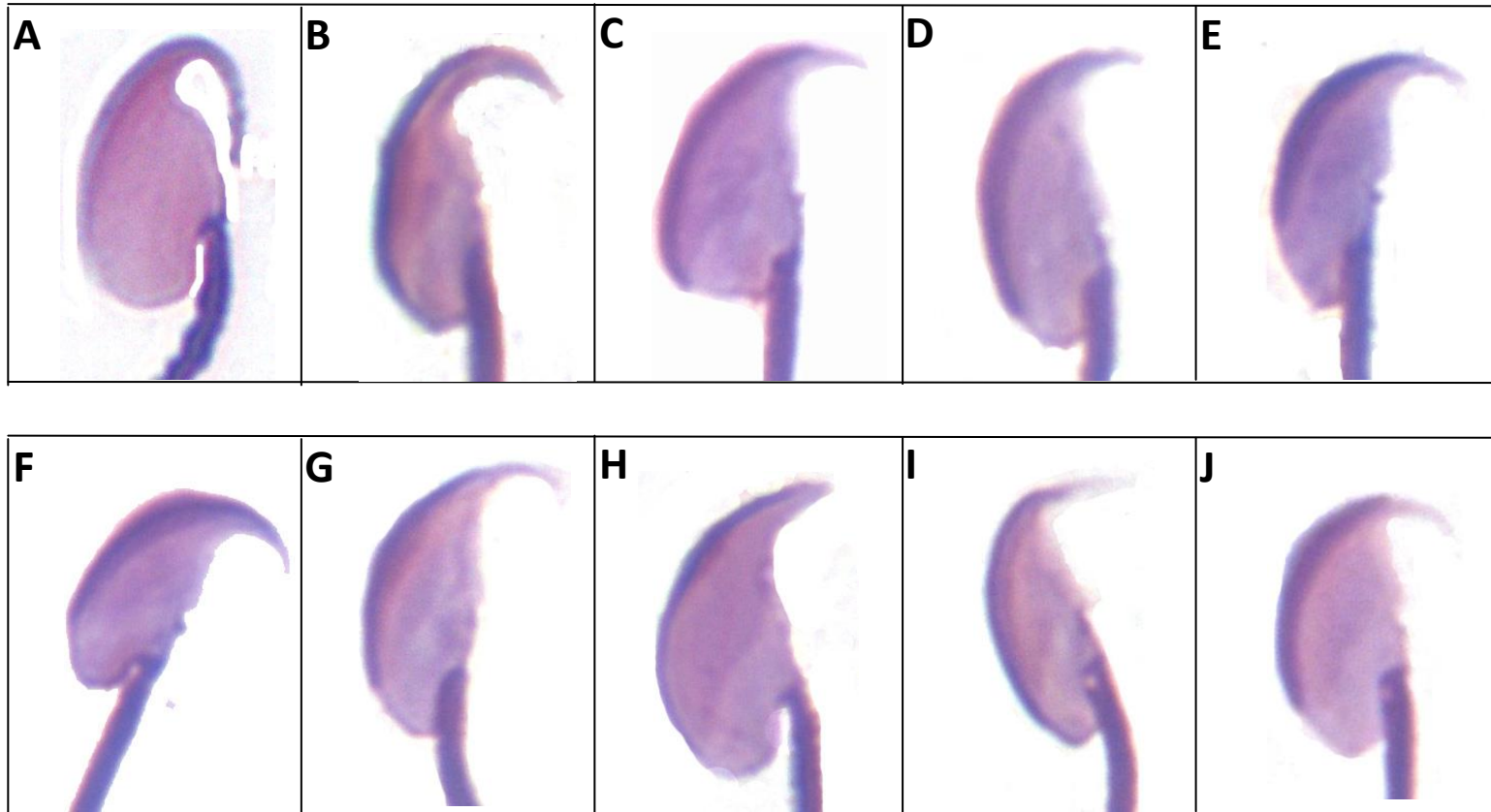
### Linaje Murinae

En general los espermatozoides de este linaje tienen cabezas asimétricas y son anchas en la zona dorso-basal (Figura 28). Desde allí se van estrechando hasta la región apical, donde se localiza el gancho en posición rostral. La forma del gancho es afilada y está proyectado hacia delante. Los ganchos de Murinae son más cortos que los observados en Arvicolinae y Cricetinae, con la excepción de *Apodemus sylvaticus* y *Lemniscomys barbarus* cuyos ganchos recuerdan más a los de arvicólidos. Al igual que en los otros linajes, la inserción del flagelo está desplazada respecto al eje central.





**Figura 27.** Morfología de la cabeza en espermatozoides de las especies pertenecientes al linaje Cricetinae: (A), *Mesocricetus auratus*; (B), *Phodopus campbelli*; (C), *Phodopus rovorovskii*; (D), *Phodopus sungorus*. Todas las imágenes fueron tomadas a un aumento de 1000X.



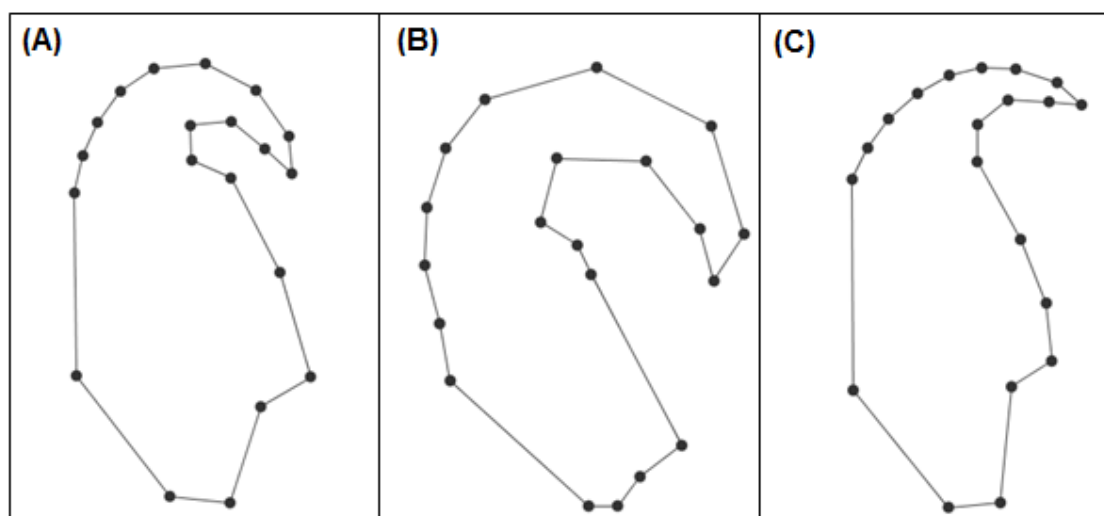
**Figura 28.** Morfología de la cabeza en espermatozoides de las especies pertenecientes al linaje Murinae: (A), *Apodemus sylvaticus*; (B), *Lemniscomys barbarus*; (C), *Mus caroli*; (D), *Mus castaneus*; (E), *Mus domesticus*; (F), *Mus macedonicus*; (G), *Mus musculus*; (H), *Mus pahari*; (I), *Mus spicilegus*; (J), *Mus spretus*. Todas las imágenes fueron tomadas a un aumento de 1000X.

### Variaciones morfológicas en la cabeza

La matriz de distancias Procrustes entre las configuraciones de *landmarks* de los tres linajes indicó que las cabezas de Arvicolinae y Murinae son más similares entre sí, mientras que la morfología más diferente se encuentra en Cricetinae (Tabla 23).

**Tabla 23.** Matriz de distancias Procrustes teniendo en cuenta todas las configuraciones de *landmarks* completas pertenecientes a las especies de la muestra agrupadas por linajes. Todos los valores son significativos ( $P < 0,05$ ) para el test de permutación.

	Arvicolinae	Cricetinae
Cricetinae	0,40	
Murinae	0,24	0,46



**Figura 29.** Configuraciones consenso para la forma de la cabeza en los tres linajes de roedores muroideos: (A), Arvicolinae; (B), Cricetinae; (C), Murinae.

Los cambios morfológicos de las configuraciones consenso para cada linaje (Figura 29), indican que la zona de inserción del flagelo es similar en los tres linajes. La morfología de la región acrosomal dorsal también se mantiene entre las tres configuraciones, mientras que las mayores variaciones se registran en la región basal, en la morfología del gancho y a lo largo de la región ventral.

**Variaciones en la forma del cuerpo principal de la cabeza**

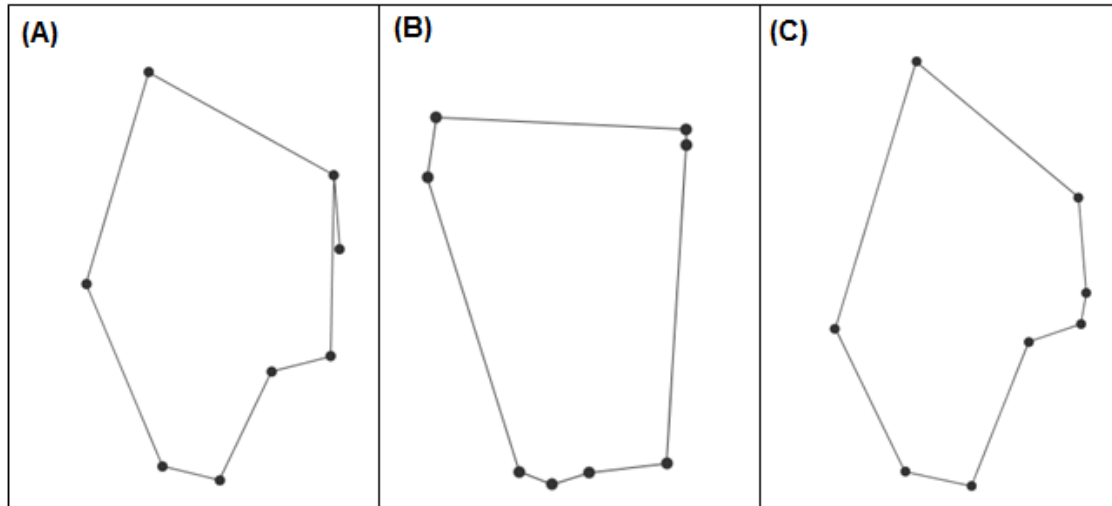
La distancia Procrustes más pequeña se registró entre Arvicolinae y Murinae (Tabla 24), indicando que hay más similitud entre estos linajes. Las configuraciones de Cricetinae y Murinae están separadas por la mayor distancia, siendo los linajes cuya forma del cuerpo principal de la cabeza es más distinta.

**Tabla 24.** Matriz de distancias Procrustes para las configuraciones de *landmarks* que definen la forma del cuerpo principal de la cabeza, excluyendo el gancho, en los tres linajes. Todos los valores son significativos ( $P < 0,05$ ) para el test de permutación.

	Arvicolinae	Cricetinae
Cricetinae	0,39	
Murinae	0,23	0,50

La representación gráfica de las configuraciones de *landmarks* (Figura 30) ilustra como el cuerpo principal de la cabeza (sin considerar el gancho) de Arvicolinae y Murinae tienen morfologías más similares. La similitud se encuentra en la curvatura de la región basal, que confiere a Arvicolinae y Murinae una mayor asimetría que la observada en Cricetinae. La cabeza de las especies de Cricetinae es prácticamente simétrica cuando no se tiene en cuenta el gancho, a pesar de poseer una inserción del flagelo que en una especie es central (es decir, coincidente con el eje de la cabeza),

mientras que en las otras no lo es. Además, la forma consenso de Murinae, muestra una ligera curvatura en la zona basal de su región ventral; este rasgo le diferencia de los otros dos linajes.



**Figura 30.** Configuraciones consenso para el cuerpo principal de la cabeza en tres linajes de roedores muroideos: (A), Arvicolinae; (B), Cricetinae; (C), Murinae.

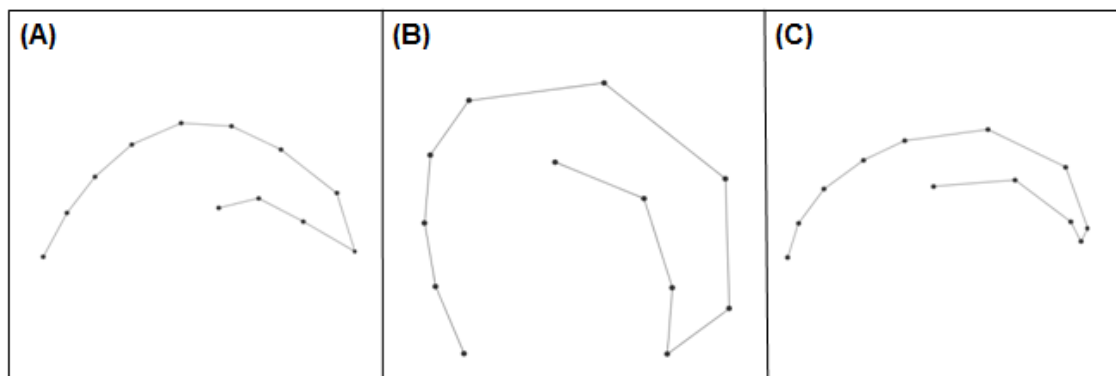
### **Variaciones en la forma del gancho**

La distancia Procrustes menor entre las configuraciones que definen el gancho se da entre Arvicolinae y Cricetinae (Tabla 25), lo que indica que, de los linajes analizados, éstos son los que tienen una morfología más similar. Los linajes cuyo diseño del gancho difiere más son Cricetinae y Murinae (Tabla 25).

**Tabla 25.** Matriz de distancias Procrustes para las configuraciones de *landmarks* que definen la forma del gancho. Todos los valores son significativos ( $P < 0,05$ ) para el test de permutación.

	Arvicolinae	Cricetinae
Cricetinae	0,18	
Murinae	0,23	0,37

Tal como ilustra la Figura 31, el gancho de Murinae es menos prominente que en los otros dos linajes, siendo más corto y su forma más afilada. Arvicolinae y Cricetinae tienen un diseño de gancho similar, aunque en el caso de Cricetinae se extiende por toda la región ventral, mientras que en Arvicolinae es más corto.



**Figura 31.** Configuraciones consenso para la forma del gancho en tres linajes de roedores muroideos: (A), Arvicolinae; (B), Cricetinae; (C), Murinae.

## Discusión

La descripción y cuantificación de las diferencias en forma de la cabeza espermática, en tres linajes de roedores examinados en este trabajo, ha revelado que en estos linajes de muroideos se ha dado la evolución de diferencias morfológicas considerables. Los análisis de morfometría geométrica han mostrado que los más similares en cuanto a forma general de la cabeza y forma del cuerpo principal son los linajes Arvicolinae y Murinae. Sin embargo cuando se analiza el gancho como una estructura separada del resto del conjunto, se ha evidenciado que Arvicolinae y Cricetinae tienen un diseño más similar.

Más allá de sus implicaciones en el proceso de fecundación, la morfología espermática se ha empleado como carácter taxonómico para determinar relaciones filogenéticas (Jamieson, 1987; Breed, 1995). Por ello, llama la atención en estos resultados que según se tenga en cuenta la forma total de la cabeza, y el cuerpo principal de la misma, las similitudes de dos linajes (Arvicolinae y Murinae) en relación a un tercero (Cricetinae) no se corresponden con la habitual relación reconocida para ellos. Así, tanto Arvicolinae como Cricetinae se incluyen la familia Cricetidae, mientras que Murinae es parte de la familia Muridae (Fabre *et al.*, 2012). Por otra parte, las similitudes en la forma del gancho sí se corresponden con lo que cabría esperar según las relaciones filogenéticas entre estos linajes. Estos resultados, por tanto, sugieren que deben reexaminarse algunos de los planteamientos realizados sobre el uso de la forma espermática en clasificación de especies.

Un estudio realizado en insectos evidenció que todos los componentes del esperma son susceptibles de sufrir variación, resultando en diferencias morfológicas muy acusadas entre células de la misma especie (Alberti, 1990). Los linajes analizados en este estudio presentan claras diferencias en cuanto a la forma general de la cabeza y

en las estructuras que la componen. Además, se ha observado que la variación morfológica, tanto a nivel de especie como de linaje, está concentrada en tres áreas: (1) la región basal de la cabeza, (2) La porción rostral del gancho y (3) la zona ventral de la cabeza. Sin embargo, los resultados demuestran que tanto la inserción del flagelo como la forma curvada de la región acrosomal dorsal, están conservadas en cada uno de los linajes. Esto sugiere que ambas características tienen una función biológica, que podría estar asociada a distintos diseños de cabeza que tienen una característica común: la asimetría, cuya importancia para la función del espermatozoide será discutida en capítulos posteriores.

En relación al cuerpo principal de la cabeza caben destacar tres aspectos: (1) tiene una zona de inserción para el flagelo, (2) soporta el acrosoma y (3) alberga al núcleo. Estudios pioneros postulaban que la forma del núcleo estaba determinada por agregaciones de cromatina específicas de especie (Fawcett *et al.*, 1971). Los cambios conformacionales que experimenta el núcleo durante la última etapa de la espermatogénesis también se han atribuido a la formación del acrosoma y a la orientación de los túbulos de la *manchette* (Russell *et al.*, 1991; Meistrich, 1993). En trabajos posteriores se evidenció que la forma del núcleo puede estar determinada en buena parte por el proceso en el que las histonas son reemplazadas por protaminas durante la espermiogénesis, la fase final de diferenciación de los espermatozoides (Brewer, 1999). Las protaminas son las proteínas nucleares más abundantes en el espermatozoide y su función consiste en mantener la compactación del ADN (Oliva, 2006) En mamíferos se han descrito dos tipos de esta proteína: protamina 1 presente en todos los vertebrados y protamina 2, que sólo se da en roedores, ungulados y primates (Corzett *et al.*, 2002). En un estudio reciente realizado en especies del género *Mus* se ha observado cómo la abundancia relativa de las protaminas 1 y 2 está relacionada con



distintas morfologías de cabeza espermática (Lüke *et al.*, 2014b), poniendo en evidencia que las protaminas pueden modelar de alguna manera la forma del núcleo y éste, a su vez, determina en gran parte la forma final de la cabeza.

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que, en lo que a la forma del gancho se refiere, existen diferencias morfológicas importantes entre especies muy emparentadas. El gancho es una estructura característica de roedores muroideos (Friend, 1936) cuyo significado biológico se desconoce. La controversia alrededor de esta estructura supera con creces el debate generado alrededor de cualquier otra en espermatología. Tanto su función biológica como los mecanismos evolutivos y las fuerzas selectivas que motivaron su aparición serán discutidos en el siguiente capítulo.

## CAPÍTULO 7

### **LA COMPETENCIA ESPERMÁTICA Y LA EVOLUCIÓN DE LA FORMA DE LA CABEZA DE LOS ESPERMATOZOIDES EN ROEDORES - LA CURVATURA Y LA LONGITUD DEL GANCHO INFLUYEN SOBRE LA VELOCIDAD ESPERMÁTICA**

#### **Introducción**

En el reino animal se ha descrito una gran variedad de morfologías espermáticas (Roldan *et al.*, 1992; Afzelius, 1995). La mayoría de los mamíferos euterios poseen espermatozoides con morfologías simples, sus espermatozoides son flagelados, con cabezas redondeadas o en forma de pala. Los roedores difieren de este diseño básico y presentan cabezas cuya complejidad es mucho mayor. Las cabezas de los espermatozoides en roedores tienen un amplio rango de variación morfológico que oscila desde cabezas simples y redondeadas, como las del resto de euterios, hasta células espermáticas que poseen una o varias prolongaciones apicales conocidas como ganchos (Breed, 1995; 1997; 2004; 2005).

El gancho es un apéndice situado en posición apical-rostral que contiene parte del gránulo acrosómico y, en algunas especies, incluso puede albergar una extensión del núcleo celular. Esta estructura solo ha sido descrita en espermatozoides de roedores miomorfos. En estudios desarrollados a nivel fisiológico y celular, se le han atribuido a estos apéndices con forma de gancho varias funciones pero su misión durante el proceso de fecundación continúa siendo desconocida. Una de las hipótesis postula que el gancho facilita la progresión de los espermatozoides en su avance hacia el óvulo adhiriéndose a las paredes del tracto reproductor femenino, especialmente a los epitelios del istmo oviductal (Suarez, 1987; Smith y Yanagimachi, 1990). También puede estar implicado

en la penetración de las cubiertas del óvulo (Flaherty *et al.*, 1983). La aparición del gancho en espermatozoides de miomorfos puede ser una consecuencia de la competición espermática y puede tener un valor adaptativo. Se ha observado que los espermatozoides de un mismo individuo son capaces de unirse mediante sus ganchos formando trenes, que a su vez son capaces de nadar más deprisa que una célula individual, especialmente en un medio viscoso. Por este motivo, la formación de trenes conferiría una ventaja en contextos de competición espermática (Moore *et al.*, 2002). Esta tendencia a cooperar entre espermatozoides no es un fenómeno generalizado entre los roedores, aunque se ha descrito en varias especies: *Apodemus sylvaticus* (Moore *et al.*, 2002), *Rattus norvegicus* (Immler *et al.*, 2007) y *Peromyscus maniculatus* (Fisher y Hoekstra, 2010). Este patrón no ha sido observado en otras especies de roedores como *Mus domesticus* (Firman y Simmons, 2009) y a día de hoy el fenómeno de cooperación en condiciones de competición espermática parece más bien algo anecdótico.

Los intentos por dilucidar la función biológica del gancho han arrojado resultados contradictorios. Se ha propuesto que tanto la formación de agregados celulares, como la longitud y la curvatura del gancho, son los principales mecanismos adaptativos a la competición espermática en roedores (Immler *et al.*, 2007). En estudios posteriores, también desarrollados en roedores muroideos, se presentaron resultados adicionales que parecen confirmar aquellos del estudio precedente, y estableciéndose una correlación entre la curvatura del gancho y la esperanza de vida del esperma (Sanderá *et al.*, 2011; 2013). Por otra parte, los estudios realizados en líneas de *Mus domesticus* criados de forma experimental bajo distintos niveles de competición espermática no encontraron ninguna evidencia de cambio en la morfología del gancho como respuesta a la competición espermática (Firman y Simmons, 2009; Firman *et al.*, 2011).

La morfología de la cabeza tiene un efecto importante sobre la velocidad de natación del espermatozoide (Malo *et al.*, 2005). Las diferencias en diseño y velocidad de los espermatozoides son muy marcadas entre especies (Tourmente *et al.*, 2011a), pero estas diferencias son menos apreciables dentro de una misma especie o incluso a nivel intra-individual. Estudios intra-específicos desarrollados en mamíferos han revelado que los espermatozoides con cabezas más elongadas son capaces de nadar más deprisa que los que poseen una morfología más redondeada (Malo *et al.*, 2006). Esta tendencia se ha observado también en las subpoblaciones de espermatozoides presentes dentro de un mismo eyaculado, donde los individuos con mayores tasas de fertilidad presentan gametos con altas velocidades lineales y cuyas cabezas tienen una morfología elongada (Ramón *et al.*, 2013). Aunque al gancho se le han atribuido muchas funciones asociadas a maximizar el éxito reproductor, se desconoce si su diseño tiene una implicación directa sobre la velocidad de natación del espermatozoide. Como ya se ha mencionado en el capítulo 3, los parámetros calculados a partir de fórmulas empleadas en análisis de morfología asistidos por ordenador (ASMA) como, por ejemplo, la elongación, no son suficientes para capturar toda la variación asociada a forma presente en las células espermáticas de roedores. De este modo, el análisis de los espermatozoides mediante morfometría geométrica otorga un poder de resolución mayor, capaz de cuantificar estructuras como el gancho, que con otros métodos de análisis no son tenidas en cuenta.

El objetivo de este trabajo fue examinar si la longitud y curvatura del gancho de la cabeza espermática covarían con el nivel de competición espermática. Además, se examinó si las diferencias en el fenotipo del gancho tienen algún impacto sobre la velocidad de natación. En estudios realizados por otros autores, se comparó la morfología del gancho en diferentes especies del género *Apodemus* (Sandera *et al.*, 2011; 2013), o en un grupo de roedores muroideos procedentes en su mayoría de

Australia, África y el sudeste asiático (Immler *et al.*, 2007). En estos estudios previos, se realizó el estudio de la forma empleando el análisis de Fourier, el cual tiene una menor resolución que la morfometría geométrica (Immler *et al.*, 2007). En otros estudios, el método de morfometría geométrica se empleó sin utilizar *semilandmarks* lo cual puede conducir a resultados imprecisos (Firman y Simmons, 2009).

En este trabajo se examinó un rango de especies mayor que en los anteriores, incluyendo roedores muroideos de los linajes de cricetinos y arvicolinos, en un intento de abarcar un mayor grado de variación morfológica con respecto a la forma del gancho. También se examinó si la variación a nivel intra-individuo en la longitud y curvatura del gancho tiene alguna relación con el nivel de competición espermática.

## **Material y métodos**

### **Obtención de las muestras**

Para este trabajo se utilizaron 5 machos adultos de cada una de las siguientes especies:

*Apodemus sylvaticus*, *Arvicola sapidus*, *Arvicola terrestris*, *Microtus arvalis*, *Chionomys nivalis*, *Myodes glareolus*, *Lemniscomys barbarus*, *Mus pahari*, *Mus famulus*, *Mus macedonicus*, *Mus spicilegus*, *Mus domesticus*, *Mus bactrianus*, *Mus castaneus*, *Mus musculus*, *Mus spretus*, *Mus caroli*, *Mus cookii*, *Mesocricetus auratus*, *Phodopus campbelli*, *Phodopus roborovskii*, y *Phodopus sungorus*.

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Los machos fueron pesados y a continuación se extrajeron los testículos y se pesaron. Tras la disección, ambos epidídimos se depositaron en una placa de Petri con 1-3 ml de medio Tyrode modificado con HEPES precalentado a 37°C. Se realizaron incisiones en los epidídimos para permitir la salida de los espermatozoides al medio para lo cual se mantuvieron en incubación durante 5 minutos. A partir de la suspensión espermática obtenida, se realizaron frotis que se fijaron con formaldehído al 4% en tampón fosfato y

se tiñeron con Giemsa. Los espermatozoides fueron fotografiados a un aumento de 1000X en campo claro. El equipo utilizado consistió en una cámara digital conectada a un microscopio.

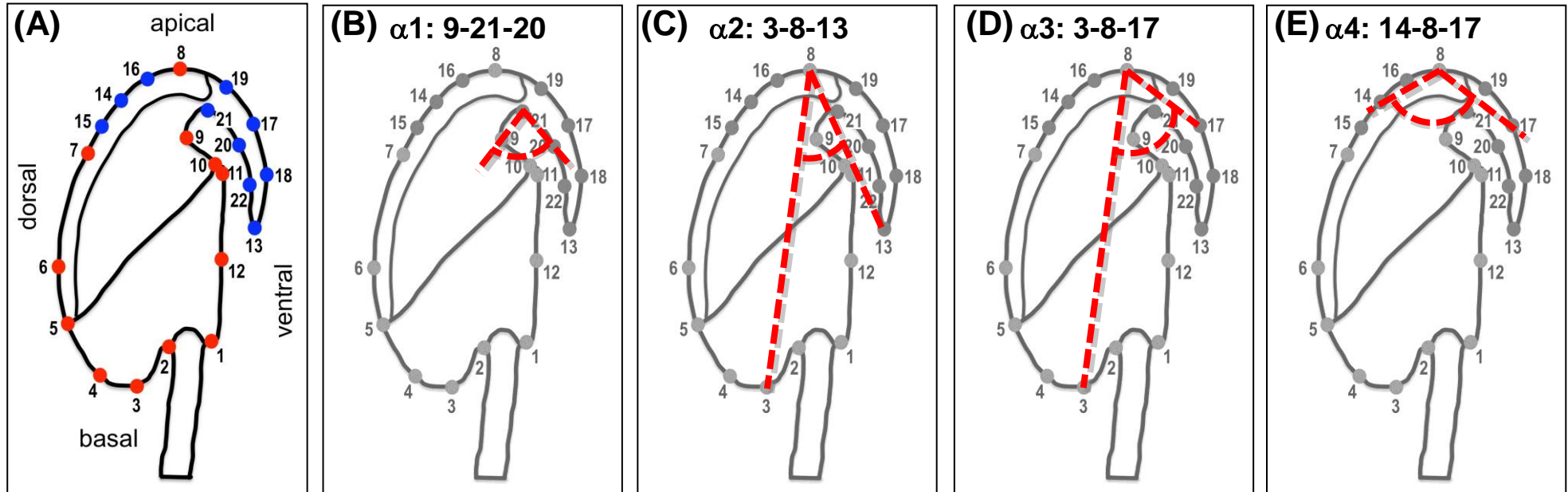
Se utilizó una alícuota de la suspensión espermática original para evaluar los siguientes parámetros de velocidad: velocidad curvilínea (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ); velocidad rectilínea (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ) y velocidad promedio de la trayectoria (VAP;  $\mu\text{m/s}$ ). El método y equipo empleado fue el que se describe en Material y Métodos Generales. No fue posible conseguir datos de velocidad para las especies *Arvicola sapidus*, *Arvicola terrestris*, *Mus famulus*, *Mus bactrianus* y *Mus cookii*.

#### **Análisis morfológico del gancho mediante morfometría geométrica**

Se fotografiaron 25 células por individuo y se digitalizaron siguiendo el proceso descrito en el capítulo 5 (Figura 16), con la ayuda del software TPS dig 2 (James Rohlf, Departamento de Ecología y Evolución, Universidad de Stony Brook, Nueva York, Estados Unidos). Una vez obtenidas todas las configuraciones de *landmarks* y se sometieron a un proceso de superposición de Procrustes mediante el software Relwarp (James Rohlf, Departamento de Ecología y Evolución, Universidad de Stony Brook, Nueva York, Estados Unidos).

La curvatura del gancho se cuantificó teniendo en cuenta 4 ángulos diferentes ilustrados en la Figura 32. El ángulo denominado Alfa 1 ( $\alpha_1$ ) se definió por los *landmarks* 9, 21 y 20, y se corresponde con el ángulo más interno que forma el gancho en su porción basal. Alfa 2 ( $\alpha_2$ ) está formado por los *landmarks* 3, 8 y 13. Es un ángulo similar, aunque no idéntico, al que midieron Immler *et al.* (2007) y Sandera *et al.* (2011) en sus respectivos trabajos. En ellos se utilizó el eje principal de la cabeza para definir dos puntos del ángulo. A diferencia de los estudios anteriores (donde el tercer punto lo

define la tangente desde el extremo apical hasta la punta del gancho) en el presente trabajo ese tercer punto coincide con la punta del gancho. Además, en estudios previos el ángulo medido fue el externo, mientras que en el presente trabajo se tomó el ángulo interno. Alfa 3 ( $\alpha_3$ ) está definido por los *landmarks* 3, 8 y 17 y se corresponde con el ángulo entre el eje principal de la cabeza y la región apical del gancho; el *semilandmark* 17 está situado a mitad de camino entre la punta del gancho y la región apical de la cabeza. Alfa 4 ( $\alpha_4$ ) es el ángulo más externo y mide la curvatura del gancho entre los *landmarks* 14, 8 y 17.



**Figura 32.** Definición de los 4 ángulos de curvatura del gancho utilizados en este estudio. Cada ángulo está definido por tres puntos que corresponden a *landmarks*. (A) Definición de *landmarks* (rojo) y *semilandmarks* (azul); (B-E). *Landmarks* que forman los ángulos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ .



La longitud del gancho se midió como la distancia lineal entre el extremo apical de la cabeza (*landmark* 8) y la punta del gancho (*landmark* 13). Las medidas se tomaron mediante el software Morpheus *et al.* (Dennis Slice, Universidad de Wake Forest, Winston-Salem, Carolina del Norte, Estados Unidos). También se calculó el coeficiente de variación (CV) de los ángulos de curvatura del gancho y de su longitud. La fórmula empleada fue la siguiente:  $CV = (\text{desviación estándar} \times 100) / \text{media}$ . Tanto la longitud del gancho como su ángulo de curvatura se transformaron mediante logaritmos para lograr distribuciones normales.

### **Análisis estadístico**

La relación entre la curvatura del gancho y el índice de competición espermática se evaluó mediante una regresión múltiple (mínimos cuadrados generalizados) que lleva implementada una herramienta de control filogenético (ver Materiales y Métodos Generales, sección PGLS). Los ángulos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ , la longitud del gancho y sus respectivos coeficientes de variación se tomaron como variables dependientes. La masa testicular y masa corporal se utilizaron como variables predictoras del nivel de competición espermática. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Caper v 0.5 (Orme *et al.*, 2012) (R Foundation for Statistical Computing).

Para determinar si existe covariación entre la forma y la longitud del gancho se llevó a cabo un análisis de mínimos cuadrados parciales (ver Material y Métodos capítulo 8). El software empleado fue MorfoJ v 1.05f (Klinderberg, 2011).

Para explorar el grado de asociación entre la longitud y curvatura del gancho con la velocidad de natación, se realizaron regresiones simples entre las variables de velocidad, longitud del gancho y  $\alpha_3$ , teniendo en cuenta las relaciones filogenéticas entre las especies. Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con las variables VCL, VSL y VAP. La variable resultante se denominó velocidad espermática global (overall sperm velocity, OSV) y se también se regresionó frente a longitud del gancho y  $\alpha_3$ .

## **Resultados**

### **Curvatura del gancho**

Los valores medios ( $\pm$  error estándar de la media, ESM) para cada uno de los ángulos fueron:  $\alpha_1$ :  $87,75^\circ$  ( $\pm 6,82$ );  $\alpha_2$ :  $60,45^\circ$  ( $\pm 4,79$ );  $\alpha_3$ :  $83,79^\circ$  ( $\pm 3,01$ ) y  $\alpha_4$ :  $138,95^\circ$  ( $\pm 3,57$ ). Los valores de cada uno de los ángulos por especie se resumen en la Tabla 26.

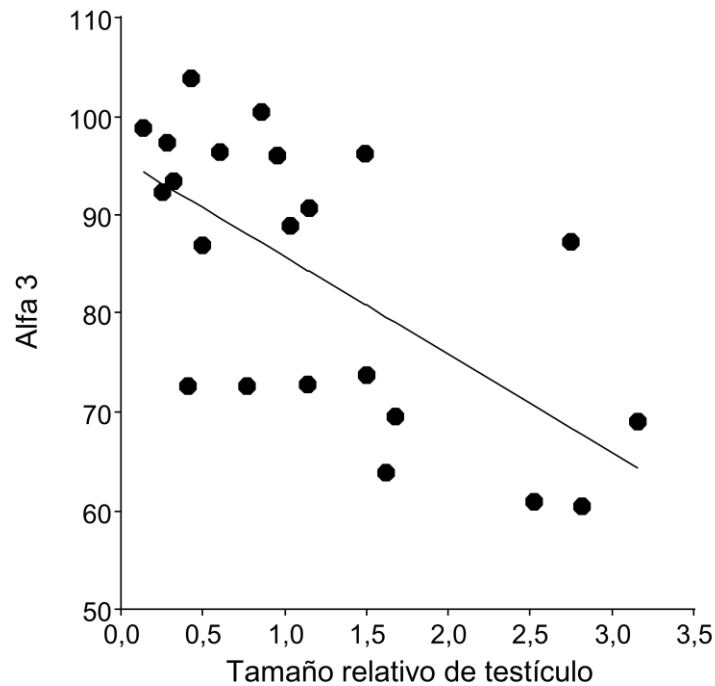
Se midieron 4 ángulos para evaluar la curvatura del gancho en función del significado biológico y evolutivo de cada uno de ellos. El ángulo  $\alpha_3$  (*landmarks* 3, 8 y 17) mostró una correlación negativa y estadísticamente significativa con el tamaño relativo de los testículos (Figura 33) empleado como indicador del nivel de competencia espermática. No se encontró ninguna relación significativa entre el resto de los ángulos evaluados y el tamaño relativo de los testículos (Tabla 27). Respecto a los resultados de coeficiente de variación (CV) de los distintos ángulos (Tabla 28), ninguno resultó estar correlacionado con el nivel de competencia espermática.

**Tabla 26.** Valores por especie de los ángulos medidos en este estudio. Los *landmarks* que definen cada ángulo están indicados entre paréntesis;  $\alpha_1$  (9-21-20),  $\alpha_2$  (3-8-13),  $\alpha_3$  (3-8-17) y  $\alpha_4$  (14-8-17). La longitud del gancho se midió como la distancia lineal entre los *landmarks* 8 y 13. Todos los valores de los ángulos están expresados en grados, excepto la longitud del gancho ( $\mu\text{m}$ ).

<b>Especie</b>	<b><math>\alpha_1</math></b>	<b><math>\alpha_2</math></b>	<b><math>\alpha_3</math></b>	<b><math>\alpha_4</math></b>	<b>longitud gancho</b>
<i>Apodemus sylvaticus</i>	105,09	39,18	60,88	127,98	4,38
<i>Arvicola sapidus</i>	89,98	49,14	72,77	127,80	2,87
<i>Arvicola terrestris</i>	91,78	24,99	72,67	118,61	2,50
<i>Chionomys nivalis</i>	75,52	51,07	63,75	121,71	3,13
<i>Lemnicomys barbarus</i>	125,84	72,95	90,58	143,21	3,11
<i>Mesocricetus auratus</i>	119,36	65,64	87,24	134,47	5,90
<i>Microtus arvalis</i>	68,10	39,09	72,66	125,66	3,57
<i>Mus bactrianus</i>	32,00	63,05	86,98	145,99	3,32
<i>Mus caroli</i>	117,99	88,10	100,34	157,81	2,82
<i>Mus castaneus</i>	113,68	84,67	98,79	158,38	2,66
<i>Mus cookii</i>	29,80	78,85	95,96	151,85	3,24
<i>Mus domesticus</i>	115,31	81,79	96,38	156,41	2,78
<i>Mus famulus</i>	25,52	73,29	92,20	153,45	2,62
<i>Mus macedonicus</i>	109,87	75,42	93,34	153,30	3,27
<i>Mus musculus</i>	118,54	87,06	103,74	157,49	2,93
<i>Mus pahari</i>	120,89	83,61	97,33	151,97	3,18
<i>Mus spicilegus</i>	110,13	80,02	96,23	150,27	2,82
<i>Mus spretus</i>	86,88	69,85	88,85	152,71	2,79
<i>Myodes glareolus</i>	41,63	42,34	73,74	128,39	3,01
<i>Phodopus campbelli</i>	61,46	27,69	68,96	116,66	6,85
<i>Phodopus roborovskii</i>	90,77	21,66	60,35	102,95	7,83
<i>Phodopus sungorus</i>	80,71	30,48	69,58	119,83	7,35

**Tabla 27.** Regresión múltiple con control filogenético entre la curvatura del gancho en relación a masa corporal y masa testicular. Cada ángulo está definido por tres *landmarks*  $\alpha_1$  (9-21-20),  $\alpha_2$  (3-8-13),  $\alpha_3$  (3-8-17), y  $\alpha_4$  (14-8-17). Los test se realizaron con 19 grados de libertad. Los superíndices en los valores de  $\lambda$  indican el nivel de significación (<sup>†</sup> n.s.; \* $P < 0,05$ ) contra  $\lambda = 0$  (primera posición) y  $\lambda = 1$  (segunda posición). El tamaño del efecto  $r$  se calculó a partir de los valores de  $F$ ; También se dan los valores de los intervalos de confianza al 95% (IC). Los intervalos de confianza que excluyen el 0 indican que hay significación estadística. Los intervalos de confianza y valores  $P$  significativos están resaltados en negrita.

Variable dependiente	Predictor	$R^2$ ajustado	Pendiente	$F$	$P$	Lambda ( $\lambda$ )	Tamaño del efecto ( $r$ )	Intervalo de confianza (IC)
$\alpha_1$	Masa corporal	-0,08	14,05	0,40	0,53	0,00 <sup>†,*</sup>	0,14	(-0,30 - 0,59)
	Masa testicular		1,63	0,006	0,93		0,01	(-0,43 - 0,46)
$\alpha_2$	Masa corporal	0,10	35,71	3,38	0,08	1,00 <sup>*,†</sup>	0,38	(-0,04 - 0,85)
	Masa testicular		-9,95	1,07	0,31		0,23	(-0,21 - 0,68)
$\alpha_3$	Masa corporal	0,21	25,62	2,28	0,14	1,00 <sup>*,†</sup>	0,35	(-0,07 - 0,82)
	Masa testicular		-14,76	6,29	<b>0,02</b>		0,44	<b>(0,03 - 0,93)</b>
$\alpha_4$	Masa corporal	0,17	21,57	2,73	0,11	1,00 <sup>*,†</sup>	0,35	(-0,07 - 0,81)
	Masa testicular		-10,18	3,81	0,06		0,40	(-0,01 - 0,88)



**Figura 33.** Relación entre el ángulo de curvatura del gancho  $\alpha_3$  y en nivel de competición espermática (tamaño relativo de los testículo) en 22 especies de roedores.

### **Longitud del gancho**

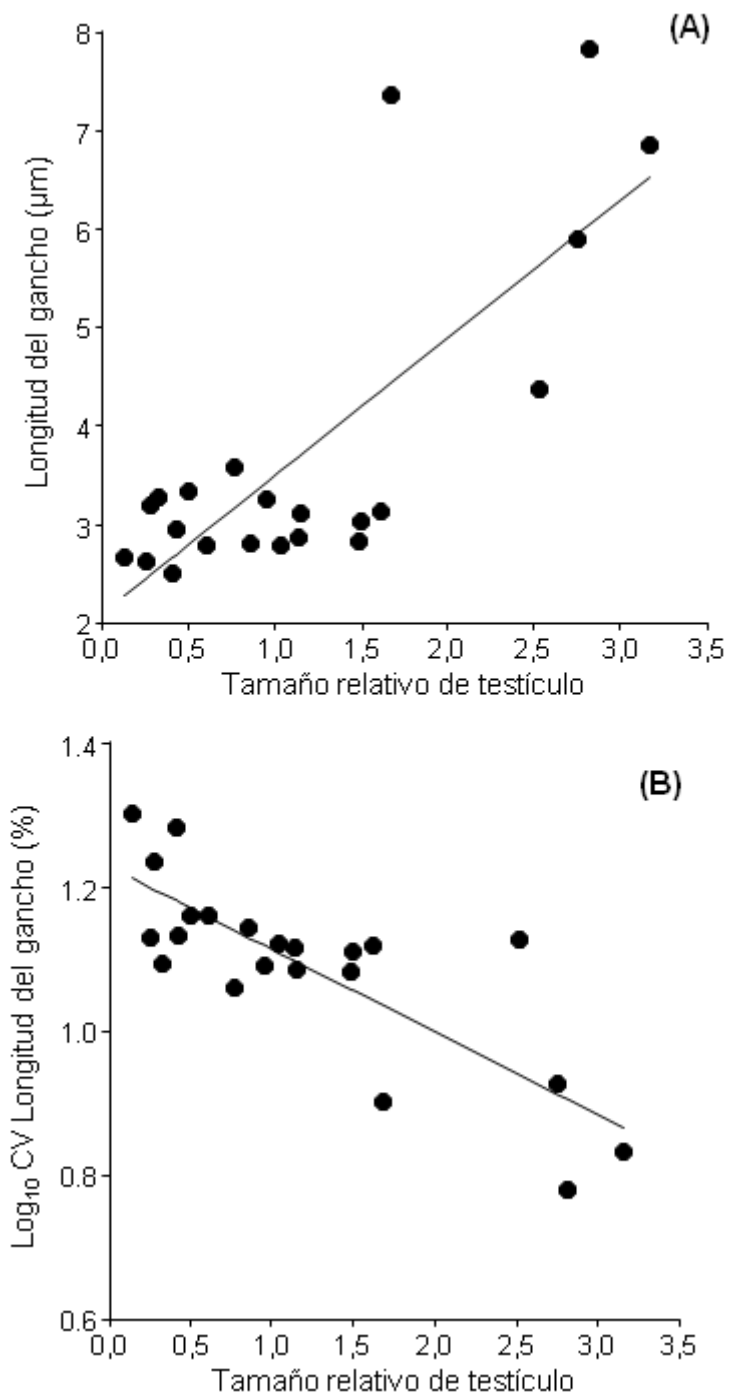
El valor medio ( $\pm$  ESM) de longitud del gancho es de  $3,77 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,34$ ) (Tabla 26). El análisis de regresión múltiple con corrección filogenética reveló que la longitud del gancho y su coeficiente de variación están positivamente correlacionados con el nivel de competición espermática (masa testicular corregida por la masa corporal) (Tabla 29, Figura 34).

**Tabla 28.** Valores de los coeficientes de variación (CV) intra-individuo para los ángulos de curvatura ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ) y para la longitud del gancho. Los valores están expresado en %.

<b>Especies</b>	<b>CV <math>\alpha_1</math></b>	<b>CV <math>\alpha_2</math></b>	<b>CV <math>\alpha_3</math></b>	<b>CV<math>\alpha_4</math></b>	<b>CV longitud gancho</b>
<i>Apodemus sylvaticus</i>	14,56	21,07	14,25	7,17	13,45
<i>Arvicola sapidus</i>	14,26	15,45	11,80	9,52	13,05
<i>Arvicola terrestris</i>	13,26	34,57	17,42	7,15	19,21
<i>Chionomys nivalis</i>	14,82	13,89	10,80	7,77	13,18
<i>Lemniscomys barbarus</i>	7,35	10,84	8,92	5,99	12,22
<i>Mesocricetus auratus</i>	6,93	14,20	6,57	5,15	8,42
<i>Microtus arvalis</i>	18,13	21,34	10,95	6,94	11,52
<i>Mus bactrianus</i>	24,58	24,60	12,70	5,70	14,53
<i>Mus caroli</i>	10,45	9,91	7,73	5,13	14,42
<i>Mus castaneus</i>	9,78	7,72	6,91	5,42	13,53
<i>Mus cookii</i>	26,49	11,46	8,76	6,29	13,95
<i>Mus domesticus</i>	10,67	11,59	8,26	5,64	12,38
<i>Mus famulus</i>	25,29	14,62	12,71	7,16	20,08
<i>Mus macedonicus</i>	10,49	11,05	6,69	4,94	12,29
<i>Mus musculus</i>	8,03	9,82	7,02	5,76	13,57
<i>Mus pahari</i>	8,23	11,04	9,37	6,40	17,19
<i>Mus spicilegus</i>	10,09	9,11	7,39	5,52	12,09
<i>Mus spretus</i>	10,57	7,67	6,72	5,80	13,27
<i>Myodes glareolus</i>	24,43	21,00	11,55	6,49	12,91
<i>Phodopus campbelli</i>	13,06	28,88	9,94	4,59	6,81
<i>Phodopus roborovskii</i>	13,13	23,02	13,33	6,40	6,03
<i>Phodopus sungorus</i>	15,14	28,39	9,96	4,59	7,98

**Tabla 29.** Regresión múltiple con control filogenético entre la longitud del gancho y su coeficiente de variación en relación a masa corporal y masa testicular. Los test se realizaron con 19 grados de libertad. Los superíndices sobre  $\lambda$  indican el nivel de significación ( $^\dagger$  n.s.;  $*P < 0,05$ ) contra  $\lambda=0$  (primera posición) y  $\lambda=1$  (segunda posición). El tamaño del efecto  $r$  se calculó a partir de los valores de  $F$ ; También se dan los valores de los intervalos de confianza al 95% (IC). Los intervalos de confianza que excluyen el 0 indican que hay significación estadística. Los intervalos de confianza y valores  $P$  significativos están resaltados en negrita.

Variable dependiente	Predictor	$R^2$ ajustado	pendiente	$F$	$P$	Lambda ( $\lambda$ )	Tamaño del efecto ( $r$ )	Efecto de tamaño (IC)
log longitud gancho	Masa corporal	0,11	-0,08	0,004	0,94	1,00 <sup>*,†</sup>	0,01	(-0,43 - 0,46)
	Masa testicular		0,12	5,27	<b>0,03</b>		0,46	<b>(0,05 - 0,95)</b>
CV longitud gancho	Masa corporal	0,43	4,67	0,003	0,95	0,85 <sup>†,†</sup>	0,01	(-0,43 - 0,46)
	Masa testicular		-5,98	20,16	<b>0,0002</b>		0,71	<b>(0,45 - 1,35)</b>

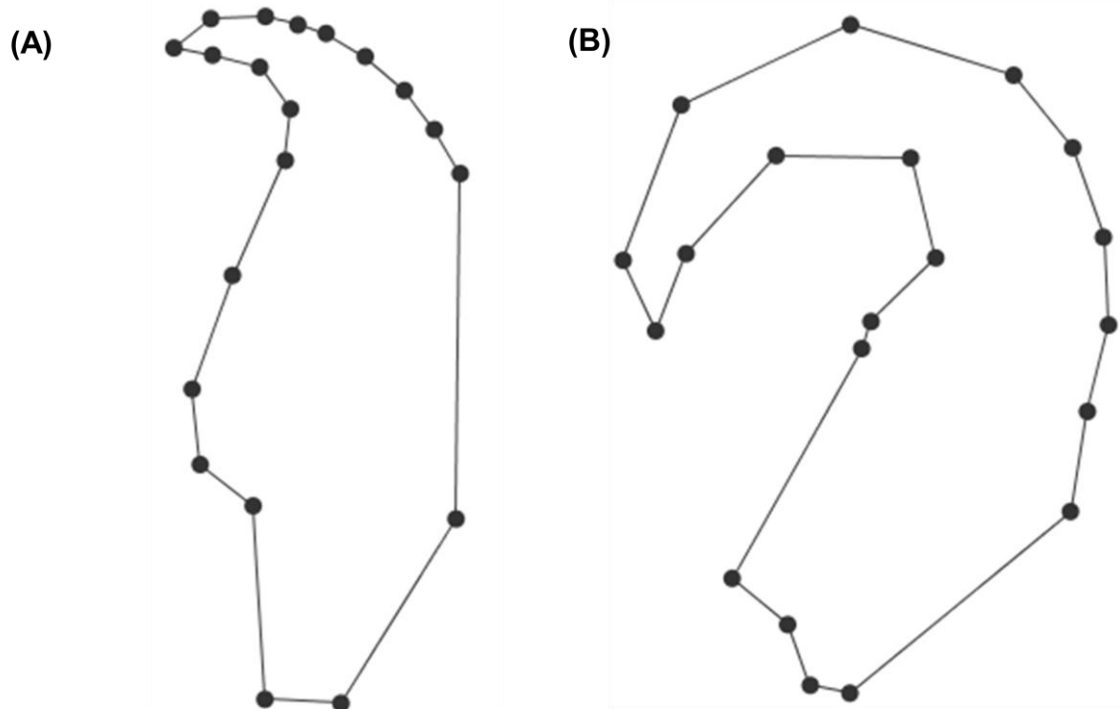


**Figura 34.** Relación entre longitud del gancho y nivel de competición espermática (A). Relación entre el coeficiente de variación de la longitud del gancho y el nivel de competición espermática (B).



### Relación entre la longitud y forma del gancho

La regresión de mínimos cuadrados parciales mostró que existe una covariación entre la forma del gancho y su longitud (coeficiente RV = 0,47; correlación entre ejes = 0,78). La variación morfológica del gancho asociada a su longitud se muestra en la Figura 35.



**Figura 35.** Covariación entre la morfología del gancho y su longitud para A) espermatozoides con ganchos cortos y B) espermatozoides con ganchos largos.

La relación entre la longitud del gancho y  $\alpha_3$  resultó ser negativa y estadísticamente significativa (Tabla 30, Figura 36). Esto significa que cuanto más corto es el gancho mayor es  $\alpha_3$ .

### **Relación entre la longitud y curvatura del gancho con la velocidad de natación**

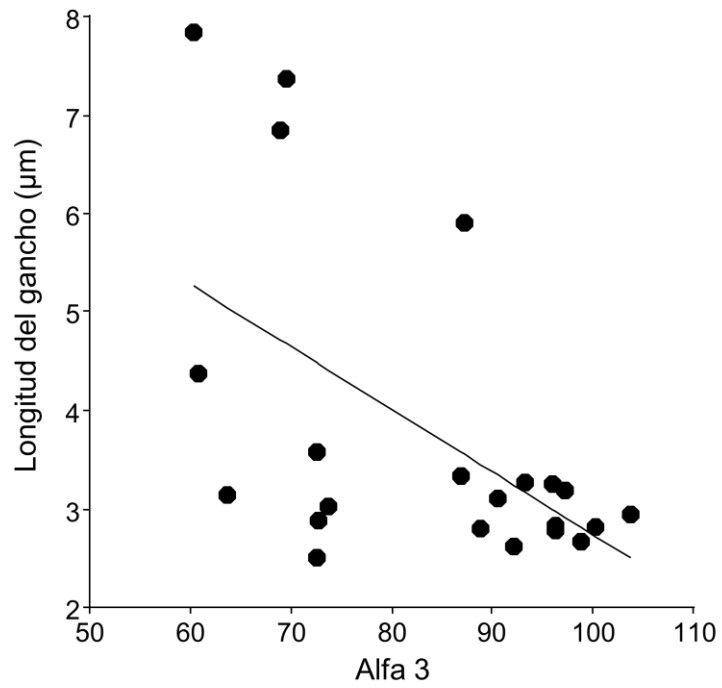
La regresión reveló que existe una relación negativa, entre  $\alpha_3$  y VCL ( $P = 0,07$ ) (Tabla 30, Figura 37A). Esta tendencia sugiere que a menor ángulo de curvatura, mayor es la velocidad curvilínea del espermatozoide.

Se encontró una relación positiva entre la longitud del gancho y VCL ( $P < 0,0001$ ) (Tabla 30, Figura 37B). Por tanto, a mayor longitud del gancho más rápido nada el espermatozoide. No se obtuvieron resultados significativos para los parámetros VSL y VAP.

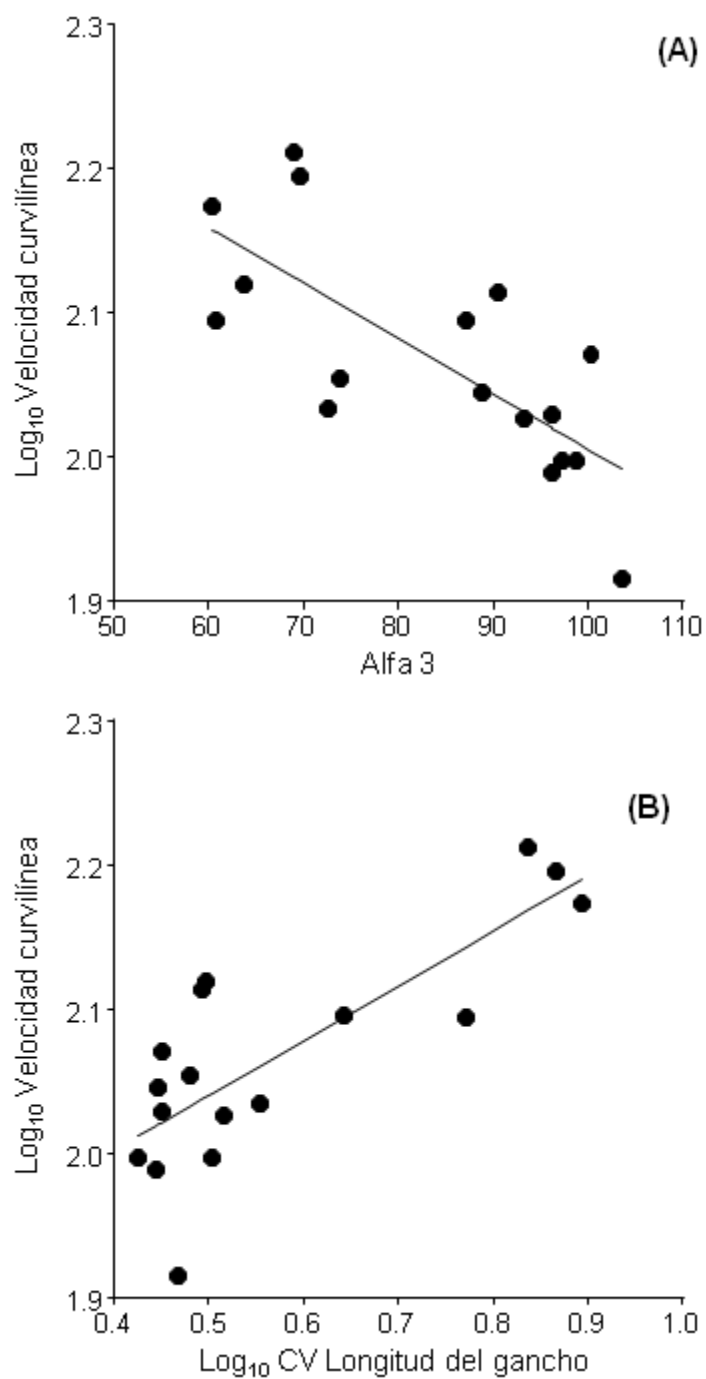
El análisis de componentes principales (PCA) realizado para resumir las variables de velocidad de natación, generó una nueva variable que se denominó velocidad espermática global (OSV). El factor 1 del PCA (PC1) explicó un 75% de la varianza, mientras que el factor 2 (PC2) explicó un 24% de la varianza. La regresión dio una relación significativa y negativa entre  $\alpha_3$  y el PC1 de la (OSV) (Tabla 30). Se observó una relación positiva y significativa entre la longitud del gancho y el PC2 de OSV (Tabla 30).

**Tabla 30.** Regresiones simples, con control filogenético, entre la longitud y la curvatura del gancho, y entre la curvatura o la longitud del gancho y los parámetros de velocidad de natación de los espermatozoides. Los test fueron realizados con 20 grados de libertad. El número de especies es de  $n = 22$  para la regresión entre curvatura y longitud del gancho y de  $n = 17$  para la regresión entre curvatura o longitud del gancho y velocidad de natación. Los superíndices que acompañan a  $\lambda$  indican los niveles de significación ( $\dagger$  n.s.;  $*P < 0.05$ ) contra  $\lambda=0$  (primera posición) y  $\lambda=1$  (segunda posición). El tamaño del efecto  $r$  se calculó a partir de los valores de  $F$ . También se dan los valores de los intervalos de confianza (IC) al 95%. Los intervalos de confianza que excluyen el 0 indican que hay significación estadística. Los intervalos de confianza y valores  $P$  significativos están resaltados en negrita. Abreviaturas: VCL, velocidad curvilínea; OSV, velocidad espermática global; PC1, factor 1 del análisis de componentes principales; PC2, factor 2 del análisis de componentes principales.

Variable dependiente	Predictor	$R^2$ ajustado	pendiente	$F$	$P$	Lambda ( $\lambda$ )	Tamaño del efecto ( $r$ )	Efecto de tamaño (IC)
Longitud del gancho	$\alpha 3$	0,14	-0,03	4,42	<b>0,04</b>	1,00 <sup>*,†</sup>	0,42	<b>(0,004 - 0,90)</b>
Log VCL	$\alpha 3$	0,13	-0,001	3,55	0,07	1,00 <sup>*,†</sup>	0,38	(-0,04 - 0,85)
Log VCL	Log longitud gancho	0,57	0,33	22,30	<b>&lt;0,0001</b>	0,00 <sup>†,†</sup>	0,72	<b>(0,47 - 1,37)</b>
Log OSV (PC1)	$\alpha 3$	0,36	-0,06	10,25	<b>0,005</b>	0,00 <sup>†,*</sup>	0,63	<b>(0,23 - 1,27)</b>
Log OSV (PC2)	Log longitud gancho	0,68	4,58	35,36	<b>&lt;0,0001</b>	0,34 <sup>†,†</sup>	0,83	<b>(0,68 - 1,73)</b>



**Figura 36.** Relación entre longitud y curvatura del gancho (ángulo  $\alpha_3$ ) en 22 especies de roedores.



**Figura 37.** Relación entre velocidad curvilínea (VCL) y (A) curvatura del gancho y (B) longitud del gancho.

## Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que tanto el ángulo de curvatura del gancho como la longitud del gancho están bajo selección por competición espermática. Además se ha observado una fuerte covariación entre la forma del gancho y su longitud. Por añadidura, las relaciones observada entre la longitud y la curvatura del gancho con la velocidad de natación de los espermatozoides ponen de manifiesto el significado biológico que parece tener esta estructura de la cabeza espermática.

La variación en la curvatura del gancho en roedores muroideos se ha examinado con anterioridad en otros trabajos (Immler *et al.*, 2007; Sandera *et al.*, 2011). El ángulo medido en estos estudios previos es el ángulo externo que se forma entre el eje principal de la cabeza y la tangente entre el extremo apical y la punta del gancho. En el presente trabajo se ha optado por evaluar ángulos definidos por *landmarks* que a su vez coinciden con estructuras anatómicas relevantes de la cabeza del espermatozoide (Varea-Sánchez *et al.*, 2013). La utilización de un enfoque basado en morfometría geométrica permite re-evaluar el ángulo medido en trabajos anteriores, además de definir otros ángulos, atendiendo a la importancia biológica de los *landmarks* que los componen. Esta técnica tiene la ventaja de poder relacionar estos ángulos no solo con el nivel de competición espermática, sino también con el conjunto de la forma de la cabeza del espermatozoide. Se tomó la decisión de medir los ángulos internos, en lugar de tomar el ángulo externo como en trabajos anteriores. Uno de los motivos para ello deriva de las características especiales que presenta el área interna del gancho con respecto a otras zonas de su estructura. A lo largo de la porción interna del gancho se encuentran depósitos de material electrodensso que podrían facilitar la adhesión de unos espermatozoides a otros mediante sus ganchos. Esta característica permitiría al espermatozoide formar agregados celulares conocidos como trenes. Según se postula en

trabajos anteriores, el gancho podría haber evolucionado como respuesta a la competición espermática y su función principal podría ser la formación de dichos trenes, que ayudarían a incrementar la velocidad de natación (Moore *et al.*, 2002). Por este motivo, parece más adecuado medir el ángulo interno en lugar del ángulo externo. Además, medir otros ángulos de curvatura, y evaluar su posible relación con competición espermática, puede ayudar a descubrir aspectos del diseño espermático que son importantes en su función fecundante.

El ángulo  $\alpha_1$ , determinado por los *landmarks* 9, 21 y 20 es la curvatura más interna del gancho, esto es, el ángulo basal del gancho. Cuando el gancho está proyectado hacia delante, con respecto al eje principal de la cabeza, queda al descubierto una zona por donde los espermatozoides serían capaces de adherirse y formar trenes. En estudios anteriores se presentó evidencia para algunas especies apoyando la idea de que estos trenes serían capaces de nadar más deprisa que las células en estado individual (Moore *et al.*, 2002; Immler *et al.*, 2007; Fisher y Hoekstra, 2010). Por lo tanto, cabría esperar que este ángulo, cuya relevancia biológica es potencialmente grande, debiera estar relacionado con el nivel de competición espermática. A pesar de su importancia, en los trabajos publicados hasta la fecha, no hay referencia a que se haya evaluado este ángulo con anterioridad. Según los resultados del presente trabajo, este ángulo no guarda ninguna relación con el nivel de competición espermática.

Un ángulo similar al que en el presente trabajo se denomina como ángulo  $\alpha_2$  se ha analizado en estudios anteriores (Immler *et al.*, 2007, Sandera *et al.*, 2011). En estos trabajos se encontró que el ángulo externo que se forma entre el eje principal de la cabeza y la tangente entre el extremo apical y la punta del gancho está asociado de forma positiva con el tamaño relativo de los testículos y por tanto con el nivel de competición espermática. En el presente estudio se ha medido el ángulo interno que

forman los *landmarks* 3, 8 y 13. Los dos primeros *landmarks* definen el eje principal de la cabeza, al igual que el ángulo utilizado en estudios anteriores. El *landmark* 13 define la punta del gancho, en lugar de la tangente. De cualquier modo, no se encontró una relación significativa entre este ángulo y el nivel de competición espermática al contrario de lo que se observó en trabajos previos (Immler *et al.*, 2007, Sandera *et al.*, 2011).

El ángulo  $\alpha_4$  está definido por los *landmarks* 14, 8 y 17. Este ángulo pretende medir si el gancho surge como una proyección rostral del cuerpo principal de la cabeza espermática. Siendo así, es posible que el gancho comience a desplazarse hacia delante desde la porción apical de la zona dorsal de la cabeza (*landmark* 14). Este proceso alcanzaría su punto más alto en el extremo apical de la cabeza (*landmark* 8) y desde allí comenzaría su proyección hacia delante hasta llegar a un punto máximo (*landmark* 17) donde continuaría su proyección hacia abajo formando la estructura completa del gancho.

Se han considerado dos posibles orígenes para explicar la aparición del gancho en roedores. Por un lado, es posible que los espermatozoides de los roedores actuales hayan evolucionado a partir de una forma ancestral cuya morfología era ovalada y sin ningún tipo de apéndices (Roldan *et al.*, 1992). Por otra parte, se ha postulado que el gancho apareció en el espermatozoide ancestral de *Myomorpha* hace 10 millones de años, antes de que se produjese la separación de los clados, y que las morfologías más simples observadas en algunas especies han evolucionado de manera independiente en diferentes linajes (Breed, 2005). De hecho, estos morfotipos más simples pueden haber evolucionado en situaciones donde la competición espermática ha relajado su presión selectiva (Breed, 2014). Los resultados del presente trabajo no revelaron ninguna asociación entre el ángulo  $\alpha_4$  (ángulo que predeciría la aparición del gancho) y el nivel



de competición espermática. De todos modos, es importante tener en cuenta que el gancho se forma después de la meiosis y que este proceso depende de genes cuya expresión es también post-meiótica (Kim *et al.*, 1989; Kleene, 2001). Para comprender mejor como ha ocurrido la evolución del gancho, será importante estudiar en el futuro si la expresión de estos genes guarda alguna asociación con el nivel de competición espermática. En caso de ser así, aportaría una evidencia fuerte a favor de la hipótesis de la evolución del gancho como respuesta a la presión de la selección sexual postcópula.

El ángulo  $\alpha_3$  es el formado por los *landmarks* 3, 8 y 17. Mide la curvatura interna entre el eje principal de la cabeza (*landmarks* 3 y 8) y la zona rostral del gancho (*landmarks* 8 y 17). Este ángulo resultó estar negativamente asociado con el nivel de competición espermática. La relación negativa indica que a mayor nivel de competición espermática menor es este ángulo y, en consecuencia, mayor es la curvatura del gancho.

Los trabajos previos identificaron una asociación entre en nivel de competición espermática y una medida de curvatura del gancho, pero el significado de esta asociación no está claro. Además, algunas de las especies examinadas en esos trabajos poseen más de un gancho pero únicamente se consideró la curvatura del primero más apical, por lo que la relevancia biológica que puedan tener los demás sigue siendo desconocida. Por otra parte, dos estudios recientes llevados a cabo en *Mus domesticus* no han encontrado ninguna asociación entre el ángulo de curvatura del gancho y el nivel de competición espermática (Firman y Simmons, 2009; Firman *et al.*, 2011). Hay dos motivos por los que se pueden explicar estos resultados. El primero es que las especies de *Mus* suelen tener bajos niveles de competición espermática. El segundo es que a pesar de que estas líneas de *Mus domesticus* fueron criadas bajos distintos niveles de competición espermática, no muestran un nivel de variación suficiente como para poder

detectar cambios en el nivel de curvatura del gancho asociados al nivel de competición espermática.

El presente estudio también ha demostrado que existe una relación positiva entre la longitud del gancho y el nivel de competición espermática, lo que supone que a mayor nivel de competición espermática mayor es la longitud del gancho. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos previos, en los que se concluye que los espermatozoides de roedores muroideos tienen ganchos más largos cuando aumenta el riesgo de competición espermática (Immler *et al.*, 2007; Sandera *et al.*, 2013). Apenas hay datos biológicos que esclarezcan cual puede ser el valor adaptativo de aumentar la longitud del gancho. Un estudio previo mostró que existe una asociación positiva entre la longitud del gancho y la duración del ciclo reproductor de la hembra (Firman y Simmons, 2009). En este estudio también se proponía, al igual que en estudios anteriores, que el papel del gancho podría ser adherirse al epitelio de las paredes del oviducto y, de este modo, asegurar la supervivencia del espermatozoide (Suarez, 1987; Smith y Yanagimachi, 1990). Además de la función de transporte se han propuesto otras explicaciones para la aparición del gancho. Teniendo en cuenta el aumento de tamaño de los diversos componentes del espermatozoide en respuesta a la competición espermática es bien conocido (Gómez-Montoto *et al.*, 2011b; Tourmente *et al.* 2011a) Se ha postulado que debido al aumento en el área de la cabeza, se produce un incremento en el tamaño del núcleo y a su vez que el tamaño del acrosoma también aumenta. En esta situación es posible que el gancho apareciese como consecuencia de un reordenamiento estructural, para albergar la porción del acrosoma que no puede permanecer en el cuerpo principal de la cabeza (Roldan *et al.*, 1992; Gómez Montoto *et al.*, 2011b).

En este trabajo también se ha observado que, a medida que incrementa la presión de la competición espermática, el nivel de variación en la longitud del gancho disminuye. El fenómeno de la reducción de la variación en las características del espermatozoide como consecuencia de la competición espermática se ha observado en diferentes taxones: aves (Calhim *et al.*, 2007; Laskemoen *et al.*, 2012), insectos (Fitzpatrick y Baer, 2011) y mamíferos (ver capítulo 3). Con los datos disponibles en la actualidad no es posible comprender con exactitud por qué la selección sexual postcópula promueve una disminución en el grado de variación de la longitud del gancho. Es posible que el patrón observado obedezca a un fenómeno de selección direccional, donde la competición espermática estaría jugando un papel estabilizador una vez que las células han alcanzado la morfología óptima.

Los análisis de morfometría geométrica revelaron que la longitud del gancho covaría con la forma. Según los resultados obtenidos, los ganchos más largos son además más prominentes, mientras que los ganchos más cortos tienen una forma más afilada. Por lo tanto, parecía ser que una determinada longitud de gancho va asociada a un determinado diseño del mismo, siendo la competición espermática la fuerza promotora de una remodelación en el diseño de la cabeza que hace a los espermatozoides más competitivos.

Por último, se observó que tanto la longitud como la curvatura del gancho están relacionadas con la velocidad de natación. Las relaciones con la velocidad curvilínea y con la velocidad espermática global son negativas, lo que indica que cuanto menor es el ángulo de curvatura, el espermatozoide es capaz de nadar más deprisa. Respecto a la longitud del gancho se observó la tendencia opuesta. Las células capaces de nadar más rápido son las que poseen un gancho más largo. Desde un punto de vista hidrodinámico parece plausible que las células con un gancho más retraído sean capaces de nadar más

rápido ya que, como se ha evidenciado en trabajos anteriores, el gancho es una estructura flexible que puede cambiar de forma durante la vida de la célula espermática (Sanderá *et al.*, 2011).

Aunque se desconoce cuál es la ventaja adaptativa que confiere a los espermatozoides tener un gancho más voluminoso, los resultados de este trabajo demuestran que tanto la longitud del gancho como el ángulo definido como  $\alpha_3$ , parecen ser de gran importancia en el rendimiento del espermatozoide y, particularmente, en su motilidad progresiva.

De los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que la competición espermática influye sobre un ángulo de curvatura y sobre la longitud del gancho. Parece evidente que, en este grupo de especies de roedores muroideos, la longitud y la curvatura del gancho están influenciadas por la selección sexual postcópula mediante selección estabilizadora. Por añadidura, los resultados demuestran que la longitud y el diseño del gancho están muy relacionados, y que la morfología del gancho tiene un impacto importante sobre la velocidad de natación del espermatozoide.

## CAPÍTULO 8

# EL DISEÑO DE LA FORMA DE LA CABEZA AFECTA A LA VELOCIDAD Y LA TRAYECTORIA DE NATACIÓN DE LOS ESPERMATÓZOIDES DE ROEDORES

### **Introducción**

La competición espermática promueve cambios en las características de los espermatozoides que contribuyen a mejorar su éxito reproductor (Birkhead e Immler, 2007; Gomendio y Roldan, 2008; Simmons y Fitzpatrick, 2012). La magnitud de esos cambios refleja en algunos casos la fuerza de la selección por competición espermática (Parker, 1998). Cuando el proceso de fecundación ocurre en condiciones de competición espermática la característica más determinante del éxito reproductor es la velocidad de natación de los espermatozoides (Gage *et al.*, 2004; Pizzari y Parker, 2009). Una alta velocidad de natación puede ser ventajosa a la hora de sobrepasar las barreras que encuentran los espermatozoides a lo largo del tracto reproductor femenino. Además en condiciones de competición espermática la capacidad de incrementar la velocidad de natación puede ser considerada como una adaptación que maximiza las oportunidades de fecundar al óvulo para un determinado individuo. Esta hipótesis ha sido apoyada por los resultados obtenidos en estudios comparativos en diferentes taxones. Estos trabajos han evidenciado que la competición espermática guarda una relación positiva con la velocidad de natación (Fitzpatrick *et al.*, 2009; Kleven *et al.*, 2009; Gómez-Montoto *et al.*, 2011b). En el otro extremo, también se han descrito, entre especies de roedores, casos de cooperación entre espermatozoides de un mismo individuo que parecen incrementar la velocidad de natación en situaciones de

competición espermática (Moore *et al.*, 2002; Immler *et al.*, 2007; Fisher y Hoekstra, 2010).

La velocidad de natación de los espermatozoides está determinada por dos factores: la eficiencia metabólica de la célula y su diseño (Lüpold *et al.*, 2009; Tourmente *et al.*, 2011a y b, 2013). La producción de energía en forma de ATP tiene lugar en el flagelo. Puede darse bien por fosforilación oxidativa en las mitocondrias o por glicólisis en la pieza principal. El ATP es esencial, entre otras funciones, para impulsar el movimiento del espermatozoide. Por otra parte, los espermatozoides exhiben un amplio rango de morfologías y diseños en el reino animal. Estas diferencias están relacionadas con tres factores: (a) el ambiente donde tiene lugar la fecundación (Frazén, 1956), (b) la filogenia (Roldan *et al.*, 1992) y (c) la selección sexual postcópula (Gomendio *et al.*, 2011). El incremento de la longitud del espermatozoide en respuesta a la competición espermática es un patrón extendido en varios taxones (Gomendio y Roldan, 1991; 2008). Por otra parte, se ha observado que los eyaculados presentan un mayor grado de pleiomorfismo cuando los niveles de competición espermática disminuyen (mamíferos: Breed, 1995; aves: Birkhead *et al.*, 2006). Esta heterogeneidad dentro de un mismo eyaculado puede ser el resultado de una relajación en el control de la espermiogénesis cuando invertir en producir espermatozoides de alta calidad no es algo prioritario para lograr una fecundación exitosa. De este modo, la competición espermática puede mejorar el control de calidad de la producción de espermatozoides y actuar como una fuerza estabilizadora sobre el fenotipo espermático. En condiciones de competición espermática, los cambios en el diseño del espermatozoide responden al valor adaptativo de mejorar la velocidad de natación y, por lo tanto, el éxito reproductor (Gomendio y Roldan, 1991, Tourmente *et al.*, 2011 a y b).

La hipótesis de que la morfología espermática influye en la velocidad de natación ha sido explorada en varios estudios. En análisis realizados en mamíferos se ha encontrado una clara asociación entre la velocidad de natación y la longitud total de los espermatozoides de mamíferos (Gomendio y Roldan, 1991), así como entre la velocidad de natación y el tamaño de distintos componentes del espermatozoide como son la cabeza, la pieza media o la longitud del flagelo (Malo *et al.*, 2006; Firman y Simmons, 2008, 2009; Gómez-Montoto *et al.*, 2011b; Tourmente *et al.*, 2011a). Estudios realizados en aves (Lüpold *et al.*, 2009) y peces (Fitzpatrick *et al.*, 2009) también han demostrado que los espermatozoides largos son capaces de nadar más deprisa que los espermatozoides cortos.

A pesar de que en la actualidad existe abundante evidencia de la asociación entre morfología y velocidad de natación, la manera en que esos cambios morfológicos operan sobre la velocidad no se conoce con certeza. La fuerza motriz que genera el flagelo es proporcional a su longitud (Katz y Drobnis, 1990). Debido a que es esa fuerza motriz la que impulsa al espermatozoide hacia delante, un flagelo más largo implicaría, presumiblemente, una mejora en la velocidad de natación (Gomendio y Roldan, 1991; Lüpold *et al.*, 2009). Por otro lado, la fuerza de rozamiento que se opone al avance de la célula espermática la ejerce principalmente la cabeza, siendo proporcional a su superficie, mientras que el rozamiento ejercido por el flagelo puede considerarse insignificante (Humphries *et al.*, 2008). En el ambiente en el que operan los espermatozoides, caracterizado por un bajo número Reynolds, la viscosidad es elevada y la inercia carece de efecto. De este modo, la velocidad de natación que puede alcanzar un determinado espermatozoide dependerá de un equilibrio de fuerzas entre la capacidad propulsora del flagelo y el rozamiento de la cabeza, que se opone al movimiento. En consecuencia, se ha propuesto que la proporción (ratio) entre el área de

la cabeza y longitud del flagelo sería un predictor fiable de la velocidad de natación (Humphries *et al.*, 2008).

La morfología de la cabeza ha demostrado tener un importante impacto sobre la velocidad de natación de los espermatozoides. Las células que poseen cabezas más elongadas son capaces de nadar más deprisa debido a que presentarían una menor resistencia al medio. Estos resultados revelan que el ratio longitud de la cabeza/ancho de la cabeza tiene implicaciones importantes que afectan a la eficiencia hidrodinámica y velocidad de natación de los espermatozoides (Malo *et al.*, 2006).

En este capítulo se presentan los resultados de un estudio que ha explorado cómo el diseño espermático interacciona con la velocidad de natación en un grupo de roedores cuya morfología espermática es compleja. Tradicionalmente, la morfología espermática se ha evaluado mediante la medición de las dimensiones lineales de sus componentes, recurriendo a diversas medidas como longitud, ancho y área de cabeza. Sin embargo, como ya se ha dicho, la morfometría tradicional no es un método suficientemente sensible para capturar diferencias en forma, especialmente en morfologías complejas como la de los espermatozoides de roedores. En este estudio se ha utilizado una técnica más precisa, como es la morfometría geométrica, para capturar y cuantificar esas diferencias en forma presentes en la cabeza del espermatozoide (Varea-Sánchez *et al.*, 2013). Este trabajo ha tenido cuatro objetivos principales: (1) explorar la asociación entre la forma de la cabeza y la velocidad de natación, (2) evaluar si la forma de la cabeza tiene un mayor impacto sobre la velocidad o sobre la trayectoria de natación, (3) examinar la precisión de las dimensiones lineales y ratios (p.ej., longitud de la cabeza/ancho de la cabeza) como predictores de la velocidad de los espermatozoides, y (4) determinar si los cambios en el diseño de la cabeza ocurren como consecuencia de la competición espermática.



## **Material y métodos**

### **Recolección de las muestras**

En este trabajo se examinaron individuos adultos pertenecientes a 17 especies de roedores muroideos. Las especies utilizadas fueron: *Apodemus sylvaticus*, *Chionomys nivalis*, *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Lemniscomys barbarus*, *Mesocricetus auratus*, *Mus caroli*, *Mus castaneus*, *Mus domesticus*, *Mus macedonicus*, *Mus musculus*, *Mus pahari*, *Mus spicilegus*, *Mus spretus*, *Phodopus campbelli*, *Phodopus roborovskii* y *Phodopus sungorus*.

Se sacrificaron cinco individuos de cada especie mediante dislocación cervical y, a continuación, se pesaron. Después, se procedió a su disección extrayendo y pesando los testículos. Ambos epidídimos se incubaron durante 5 minutos en una placa de Petri con 1-3 ml de medio Tyrode modificado con HEPES precalentado a 37°C.

### **Evaluación de la velocidad espermática**

Se depositó una alícuota de la suspensión espermática obtenida en una cámara para microscopio filmando los espermatozoides a un aumento de 40X en contraste de fase. El equipo utilizado fue un microscopio conectado a una cámara de video digital. Mediante un software de análisis espermático (SCA v 5.1; Microptic SL, Barcelona, España) se evaluaron los siguientes parámetros: velocidad curvilínea (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad rectilínea (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ), velocidad promedio de la trayectoria (VAP;  $\mu\text{m/s}$ ), linealidad (LIN; %), rectitud (STR; %), tambaleo (WOB, %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH;  $\mu\text{m}$ ) y frecuencia de batido (BCF; Hz) (Mortimer, 1994).

### **Evaluación de la forma y el tamaño de la cabeza**

Se tomaron submuestras de la suspensión espermática original y se emplearon para realizar frotis que se fijaron con formaldehído al 4% en tampón fosfato. Después, se tiñeron las muestras con Giemsa y se examinaron al microscopio a un aumento de 1000X fotografiando 25 células por individuo. Las imágenes capturadas se emplearon para cuantificar el tamaño de aquellos componentes del espermatozoide que se suponen importantes para el *fitness* hidrodinámico (ver Introducción del capítulo). Las dimensiones de longitud de la cabeza (LC;  $\mu\text{m}$ ), ancho de la cabeza (AC;  $\mu\text{m}$ ), área de la cabeza (A;  $\mu\text{m}^2$ ) y longitud del flagelo (LF;  $\mu\text{m}$ ) se obtuvieron mediante el software ImageJ v1.41 (NIH, Bethesda, Estados Unidos). Los datos morfométricos así como las coordenadas Procrustes fueron obtenidos siguiendo el proceso detallado anteriormente (Varea-Sánchez *et al.*, 2013).

### **Análisis estadístico**

Para encontrar patrones de covariación entre las coordenadas Procrustes que definen la forma de la cabeza y las variables de velocidad se utilizó un análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS). Este método se basa en la descomposición en valores individuales de la matriz de covarianzas entre los dos bloques de variables (Rohlf y Corti, 2000). El PLS genera pares de combinaciones lineales (vectores) que maximizan la covarianza entre los dos bloques de variables. El grado de asociación entre los bloques de forma y velocidad se mide por medio del coeficiente RV (Escoufier, 1973) que es el análogo multivariante del coeficiente  $R^2$  de la regresión. La diferencia entre este método y la regresión reside en que en el PLS las variables se tratan de forma simétrica, en lugar de asumir que un conjunto de variables predice el otro, como se hace en la regresión.

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para resumir las variables de velocidad. Las ocho variables medidas originalmente se dividieron en dos grupos: las variables asociadas a velocidad en sentido estricto y las variables asociadas a trayectoria. El PCA entre el primer grupo de variables (VCL, VSL y VAP) dio una nueva variable que se llamó velocidad espermática global (overall sperm velocity, OSV). Por otra parte, el PCA entre las variables LIN, STR, WOB, ALH y BCF dio una variable que se denominó forma de trayectoria global (overall track shape, OTS), y que define la trayectoria de natación del espermatozoide. Se realizó un PLS entre estas nuevas variables y las coordenadas Procrustes para examinar si la cabeza del espermatozoide covaría en mayor medida con la velocidad o con la trayectoria de natación.

Para entender mejor la asociación entre la velocidad de natación y el diseño espermático se realizaron dos regresiones multivariantes. En la primera, se utilizaron las coordenadas Procrustes como variable dependiente y los distintos descriptores del *fitness* hidrodinámico (longitud de la cabeza/ancho de la cabeza, área de la cabeza/longitud del flagelo y longitud del flagelo), más OSV, se consideraron como variables independientes. En la segunda, las coordenadas Procrustes fueron utilizadas nuevamente como la variable dependiente mientras que los descriptores del *fitness* hidrodinámico, más OTS, se tomaron como variables independientes (Drake y Klingenberg, 2008). El total de la variación registrada por la regresión se cuantificó como un porcentaje que expresa la variación total en forma explicada por el modelo (Klingenberg y McIntyre, 1998). La significación estadística del modelo se examinó por medio de un test de permutación contra la hipótesis nula de independencia (Good, 2000). Finalmente, se utilizó una regresión múltiple para determinar la acción de la competición espermática sobre la cabeza del espermatozoide. Para este propósito las

coordenadas Procrustes se regresionaron como variable dependiente frente a masa testicular y masa corporal.

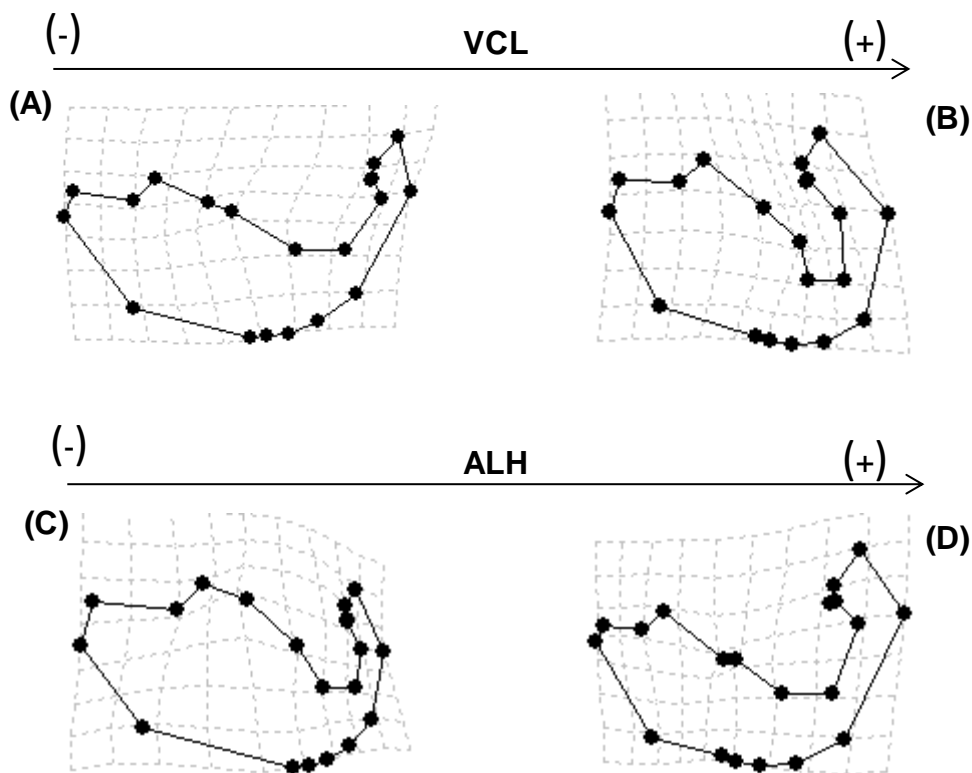
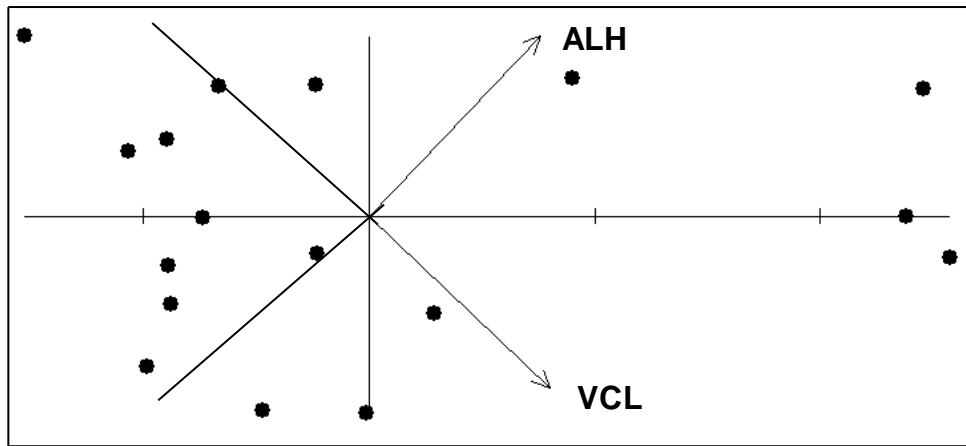
Los análisis estadísticos se realizaron con TPS PLS, TPS regr (James Rohlf, Department of Ecology and Evolution, Stony Brook University, New York, USA), MorphoJ (Klinenberg, 2011) e InfoStat 2010 (FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## **Resultados**

El análisis de PLS para buscar patrones de covariación entre la velocidad de los espermatozoides y la forma de la cabeza mostró que las variables VCL y ALH son las que covarían en mayor grado con la forma de la cabeza (Tabla 31). La representación gráfica de los *thin plate splines* asociados a este análisis, muestran que los espermatozoides cuyos valores de VCL son bajos tienen cabezas estrechas y ganchos cortos, los cuales además, están menos plegados que los de las células con valores altos de VCL (Figura 38). Las células con valores bajos de ALH están asociadas a cabezas que son, sustancialmente, más anchas y con ganchos más cortos en comparación con las células cuyos valores ALH son elevados (Figura 38). BCF resultó tener una covariación moderada con la forma de la cabeza (coeficiente  $RV = 0,47$ ; correlación entre vectores  $= 0,70$ ) (Tabla 31). El resto de variables de velocidad mostraron una correlación muy pobre con la forma de la cabeza (Tabla 31).

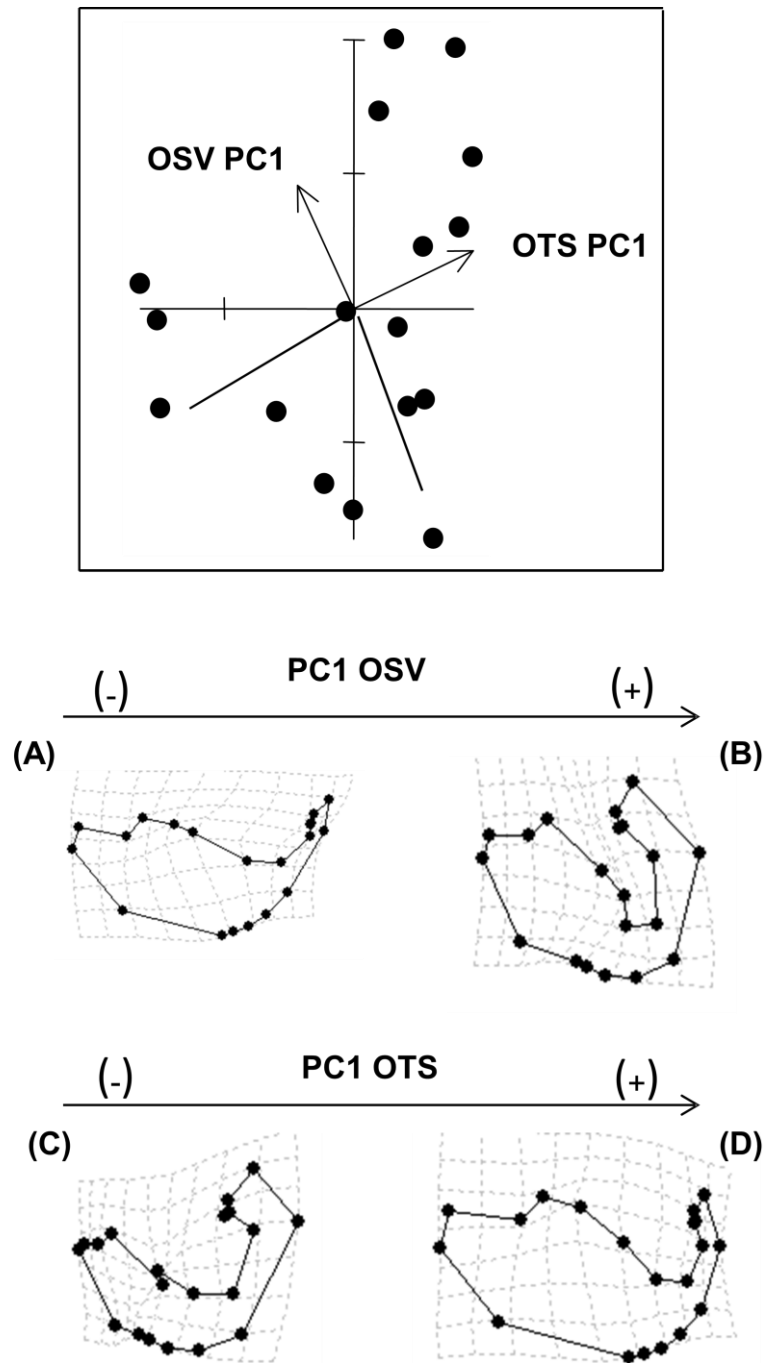
**Tabla 31.** Relación entre la forma de la cabeza y los parámetros de velocidad. Resultados del análisis univariante de mínimos cuadrados parciales (PLS) entre las coordenadas Procrustes y los parámetros de velocidad. Los valores en negrita son significativos para la hipótesis nula de independencia entre bloques (forma y velocidad). Abreviaturas: VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad rectilínea; VAP, velocidad promedio de la trayectoria; LIN, linealidad; STR, rectitud; WOB, tambaleo; ALH, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF, frecuencia de batido.

<b>Variable independiente</b>	<b>Valor individual</b>	<b>Correlación</b>	<b>Coefficiente RV</b>
VCL	<b>3,89</b>	<b>0,85</b>	<b>0,70</b>
VSL	<b>1,55</b>	<b>0,75</b>	0,14
VAP	1,46	0,56	0,16
LIN	<b>0,01</b>	<b>0,68</b>	<b>0,28</b>
STR	<b>0,007</b>	<b>0,67</b>	<b>0,18</b>
WOB	0,01	0,67	0,32
ALH	<b>0,23</b>	<b>0,86</b>	<b>0,66</b>
BCF	<b>0,16</b>	<b>0,70</b>	<b>0,47</b>



**Figura 38.** *Biplot* del PLS entre la forma de la cabeza y los parámetros de velocidad: velocidad curvilínea (VCL) y amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH). La representación de los *thin plate splines* muestra los cambios en la forma asociados a valores bajos (A) y altos (B) de la variable velocidad curvilínea (VCL). Los cambios de forma asociados a la variable amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza se muestran en la figura (C) valores bajos y (D) valores altos.

Se realizaron dos análisis de componentes principales (PCA) para resumir las ocho variables de velocidad. El factor 1 del PCA de variables de velocidad, PC1 de velocidad espermática global (OSV) explicó un 75,2% de la variación, mientras que el factor 1 del PCA de variables relacionadas con la trayectoria, PC1 de forma de trayectoria global (OTS), explicó un 73,4% de la variación. El PLS entre la forma de la cabeza y los PC1 de OSV y OTS mostraron que OTS, lo que equivale a trayectoria de natación, tiene una covariación más fuerte con la forma de la cabeza (valor individual = 0,26; correlación entre vectores = 0,73; coeficiente RV = 0,40;  $P= 0,006$  para la hipótesis nula de independencia entre bloques) que OSV (valor individual = 0,15; correlación entre vectores = 0,58; coeficiente RV = 0,22;  $P= 0,06$  para la hipótesis nula de independencia entre bloques). La representación gráfica de los *thin plate splines* (Figura 39) muestra que las células espermáticas con valores bajos de OSV y OTS son más estrechas en relación a las que tienen valores altos para estas variables, cuya morfología es más redondeada. La morfología del gancho demostró seguir el patrón opuesto, mostrando una morfología más afilada en espermatozoides con valores bajos de OSV, mientras que su forma es más prominente en células con valores bajos para OTS.



**Figura 39.** *Biplot* del PLS para el PC1 de las variables: velocidad espermática global (OSV PC1) que explica velocidad de natación y forma de trayectoria global (OTS PC1) que resume trayectoria de natación. Los cambios morfológicos asociados a estas variables se ilustran en los *thin plate splines*. Las rejillas de deformación (A) y (B) corresponden a valores bajos y altos respectivamente para el PC1 de OSV. Las rejillas (C) y (D) representan valores bajos y altos respectivamente para el PC1 de OTS.



La regresión múltiple entre la forma de la cabeza y el ratio longitud de la cabeza/ancho de la cabeza explicó un 36,47% de la variación en forma ( $P = 0,01$ ) y sugiere que esta variable es el principal determinante de la velocidad de natación seguida de la longitud del flagelo (Tabla 32). Por otro lado, la regresión entre la forma de la cabeza y los descriptores de *fitness* hidrodinámico más OTS reveló que el ratio área de la cabeza/longitud del flagelo explica un 44,04% de la variación asociada a forma ( $P = 0,002$ ) (Tabla 33). Además, los resultados sugieren que parece ser un buen predictor de la trayectoria de natación del espermatozoide. En la figura 40 se ilustran los cambios asociados a estas variables.

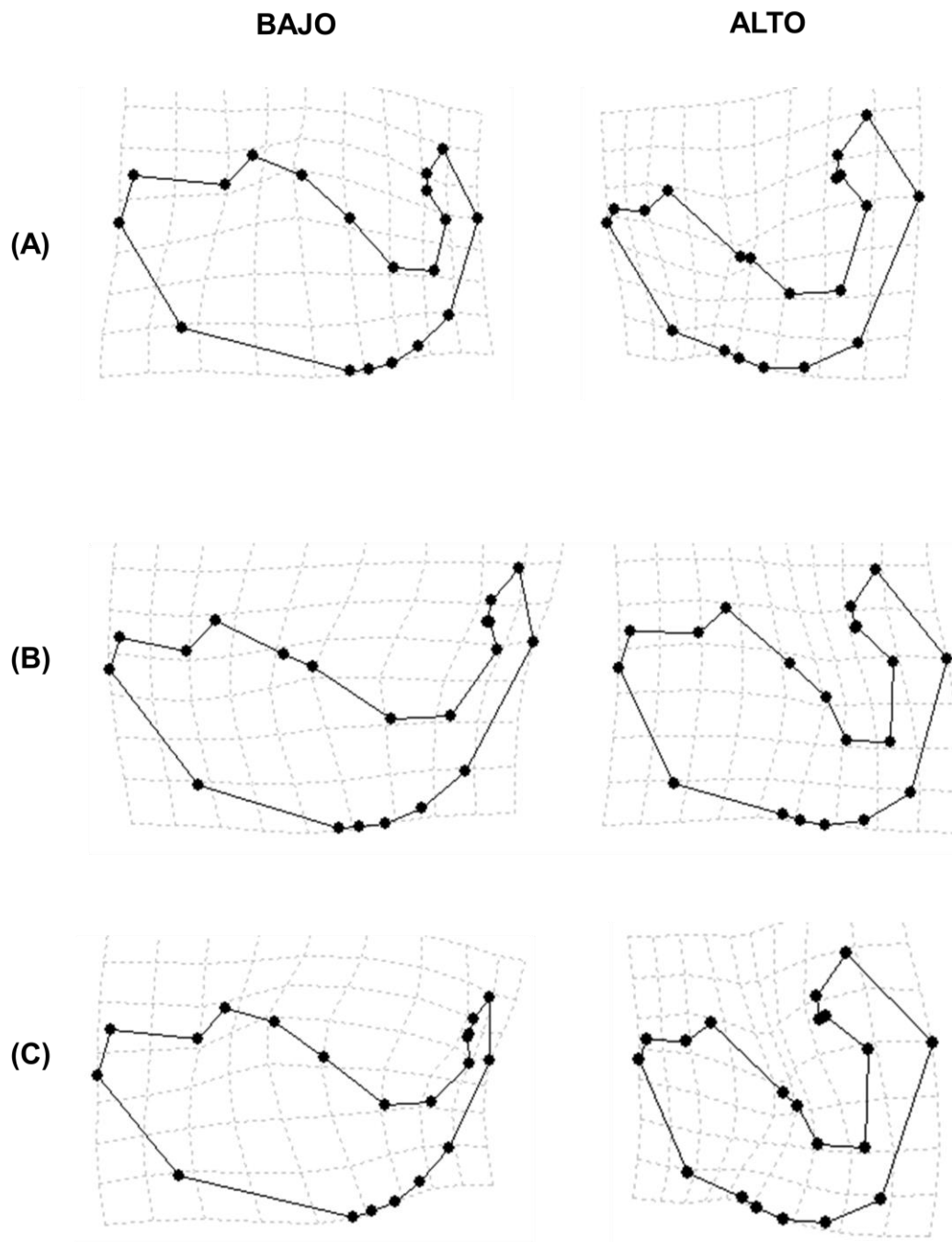
**Tabla 32:** Estimación de la forma de la cabeza basada en la variable velocidad espermática global (OSV) en relación a las dimensiones de distintos componentes espermáticos. Los resultados del análisis de regresión múltiple entre las coordenadas Procrustes y las dimensiones de los distintos valores espermáticos en relación a velocidad espermática global. Los valores en negrita son significativos para la hipótesis nula de independencia entre bloques (forma y velocidad). Abreviaturas: SC, suma de cuadrados; OSV, PC1 de la velocidad espermática global; LC/AC, longitud de cabeza/ancho de cabeza; A/LF, área de la cabeza/longitud del flagelo; LF, longitud del flagelo.

<b>Predictor</b>	<b>SC total</b>	<b>SC predicha</b>	<b>SC residual</b>	<b>% Predicho</b>
LC/AC + OSV	0,97	0,35	0,62	<b>36,47</b>
A/LF + OSV	0,97	0,20	0,76	21,26
LF + OSV	0,97	0,33	0,63	<b>34,68</b>

**Tabla 33.** Estimación de la forma de la cabeza basada en la variable forma de trayectoria global en relación a las dimensiones de distintos componentes espermáticos. Resultados del análisis de regresión múltiple entre las coordenadas Procrustes y las dimensiones de los distintos valores espermáticos en relación a forma de trayectoria global. Los valores en negrita son significativos para la hipótesis nula de independencia entre bloques (forma y velocidad). Abreviaturas: SC, suma de cuadrados; OTS, PC1 de la forma de trayectoria global; LC/AC, longitud de cabeza/ancho de cabeza; A/LF, área de la cabeza/longitud del flagelo; LF, longitud del flagelo.

<b>Predictor</b>	<b>SC total</b>	<b>SC predicha</b>	<b>SC residual</b>	<b>% Predicho</b>
LC/AC + OTS	0,97	0,34	0,62	<b>35,80</b>
A/LF + OTS	0,97	0,43	0,54	<b>44,03</b>
LF + OTS	0,97	0,31	0,65	<b>32,46</b>

Finalmente se examinó la influencia de la competición espermática sobre la forma de la cabeza en espermatozoides de roedores. La regresión entre la forma de la cabeza y la masa de los testículos corregida por la masa corporal explicó un 39,01% ( $P = 0,007$ ) de la variación en la forma de la cabeza. Los cambios en la forma de la cabeza asociados al nivel de competición espermática se muestran en la Figura 40.



**Figura 40. Cambios morfológicos asociados a valores bajos y altos de:** (A) longitud de la cabeza/ancho de la cabeza en relación a la velocidad espermática global (OSV). (B) área de la cabeza/longitud del flagelo en relación a la forma de trayectoria global (OTS) y (C) tamaño relativo de los testículos corregido por la masa corporal (índice de competición espermática).

## Discusión

En el trabajo presentado en este capítulo se desarrolla un nuevo enfoque para comprender la relación entre la forma de la cabeza del espermatozoide y su velocidad de natación. Los resultados sugieren que en el grupo de roedores examinados en este trabajo, la forma de la cabeza está inequívocamente asociada a la velocidad de natación. Se encontró evidencia de que tanto la forma de la cabeza, como el ratio área de la cabeza/longitud del flagelo tienen un papel importante en la trayectoria de natación (OTS). Además, el ratio longitud de la cabeza/ancho de la cabeza también es importante en la velocidad de natación global (OSV). Los resultados muestran que la selección sexual postcópula ejerce una clara influencia sobre la forma de la cabeza del espermatozoide, seleccionando para lo que podrían denominarse “fenotipos veloces” cuando aumenta el nivel de competición espermática.

Los espermatozoides exhiben un amplio rango de variación en lo que a morfología de cabeza y estrategias de natación se refiere (Yan *et al.*, 2013). Generalmente los espermatozoides tienen tendencia a nadar cerca de las barreras o superficies (Rothschild, 1963). En mamíferos, los espermatozoides experimentan dos tipos de estrategia de natación en función de las limitaciones espaciales que encuentran. Esto es, el movimiento del flagelo es sinusoidal cuando el espermatozoide nada cerca de una barrera física y helicoidal cuando se mueve a lo largo de la luz del oviducto (Wooley, 2003). La transición entre ambos tipos de movimiento se da de forma inmediata cuando el espermatozoide se mueve desde la luz a las proximidades de una barrera, y esta transición es posible gracias a la quiralidad del flagelo (Crenshaw, 1996). Cuando nadan cerca de barreras físicas, los espermatozoides tienden a desplazarse describiendo trayectorias curvilíneas. Los espermatozoides de ratón nadan con trayectorias circulares siempre en un movimiento contrario a las agujas del reloj. En

trabajos previos se ha demostrado que la cabeza juega un importante papel en la sincronización de este movimiento. La morfología de la cabeza del espermatozoide de ratón es claramente asimétrica, como consecuencia del gancho y de una inserción del flagelo que está ligeramente inclinada con respecto al eje principal de la cabeza. Cuando los espermatozoides nadan cerca de barreras, se adhieren a la superficie mediante el lado izquierdo de la cabeza (Wooley, 2003). En este contexto, la inserción asimétrica del flagelo con respecto a la cabeza puede funcionar como un timón, y la cabeza actuaría como si fuese un hidroala (Goldstein, 1977), estabilizando la trayectoria de natación. De acuerdo con los hallazgos previos, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, en este grupo de roedores, la forma de la cabeza tiene mayor impacto sobre la trayectoria que sobre la velocidad de natación. Por añadidura, el ratio área de la cabeza/longitud del flagelo resultó ser el parámetro, de entre los descriptores de *fitness* hidrodinámico, que mejor explica la variación en la forma de la cabeza asociada a velocidad.

La trayectoria del espermatozoide está determinada por la amplitud de la onda que describe el flagelo (Turner, 2003) y por la morfología de la cabeza (Elgeti *et al.*, 2010). Para que el espermatozoide pueda desplazarse, la onda que produce el movimiento flagelar se propaga de forma unidireccional desde la cabeza hasta la pieza terminal, rompiendo la asimetría del medio y desplazando el fluido hacia atrás al mismo tiempo que la célula se impulsa hacia delante (Álvarez *et al.*, 2014). Un estudio comparativo desarrollado entre varios órdenes de mamíferos encontró que no hay relación entre el ratio área de la cabeza/longitud del flagelo y la velocidad de natación (Tourmente *et al.*, 2011a). Sin embargo, los resultados del presente trabajo, centrado únicamente en roedores han demostrado que este ratio es capaz de explicar gran parte de la variación en forma asociada a la trayectoria de natación.

Un estudio vía simulación determinó que, al contrario de lo que se intuía, el rozamiento que ejerce la cabeza es mucho menor que la fuerza motriz que genera el flagelo (Smith y Blake, 2009). En este mismo trabajo se modelizó el movimiento del espermatozoide reduciendo las dimensiones de la cabeza y manteniendo constante la fuerza motriz generada por el flagelo. Como resultado, el ciclo de batido se ralentiza y el flagelo no se mueve de forma sinusoidal, por lo que las células son incapaces de nadar cerca de barreras como lo hacen los espermatozoides normales. Las razones biológicas subyacentes a este patrón de movimiento no están claras, pero es posible que el ratio área de la cabeza/longitud del flagelo juegue un papel importante estabilizando la trayectoria del espermatozoide, lo que también es importante cuando las células nadan en la proximidad de barreras. Por razones biomecánicas, es posible que exista un diseño óptimo de morfología de cabeza que vaya asociado a una determinada longitud de flagelo, logrando entre ambos que la trayectoria de natación sea eficiente.

Los efectos de la morfología espermática sobre la eficiencia hidrodinámica han sido ampliamente debatidos. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el ratio longitud de la cabeza/ancho de la cabeza es el descriptor de *fitness* hidrodinámico que mejor explica la variación en la forma de la cabeza asociada a la velocidad de natación. El ratio longitud/ancho de la cabeza define lo que se conoce como elongación de la cabeza y gobierna el movimiento de un cuerpo cuando se desplaza por un fluido de Stokes (Kim y Karilla, 1991). Los efectos de este ratio sobre la velocidad del espermatozoide son especialmente notables en cuanto a velocidad rectilínea (VSL) y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) se refiere. Un estudio comparativo realizado en espermatozoides de ciervo (Malo *et al.*, 2006), y un modelo de simulación en espermatozoides humanos (Gillies *et al.*, 2009) relacionaron el ratio longitud de la cabeza/ancho de la cabeza con la velocidad de natación. Ambos estudios

concluyeron que los espermatozoides más elongados eran capaces de nadar más rápido en términos de velocidad rectilínea (VSL). Con respecto al efecto que tiene una variación en las dimensiones de la cabeza sobre la variable amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, Gillies *et al.* (2009) demostraron que un incremento en la longitud de la cabeza iba acompañado de una reducción en el ángulo de cabeceo. En conjunto estos resultados sugieren que una elongación de la cabeza se traduciría en un incremento en la velocidad de natación, propiciando por una reducción en el cabeceo de la célula en lugar de en una reducción del rozamiento debido a la elongación. Los espermatozoides de roedores se desplazan utilizando la cabeza como si fuese un hacha que "corta" el medio. Debido a este patrón de movimiento el cabeceo es especialmente pronunciado. Esta estrategia de natación puede ser debida a que los espermatozoides utilizan sus ganchos para anclarse a la pared del oviducto, facilitando así su avance cuando la forma de éste es muy sinuosa (Suarez, 1987). Otros autores postulan que los espermatozoides utilizan el gancho para adherirse al epitelio oviductal en una estrategia que incrementa su supervivencia dentro del tracto femenino (Smith y Yanagimachi, 1990). Es importante tener en cuenta que los espermatozoides de humanos y ungulados tienen cabezas simples, con morfología redondeada o con forma de pala, mientras que en roedores las cabezas presentan dicho gancho apical. Además, en humanos y ungulados el flagelo se inserta siguiendo el eje principal de la cabeza, pero en roedores esta inserción está ligeramente inclinada. Estas diferencias morfológicas pueden ofrecer una explicación a la débil relación encontrada en el presente estudio entre la forma de la cabeza y el valor de la velocidad rectilínea. En un contexto más amplio, los resultados presentados en este capítulo, indican que el parámetro amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza parece ser crítico para la velocidad de natación independientemente de cual sea el diseño espermático.

La morfología de la cabeza es un factor determinante a la hora de conseguir una fecundación exitosa (Ramón *et al.*, 2013). Los resultados de este trabajo concuerdan con hallazgos previos que demuestran que la forma de la cabeza está bajo los efectos de la selección por competición espermática (Gómez-Montoto *et al.*, 2011 a y b; Tourmente *et al.*, 2011a). Un estudio reciente de expresión génica en roedores reveló que la abundancia relativa de la protamina 2 en relación a protamina 1 (proteínas relacionadas con la condensación de la cromatina) disminuye cuando se registran elevados niveles de competición espermática. El mismo estudio demostró que diferentes niveles de expresión en protaminas conducen a espermatozoides con morfologías de cabeza distintas (Lüke *et al.*, 2014b), lo que sugiere que la competición espermática selecciona para cabezas que tienen un alto grado de condensación en su DNA y esta condensación también es de alguna manera responsable de la morfología de la cabeza del espermatozoide.

De los resultados de este capítulo se concluye que hay una fuerte relación entre la forma de la cabeza del espermatozoide y los parámetros de velocidad curvilínea y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza. La cabeza del espermatozoide tiene un efecto importante sobre la trayectoria de natación y podría actuar como un timón estabilizando la trayectoria de la célula en su recorrido hasta el óvulo. Con respecto a los ratios longitud de la cabeza/ancho de la cabeza y área de la cabeza/longitud del flagelo, los resultados sugieren que ambos deben de ser considerados predictores fiables de la velocidad y trayectoria de natación respectivamente. Finalmente, se concluye que la forma de la cabeza está controlada por la selección sexual postcópula y por lo tanto las modificaciones que se producen en la forma de la cabeza a consecuencia de la competición espermática pueden tener un valor adaptativo que mejora el éxito reproductor.



## DISCUSIÓN GENERAL

Una de las cuestiones fundamentales en biología evolutiva es comprender cuál es la relación entre diversidad morfológica y adaptación. Desde que en 1970 Parker describiese la existencia de la competencia espermática se han documentado multitud de cambios en los parámetros seminales cuyo valor adaptativo responde a maximizar el éxito reproductor. El aumento del tamaño relativo de los testículos (Kenagy y Trombulack, 1986), el incremento en el número de espermatozoides producidos (Møller, 1989), la producción de un mayor número de células con morfología normal (Gómez-Montoto et al., 2011a), el incremento en la producción de energía (Tourmente et al., 2013), la capacidad de producir espermatozoides más rápidos (Fitzpatrick et al., 2009) o el aumento en las dimensiones de los componentes del espermatozoide (Gomendio y Roldan, 1991), son algunas de las adaptaciones que han evolucionado en el espermatozoide en respuesta a la competencia espermática. El amplio rango que exhiben los espermatozoides en cuanto a dimensiones y forma también es consecuencia directa de esta adaptación, donde posiblemente sean esos cambios morfológicos los que promueven una mejora en su rendimiento.

La relación entre forma y función ha generado un intenso debate en biología durante los últimos cien años. En última instancia es la morfología la que limita la función biológica del organismo. Aunque también es cierto que ambas interactúan y se retroalimentan (Ricklefs y Miles, 1994). En el contexto de la biología reproductiva establecer una relación entre el diseño del espermatozoide y su función aporta un marco para explicar por qué existen correlaciones entre morfología y parámetros reproductivos, además de establecer las bases para un subsiguiente análisis funcional de los componentes espermáticos. La función fecundante del espermatozoide es la misma en todas las especies. A pesar de la evidencia de que existen diferencias muy marcadas

entre el modo de fecundación interna y externa, es sorprendente observar cómo han evolucionado morfologías tan dispares en células que cumplen el mismo cometido en ambientes similares. En el caso de roedores esta diversidad es particularmente importante, puesto que su diseño espermático es único en comparación con otros mamíferos (y también en comparación con otros vertebrados). Aunque la respuesta de la competición espermática en este grupo ha sido muy estudiada, pocos trabajos han descrito las variaciones en la forma de los espermatozoides de manera cuantitativa (Firman y Simmons, 2009; Firman et al., 2011; Medarde *et al.*, 2013 a y b) y todos ellos se han sido realizados en la misma especie (*Mus domesticus*).

El trabajo realizado en esta Tesis abordó el análisis de la forma del espermatozoide en distintas especies de roedores combinando dos enfoques. Por un lado se emplearon métodos morfométricos tradicionales que permitieron examinar las diferencias morfológicas y su variabilidad en términos de tamaño. Por otro se utilizaron herramientas de morfometría geométrica para realizar estas investigaciones desde un enfoque cuantitativo, el cual permite, además, establecer relaciones numéricas entre la forma y otras variables de naturaleza diferente.

A lo largo de los seis capítulos de resultados se ha tratado de poner de manifiesto cómo la acción de la selección sexual postcópula dirigiría la evolución de los caracteres reproductivos hacia un diseño óptimo, encaminado a lograr el éxito reproductivo de los machos. Una vez alcanzado ese diseño óptimo, la competición espermática ejercería una fuerza estabilizadora sobre estas variaciones morfológicas para preservar los cambios. Esta fuerza selectiva actúa sobre las dimensiones del espermatozoide y sobre su velocidad, además de promover la variación morfológica en ciertas áreas de la cabeza conservando otras. Dentro de la estructura de la cabeza hay componentes como el gancho cuyo diseño responde a la competición espermática y su longitud guarda una

relación positiva con la velocidad de natación. Los cambios morfológicos observados producen reordenamientos en la forma de la cabeza que tienen un impacto sobre la velocidad y trayectoria de natación. Aunque el movimiento del espermatozoide ha sido estudiado *in vivo* en muchos taxones y modelizado vía simulación. Nunca antes se había realizado un estudio con las características del desarrollado en esta Tesis Doctoral. El análisis de la morfología espermática mediante morfometría geométrica, además de ofrecer mayor resolución que la morfometría tradicional, ha permitido establecer una conexión más precisa entre forma y función, abriendo en este caso, una nueva perspectiva de análisis de cara a estudios sobre hidrodinámica.

En conjunto, los resultados de esta Tesis sugieren que velocidad y forma son dos variables que evolucionan juntas, posiblemente porque el éxito reproductor depende en última instancia de la velocidad de natación (Gage *et al.*, 2004). Estas observaciones concuerdan con la teoría que postula que las características del espermatozoide que tienen funciones complementarias son capaces de coevolucionar para mejorar la habilidad competitiva de estas células, mientras que otros parámetros pueden seguir trayectorias evolutivas separadas, ya que la mejora en el rendimiento de todas las variables de calidad seminal sería tal vez muy costosa para el individuo (Dewsbury, 1982).

La investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral abre las puertas a trabajos futuros que nos permitirán responder a diversas preguntas. Entre ellas, será relevante relacionar la forma del espermatozoide con otros parámetros de calidad seminal en un marco evolutivo. De este modo, podremos conocer cuáles son el impacto y magnitud de esos cambios sobre la morfología de una estructura concreta. Una de las mayores ventajas de la morfometría geométrica, reside en la posibilidad de relacionar de forma cuantitativa los cambios en la forma con variables fisiológicas, ecológicas, genéticas,

entre otras. A este nivel, será especialmente importante la posibilidad de analizar las interacciones entre forma y expresión génica, ya que permitirá investigar cuestiones tan fundamentales en biología relacionadas con la asociación genotipo y fenotipo.

## **CONCLUSIONES**

En esta Tesis se examinaron las variaciones morfológicas del espermatozoide en diversas especies de roedores muroideos. Además, se estableció una asociación entre morfología espermática y otros parámetros de calidad seminal, buscando a su vez una relación con las fuerzas evolutivas subyacentes.

Las conclusiones generales que se pueden extraer de los resultados obtenidos son:

- (1) La morfología espermática está bajo el control de la selección sexual postcópula. De este modo se observa que a medida que aumenta el nivel de competición espermática disminuye el grado de variación en el tamaño y la forma de los componentes del espermatozoide.
- (2) La competición espermática ejerce una acción estabilizadora sobre la velocidad de natación de los espermatozoides. A medida que se incrementa la presión selectiva, los individuos tienden a producir espermatozoides que son más similares en cuanto su velocidad de natación.
- (3) La variación morfológica encontrada en la cabeza del espermatozoide es muy grande incluso entre especies cercanas. La comparación del diseño de la cabeza en tres linajes de roedores muroideos indica que hay zonas de la cabeza, como la región dorsal del acrosoma y la inserción del gancho, cuya forma tiende a conservarse entre linajes. Por otra parte, los cambios morfológicos suelen concentrarse en tres zonas: el gancho, la parte basal de la cabeza y la región ventral.

(4) El gancho apical-rostral es una estructura característica de la cabeza del espermatozoide de roedores muroideos, cuyo ángulo de curvatura y longitud están directamente relacionados con la velocidad de natación y con el nivel de competición espermática. La selección sexual postcópula también ejerce un papel estabilizador sobre la longitud del gancho, reduciendo su nivel de variación a medida que incrementa la competición espermática.

(5) La forma de la cabeza tiene una relación directa con la velocidad de natación, especialmente con la velocidad curvilínea. También se observó que la trayectoria de natación del espermatozoide está determinada en buena parte por la forma de la cabeza. Por otro lado, la variación morfológica asociada a la velocidad de natación puede explicarse en gran medida por el ratio longitud de cabeza/ancho de cabeza. De forma contraria, la variación morfológica asociada a la trayectoria de natación viene determinada por las variaciones en el ratio área de la cabeza/longitud del flagelo.

(6) Las herramientas de análisis que proporciona la morfometría geométrica son capaces de describir y cuantificar las variaciones en la forma de una manera precisa, así como de solventar los problemas a los que se enfrenta la morfología tradicional a la hora de evaluar la morfología de estructuras complejas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adham IM, Nayernia K, Burkhardt-Göttges E, Topaloglu O, Dixkens C, Holstein AF, Engel W (2001). Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol Hum Reprod* 7: 513-520.
- Alberti G (1990). Comparative spermatology of Araneae. *Act Zool Fennica*, 190: 17–34.
- Afzelius BA (1995). Gustaf Retzius and spermatology. *Int J Dev Biol* 39: 675-685.
- Álvarez L, Friedrich BM, Gompper G, Kaupp UB (2014). The computational sperm cell. *Trends Cell Biol* 24: 3.
- Anderson MJ, Dixson AF (2002). Sperm competition: motility and the midpiece in primates. *Nature* 416: 496.
- Anderson M J, Nyholt J, Dixson AF (2005). Sperm competition and the evolution of sperm midpiece volume in mammals. *J Zool (Lond)* 267: 135–142.
- Baccetti B (1972). Insect sperm cells. *Ad Insect Physiol* 9: 315–397.
- Baccetti B (1985). Evolutionary trends in sperm structure. *Comparative Biochemistry and Physiology. Mol Int Physiol* 85: 29–36.
- Bauer M, Breed WG (2006). Variation of sperm head shape and tail length in a species of Australian hydromyine rodent: the spinifex hopping mouse, *Notomys alexis*. *Reprod Fert Develop* 18: 797–805.
- Baker HWG, Clarke GN (1987). Sperm morphology: consistency of assessment of same sperm by different observers. *Clin Reprod Fertil* 5: 37-43.
- Bedford JM, Hoskins DD (1990). The spermatozoon: morphology, physiology, and biochemistry. En: Lamming GE, editor. *Marshall's physiology of reproduction. The male reproductive system*, vol. 2. London: Churchill Livingstone. pp 379–568.
- Bedford JM (1991). The co-evolution of mammalian gametes. En: Dunbar BS, O'Rand MGO, editores. *A comparative overview of mammalian fertilization*. New York: Plenum Press.
- Benazzi S, Coquerelle M, Fiorenza L, Bookstein F, Katina S, Kullmer O (2011). Comparison of dental measurement system for taxonomic assignment of first molars. *Am J PhysAnthropol* 144: 342-354.
- Bishop MWH, Walton A (1960). Spermatogenesis and the structure of mammalian spermatozoa. En: Parkes AS, editor. *Marshall's physiology of reproduction*, vol. 1, 3<sup>a</sup> ed. London: Longmans. pp 1–129.

- Birkhead TR, Hunter FM (1990). Mechanisms of sperm competition. *Trends Ecol Evol* 5: 48-52.
- Birkhead TR, Martinez JG, Burke T, Froman DP (1999). Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proc R Soc B* 266: 1759-1764.
- Birkhead TR, Immler S, Pellat EJ, Freckleton RP (2006). The unusual sperm morphology of the Northern bullfinch *Pyrrhulopyrrhula*. *Auk* 123:383-392.
- Birkhead TR, Immler S (2007). Making sperm: design quality control and sperm competition. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65:175-81
- Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S (2009). *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective* Burlington, MA: Academic Press.
- Breed WG (1995). Spermatozoa of murid rodents from Africa: morphological diversity and evolutionary trends. *J Zool (Lond)* 237: 625–651.
- Breed WG (1997). Evolution of the spermatozoon in Australasian rodents. *Aust J Zool* 45: 459–478.
- Breed WG, Taylor J (2000). Body mass, testes mass, and sperm size in murine rodents. *J Mammal* 81: 758–768.
- Breed WG (2004). The spermatozoon of Eurasian murine rodents: its morphological diversity and evolution. *J Morphol* 261:52–69.
- Breed WG (2005). Evolution of the spermatozoon in muroid rodents. *J Morphol* 265: 271-290.
- Breed WG, Bauer M, Wade R, Thitipramote N, Suwajarat J y Yelland L (2007) Intra-individual variation in sperm tail length in murine rodents. *J Zool* 272: 299–304.
- Breed WG, Leigh CM, Aplin KP, Shanin AA, Avenant NL (2014). Morphological diversity and evolution of spermatozoon in the mouse-related clade of rodents. *J Morphol* 275 (5): 540-7.
- Brewer LR (1999). Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science* 286: 120-123.
- Briskie JV, Montgomerie R (1992). Sperm size and sperm competition in birds. *Proc. Roy. Soc. B* 247: 89–95.
- Briskie JV, Montgomerie R (1993). Patterns of sperm storage in relation to sperm competition in passerine birds. *Condor* 95: 442–454.

- Briskie JV, Montgomerie R, Birkhead TR (1997). The evolution of sperm size in birds. *Evolution* 51: 937–945.
- Bookstein FL (1989). “Size and shape”: A comment on semantics. *Syst Zool* 38: 173–190.
- Bookstein FL (1991). *Morphometric Tools for Landmark Data*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bookstein FL (1996). Standard formula for the uniform shape component in landmark data. En: Marcus LF, Corti M, Loy A, Naylor GJP, Slice DE, editores. *Advances in Morphometrics*. New York: Plenum Press, pp 153-158.
- Bookstein FL (1997). Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Med Image Anal* 1: 225-243.
- Bookstein FL, Gunz P, Mitteroecker P, Prossinger H, Schaefer K, Seidler H (2003). Cranial integration in Homo: singular warps analysis of the midsagittal plane in ontogeny and evolution. *J Hum Evol* 44: 167-187.
- Burrueel VR, Yanagimachi R, Whitten WK (1996). Normal mice develop from oocytes injected with spermatozoa with grossly misshapen heads. *Biol Reprod* 55: 709-714.
- Byrne PG, Simmons LW, Roberts JD (2003). Sperm competition and the evolution of gamete morphology in frogs. *Proc. Roy. Soc. B* 270: 2079–2086.
- Cardullo RA, Baltz JM (1991). Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motil Cytoskeleton* 19: 180–188.
- Calhim S, Immler S, Birkhead TR (2007). Postcopulatory sexual selection is associated with reduced variation in sperm morphology. *PLoS One* 2: e413.
- Calhim S, Double MC, Margraf N, Birkhead TR, Cockburn A (2011). Maintenance of sperm variation in a highly promiscuous wild bird. *PLoS One* 6: e28809.
- Cho C, Jung-Ha H, William WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM (2003). Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 69: 211–217.
- Clark AG, Begun DJ, Prout T (1999). Female x male interaction in *Drosophila* sperm competition. *Science* 283: 217-220.
- Cohen J (1977). *Reproduction*. London: Butterworths
- Cowles RB (1958). The evolutionary significance of the scrotum. *Evolution* 12: 417–418.



- Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R (2002). Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev* 61:519–527.
- Crenshaw HC (1996). A new look at locomotion in microorganisms: rotatin and translating. *Am Zool* 36: 608-618
- Cummins JM, Woodall PF (1985). On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fertil* 75: 153-175.
- Dallai R, Lupetti P, Mencarelli C (2006). Unusual axonemes of hexapod spermatozoa. *Int Rev Cytol* 254: 45–99.
- Darwin C (1871). *The descent of man, and selection in relation to sex*. John Murray, London.
- Davis RO, Gravance CG (1994). Consistency of sperm morphology classification methods. *J Androl* 15: 83-91.
- DeBry RW, Sagel RM. 2001. Phylogeny of Rodentia (Mammalia) inferred from the nuclear-encoded gene IRBP. *MolPhylogenetEvol* 19:290–301.
- Dewsbury DA (1982). Ejaculate cost and male choice. *Am Nat* 119: 601–610.
- Drake AG, Klingenberg CP (2008). The pace of morphological change: Historical transformation of skull shape in St. Bernard dogs. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 275: 71–76.
- Dryden IL, Mardia KV (1998). *Statistical shape analysis*. Chichester, Wiley.
- Dybas LK, Dybas HS (1981). Coadaptation and taxonomic differentiation of sperm and spermathecae in featherwing beetles. *Evolution* 35: 168-174.
- Eddy EM, O'Brien DA (1994). The spermatozoon. En: Knobil E, Neill JD, editores. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, pp 29–77.
- Eddy, EM (2002). Male germ cell gene expression. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 103–128.
- ElgetiJ, Kaupp UB, Gompper G (2010). Hydrodynamic of sperm near surfaces. *Biophys J* 99: 1018-1026.
- Escoufier Y (1973). Le traitement des variables vectorielles. *Biometrics* 29:751–760.
- Fabre PH, Hautier L, Dimitrov D, Douzery EJP (2012). A glimpse on the pattern of rodent diversification: a phylogenetic approach. *BMC Evol Biol* 12:88.
- Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM (1971). Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Dev Biol* 26: 220–251.
- Firman RC, Simmons LW (2009). Sperm competition and the evolution of the sperm hook in house mice. *J Evol Biol* 12: 2505-2511.

- Firman, RC, Simmons, LW (2010). Sperm midpiece length predicts sperm swimming velocity in house mice. *Biol Lett* 6: 513-516.
- Firman RC, Cheam LY, Simmons LW (2011). Sperm competition does not influence sperm hook morphology in selection lines of house mice. *J Evol Biol* 24: 856-862.
- Fisher HS, Hoekstra HE (2010). Competition drives cooperation among closely related sperm of deer mice. *Nature* 463: 801-803
- Fitzpatrick JL, Montgomerie R, Desjardins JK, Stiver KA, Kolm N, Balshine S (2009) Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 1128-1132.
- Fitzpatrick JL, Garcia-Gonzalez F, Evans JP (2010). Linking sperm length and velocity: the importance of intramale variation. *Biol Lett* 6: 797-799.
- Fitzpatrick JL, Baer B (2011). Polyandry reduces sperm length variation in social insects. *Evolution* 65 (10): 3006-3012.
- Flaberty SP, Breed WG, Sarafis V (1983). Localisation of actin in the sperm head of the plains mouse, *Pseudomys australis*. *J Exp. Zool.* 225: 497-500.
- Frazén A (1956). On spermiogenesis, morphology of the spermatozoan, and biology of fertilization among invertebrates. *Zool Bird Uppsala* 31: 355-480.
- Franzén A (1977). Sperm structure with regard to fertilization biology and phylogenetics. *En Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft en Viena*, pp 123–138.
- Fraser LR (1983). Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and whiplash motility in vitro. *J Reprod Fertil* 69, 539-553.
- Friend GF (1936). The sperms of British Muridae. *Q J Microsc Sci* 78: 419–443.
- Gaffney EA, Gadelha H, Smith DJ, Blake JR, Kirkman-Brown JC (2011). Mammalian sperm motility: observation and theory. *Annu. Rev. Fluid Mech* 43:501-28
- Gage, MJG (1994). Associations between body size, mating pattern, testis size, and sperm lengths across butterflies. *Proc. Roy. Soc. B* 258: 247–254.
- Gage MJG, Macfarlane CP, Yeates S, Ward RG, Searle JB, Parker GA (2004). Spermatozoaltraits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Curr Biol* 14: 44-47.
- García-González F, Simmons LW (2005). Sperm viability matters in insect sperm competition. *Curr. Biol.* 15 (3): 271-5.

- García-Herreros M, Aparicio IM, Barón FJ, GarcíaMarín LJ, Gil M (2006). Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Int J Androl* 29: 553-563.
- Gillies EA, Cannon RM, Green RB, Pacey AA (2009). Hydrodynamic propulsion of human sperm. *J Fluid Mech* 625: 445-474.
- Goldstein SF (1977). Asymmetric waveforms in Equinoderm sperm flagella. *Journal of Experimental Biology* 71: 157-170.
- Gomendio M, Roldan ERS (1991). Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proc Roy Soc B* 243: 181-185.
- Gomendio M, Roldan ERS (1993). Co-evolution between male ejaculates and female reproductive biology in eutherian mammals. *Proc Roy Soc B* 252: 7-12.
- Gomendio M, Harcourt AH, Roldan ERS (1998). Sperm competition in mammals. En: Birkhead TR, Møller AP, editors. *Sperm Competition and Sexual Selection*. San Diego: Academic Press, pp 667-755.
- Gomendio M, Malo AF, Garde J, Roldan ERS (2007). Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction* 134: 19-29.
- Gomendio M, Roldan ERS (2008). Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int J Dev Biol* 52: 439-447.
- Gomendio M, Tourmente M, Roldan ERS (2011). Why mammalian lineages respond differently to sexual selection: metabolic rate constrains the evolution of sperm size. *Proc R Soc B* 278: 3135-3141.
- Gómez Montoto L, Magaña C, Tourmente M, Martín-Coello J, Crespo C, Luque-Larena JJ, Gomendio M, Roldan ERS (2011a). Sperm competition, sperm numbers and sperm quality in Muroid rodents. *Plos ONE* 6: e18173.
- Gómez Montoto L, Varea Sánchez M, Tourmente M, Martín-Coello J, Luque-Larena JJ, Roldan ERS, Gomendio M (2011b). Sperm competition differentially affects swimming velocity and size of spermatozoa from closely related muroid rodents - Head first. *Reproduction* 142: 819-830.
- Goodall CR (1991). Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *Journal of the Royal Statistical Society B* 53: 285-339.
- Gordon DH, Watson CRB (1986). Identification of cryptic species of rodents *Mastomys*, *Aethomys* and *Saccostomus* in the Kruger National Park. *S Afr J Zool* 21: 95-99.

- Gower J (1975). Generalized procrustes analysis. *Psychometrika* 40: 33–51.
- Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Casey PJ (1996). Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology* 46: 1205-1215.
- Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado J, Sanz J, Soler C (2008). Morphometric classification of Spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Anim Reprod Sci* 103: 374-378.
- Higginson DM, Miller KB, Segraves KA, Pitnick S (2012). Female reproductive tract form drives the evolution of complex sperm morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 4538-4543.
- Holman L, Freckleton RP, Snook RR (2008). What use is an infertile sperm? A comparative study of sperm heteromorphic *Drosophila*. *Evolution* 62: 374-85.
- Holt WV y Palomo MJ (1996). Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. *Reprod Fertil Dev* 8: 219-230.
- Hosken DJ, Garner TWJ, Blanckenhorn WU (2003). Asymmetry, testis and sperm size in yellow dung flies. *Funct Ecol* 17: 231–236.
- Hunter RHF (1988). *The fallopian tubes. Their role in fertility and infertility*. Springer-Verlag. Berlin.
- Hunter FM, Birkhead TR (2002). Sperm viability and sperm competition in insects. *Curr Biol* 12: 121–123.
- Humphries S, Evans JP, Simmons LW (2008). Sperm competition linking form to function. *BMC Evol Biol* 25: 319.
- Immler S, Moore HDM, Breed WG, Birkhead TR (2007). By hook or by crook? Morphometry, competition and cooperation in rodent sperm. *PLoS One* 2:e170.
- Immler S, Calhim S, Birkhead TR (2008). Increased postcopulatory sexual selection reduces the intramale variation in sperm design. *Evolution* 62: 1538-1543.
- Immler S, Gonzalez-Voyer A, Birkhead TR (2012). Distinct evolutionary patterns of morphometric sperm traits in passerine birds. *Proc R Soc B* 279: 4174-4182.
- Inaba K (2011). Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod* 17: 524–538.
- Jago JP, Washbrook NP, Hudson EA (1986). Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis. *J Clin Pathol* 39: 1347-1352.

- Jamieson BMG (1987). *The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa*. Cambridge. University Press.
- Jeulin C, Soufir JC (1992). Reversible intracellular ATP changes in intact rat spermatozoa and effects on flagellar sperm movement. *Cell Motil Cytoskeleton* 21: 210-222.
- Jonke E, Schaefer K, Freudenthaler JW, Prossinger H, Bookstein FL (2003). A cephalometric comparison of skulls from different time periods the Bronze Age, the 19<sup>th</sup> century and the present. *Coll Antropol* 27: 789-801.
- Katz DF, Overstreet JW, Samuels SJ, Niswander PW, Bloom TD, Lewis EL (1986). Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J Androl* 7: 203-210.
- Katz DF, Drobnis EZ (1990). Analysis and interpretations of the forces generated by spermatozoa. En Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, editors. *Fertilization in mammals. Sero Symposia*, pp 125-137.
- Kenagy GJ, Trombulack SC (1986). Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J Mammal* 67: 1-22.
- Kendall D (1977) The diffusion of shape. *Adv Appl Probab* 9: 428-430.
- Kim E, Waters SH, Hake LE, Hecht NB (1989). Identification and developmental expression of a smooth muscle gamma-actin in post-meiotic male germ cells of mice. *Mol Cell Biol* 9: 1875–1881.
- Kim S, Karilla JS, (1991). *Microhydrodynamics: Principles and Selected Applications*. Butterworth Heinemann.
- Kleene KC (2001). A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech Dev* 106: 3–23.
- Kleven O, Laskemoen T, Fossoy F, Robertson RJ, Lijfeld JT (2008). Intraspecific variation in sperm length is negatively related to sperm competition in passerine birds. *Evolution* 62: 494-499.
- Kleven O, Fossoy F, Laskemoen T, Robertson RJ, Rudolfson G, Lijfeld JT (2009). Comparative evidence for the evolution of sperm swimming speed by sperm competition and female sperm storage duration in passerine birds. *Evolution* 63: 2466-2473.
- Klingenberg CP (1998). Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biol Rev* 73: 79–123.

- Klingenberg CP, McIntyre GS and Zaklan SD (1998). Left-right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. *Proc R Soc B* 265: 1255-1259.
- Klingenberg CP, McIntyre GS (1998). Geometric morphometrics of development instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52: 1363-1375.
- Klingenberg CP (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *MolEcol Res* 11: 353-357.
- Krzanowska H, Styrna J, Wabik-Sliz B (1995). Analysis of sperm quality in recombinant inbred mouse strains: correlation of sperm head shape with sperm abnormalities and with the incidence of supplementary spermatozoa in the perivitelline space. *J ReprodFertil* 104: 347-354.
- LaMunyon C, Ward S (1999). Evolution of sperm size in nematodes: sperm competition favours larger sperm. *Proc R Soc B* 266: 263-7.
- Landry C, Geyer LB, Arakaki Y, Uehara T, Palumbi SR (2003). Recent speciation in the Indo-West Pacific: rapid evolution of gamete recognition and sperm morphology in cryptic species of sea urchin. *Proc R Soc B* 270: 1839-1847.
- Laskemoen T, Albrecht T, Bonisoli-Alquati, Jaroslav C, Lope F, Hermosell IG, Johannessen LE, Kleven O, Marzal A, Mousseau TA, Møller AP, Robertson RJ, Rudolfson, Saino N, Vortman Y, Lifjeld JT (2012). Variation in sperm morphometry and sperm competition among barn swallow (*Hirundorustica*) populations. *Behav Ecol Sociobiol* 67: 304-309.
- Lifjeld JT, Laskemoen T, Kleven O, Albrecht T, Robertson RJ (2010). Sperm length variation as a predictor of extrapair paternity in passerine birds. *PLoS One* 5: e13456.
- Lüke L, Vicens A, Tourmente M, Roldan ERS (2014a). Evolution of protamine genes and changes in sperm head phenotype in rodents. *Biol Reprod* 90: 67
- Lüke L, Campbell P, Varea Sanchez M, Nachman M, Reoldan ERS (2014b). Sexual selection on protamine and transition nuclear protein in mouse species. *Proc R Soc B* 281:1783
- Luo J, Gupta V, Kern B, Tash JS, Sanchez G, Blanco G, Kinsey WH (2012). Role of FYN kinase in spermatogenesis: defects characteristic of Fyn-null sperm in mice. *Biol Reprod* 86: 1-8.

- Lüpold S, Calhim S, Immler S, Birkhead TR (2009). Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proc R Soc B* 276: 1175-1181.
- Malo AF, Garde JJ, Soler AJ, Garcia AJ, Gomendio M, Roldan ERS (2005). Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol Reprod* 72: 822-829.
- Malo AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ, Roldan ERS (2006). Sperm design and sperm function. *Biol Lett* 2: 246-249.
- Maree L, du Plessis SS, Menkveld R, Van der Horst G (2010). Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Hum Reprod* 44: 1369-1382.
- Maroto-Morales A, Ramón M, García-Álvarez O, Soler AJ, Esteso MC, Martínez-Pastor F, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ (2010). Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology* 73: 437-448.
- Martin-Coello J, Dopazo H, Arbiza L, Roldan ERS, Gomendio M (2009). Sexual selection drives weak positive selection in protamine genes and high promoter divergence, enhancing sperm competitiveness. *Proc R Soc B* 276: 2427-2436.
- Medarde N, Martínez-Vargas J, Sánchez-Chardi A, López-Fuster M J, Ventura J, (2013a). Effect of Robertsonian translocations on sperm head form in the house mouse. *Biol J Linn Soc* 110: 878-889.
- Medarde N, Muñoz-Muñoz F, López-fuster M J, Ventura J (2013b). Variational modularity at the cell level: insights from the sperm head of the house mouse. *BMC Evol Biol* 13: 179.
- Meistrich ML (1993). Nuclear morphogenesis during spermiogenesis. En: de Kretser DM, editor. *Molecular biology of the male reproductive system*. San Diego: Academic Press, pp 67-97.
- Mendoza-Lujambio I, Burfeind P, Dixkens C, Meinhardt A, Hoyer-Fender S, Engel W, Neesen J (2002). The *Hook1* gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (*azh*) mutant mouse. *Hum Mol Genet* 11: 1647-1658.
- Meschede D, Keck C, Zander M, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E (1993). Influence of three different preparation techniques on results of human sperm morphology analysis. *Int J Androl* 16: 362-369.

- Miki K (2007). Energy metabolism and sperm function. En: Roldan ERS, Gomendio M editors. Spermatology. Nottingham: Nottingham University Press. pp 309-325.
- Minder AM, Hosken DJ, Ward PI (2005). Co-evolution of male and female reproductive characters across the *scathophagidae* (diptera). J Evol Biol 18:60-9.
- Møller AP (1998). Sperm competition and sexual selection. En T.R.Birkhead, APMøller, editors. Sperm competition and sexual selection. San Diego: Academic Press, pp: 56-90.
- Montgomerie R, Fitzpatrick JL (2008). Testes, sperm, and sperm competition. En: Jamieson BGM, editor. Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes. Enfield: Science Publishers, Inc.
- Moore H, Dvorakova K, Jenkins N, Breed WG (2002). Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. Nature 418: 174-177.
- Morrow E H, Gage MJG (2000). The evolution of sperm length in moths. Proc RSoc B 267: 307–313.
- Morrow EH, Gage MJG (2001a). Artificial selection and heritability of sperm length in *Gryllus bimaculatus*. Heredity 87: 356–362.
- Morrow EH, Gage MJG (2001b). Consistent significant variation between individual males in spermatozoalmorphometry. J Zool (Lond) 254:147–153.
- Mortimer D (1994). Practical laboratory andrology, chapter 7. En Computer-Aided Sperm Analysis. Oxford University Press.
- Moruzzi JF, Wyrobek AJ, Mayal BH, Gledhill BL (1988). Quantification and classification of human sperm morphology by computer assisted image analysis. Fertil Steril 50: 142-152.
- Namekawa SH, Park PJ, Zhang, LF, Shima JE, McCarrey, JR, Griswold MD, Lee JT (2006). Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. Curr Biol 16: 660–667.
- Oliva R (2006). Protamines and male infertility. Hum Reprod Update. 12(4):417-35.
- O'Higgins P (2000). The study of morphological variation in the hominid fossil record: biology, landmarks and geometry. J Anat 197: 103-120.
- Ostermeier GC, Sargeant GA, Yandell BS, Evenson DP, Parrish JJ (2001). Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. J Androl 22: 595–603.
- Palmer AR (1994). Fluctuating asymmetry analyses: a primer. En: Markow T A, editor. Developmental instability: its origins and implications. Dordrecht: Kluwer, pp 335-364.
- Parker GA (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in insects. Biol. Rev. 45: 525-567.



- Parker GA (1984). Sperm competition and the evolution of animal mating strategies. En: Smith RL, editor. Sperm competition and the evolution of animal mating systems. Orlando: Academic Press, pp. 1-54.
- Parker GA (1993). Sperm competition games – sperm size and sperm number under adult control. *Proc R Soc B* 253: 245-254.
- Parker GA (1998). Sperm competition and the evolution of ejaculates: Towards a theory base. En: Birkhead TR, Møller AP, editores. Sperm Competition and Sexual Selection. New York: Academic, pp 3–54.
- Pitnick S, Miller GT, Schneider K, Markow TA (2003). Ejaculate–female coevolution in *Drosophila mojavensis*. *Proc R Soc B* 270: 1507–1512.
- Pitnick S, Brown WD, Bjork A, Schneider K (2004). No evidence that polyandry benefits female in *Drosophila Melanogaster*. *Evolution*. 58(6):1242-50.
- Pitnick S, Hosken DJ, Birkhead TR (2009). Sperm morphological diversity. En: TR Birkhead, DJ Hosken, S Picknick, editors. Sperm Biology: An Evolutionary Perspective. Burlington, MA: Academic Press, pp 69-149.
- Pizzari T, Parker GA (2009). Sperm competition and sperm phenotype. En Birkhead TR, Hosken DJ y Pitnick S, editores. Sperm biology an evolutionary perspective. San Diego: Academic Press, pp: 205-244.
- Presgraves DC, Baker RH, Wilkinson GS (1999). Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proc R Soc Lond B* 266: 1041-1047.
- Ramón M, Soler AJ, Ortiz JA, Garcia-Alvarez O, Maroto-Morales A, Roldan ERS, Garde JJ (2013). Sperm population structure and male fertility: An-intraespecific study of sperm design and velocity in red deer. *Biol Reprod* 89 (5): 110.
- Ramm SA, Parker GA, Stockley P (2005). Sperm competition and the evolution of male reproductive anatomy in rodents. *Proc R Soc B* 272: 949-955.
- Ricklefs RE, Miles DB (1994). Ecological and evolutionary inferences from morphology: an ecological perspective. En: Wainwright PC, Reilly SM, editores. Ecological morphology: integrative organismal biology. , Chicago: University of Chicago Press, pp 13–41.
- Ridell D, Pacey A, Whittington K (2005). Lack of compliance by UK andrology laboratories with World Health Organization recommendations for sperm morphology assessment. *Hum Reprod* 20: 3441-3445.

- Rijsselaere T, Van Soom A, Hoflack G, Maes D, de Kruif A (2004). Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology* 62: 1292-306.
- Rohlf FJ, Slice D (1990). Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst Zool* 39: 40-59.
- Rohlf FJ, Corti M (2000). The use of two-block partial least-squares to study covariation in shape. *Syst Biol* 49: 740–753.
- Roldan ERS, Gomendio M, Vitullo A (1992). The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: female selection and sperm competition. *Biol Rev* 67: 551-593.
- Roldan ERS, Gomendio M (2009). Sperm and conservation. En: Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S, editores. *Sperm biology: An evolutionary perspective*. Burlington: Academic Press. pp. 539-564.
- Rothschild Lord (1963). Non-random distribution of bull spermatozoa in a drop of sperm suspension. *Nature* 198: 1221-1222.
- Rowe M, Pruett-Jones S (2011). Sperm competition selects for sperm quality and quantity in the Australian Maluridae. *PlosOne* 25: e15720.
- Russell LD, Russell JA, MacGregor GR, Meistrich ML (1991). Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. *Am J Anat* 192: 97–120.
- Sailer BL, Jost LK, Evenson DP (1996). Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 24: 167-173.
- Sandera M, Andrilikova P, Frolikova M, Stopka P (2011). Changes in the curvature of sperm apical hook in murine rodents. *Biologia* 66: 916-921.
- Sandera M, Albrecht T, Stopka P (2013). Variation on apical hook length reflects the intensity of sperm competition in murine rodents. *PLoS One* 8: e68427.
- Schärer L, Littlewood DTJ, Waeschenbach A, Yoshida W, Vizoso DB (2011). Mating behaviour and the evolution of sperm design. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1490-1495.
- Severa L, Máchal L, Svabova L, Mamica O (2010). Evaluation of shape variability of stallion sperm heads by means of image analysis and Fourier descriptors. *Anim Reprod Sci* 119: 50-55.

- Silberglied RE, Shepherd JG, Dickinson JL (1984). Eunuchs: the role of apyrene sperm in lepidoptera? *Am Nat* 123: 255–265.
- Simpson JL, Humphries S, Evans JP, Simmons LW, Fitzpatrick JL (2013). Relationships between sperm length and speed differ among three internally and three externally fertilizing species. *Evolution* 68: 92-104.
- Simmons LW. Sperm competition and its evolutionary consequences in insects. Princeton: Princeton University Press; 2001.
- Simmons LW, Fitzpatrick JL (2012). Sperm wars and the evolution of male fertility. *Reproduction*. 144: 519-34.
- Shi QX, Roldan ERS (1995). Bicarbonate/CO<sub>2</sub> is not required for zonapellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biol Reprod* 52: 540-546.
- Short RV (1981). In: *Reproductive Biology of the Great Apes* (Graham CE Eds). Academic Press, New York.
- Smith TT, Yanagimachi R (1990). The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biol Reprod* 42: 450-457
- Smith DJ, Blake JR (2009). Surface accumulation of spermatozoa: a fluid dynamics phenomenon. *Math Scie* 34: 74-87.
- Snook RR (2005). Sperm competition: not playing by the numbers. *Trends Ecol Evol* 20: 46-53.
- Soler C, Gadea B, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Estes MC, Núñez J, Moreira PN, Núñez M, Gutiérrez R, Sancho M, Garde JJ (2005). Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology* 64: 1236-4123.
- Soulsbury CD (2010). Genetic patterns of paternity and testes size in mammals. *PLoS ONE* 5: e9581.
- Suarez SS (1987). Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations *in situ*. *Biol Reprod* 36: 203-210.
- Suarez SS, Drost M, Redfern K, Gottlieb W (1990). Sperm motility in the oviduct. In *Fertilization in mammals*, pp. 111-124. Serono Symposia. Norwell.
- Suarez SS (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 52: 455–462.

- Storey BT (2008). Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int J Dev Biol* 52: 427-437.
- Tamuli MK, Watson PF (1994). Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim Reprod Sci* 35: 247-254.
- Till-Bottraud I, Joly D, Lachaise D, Snook RR (2005). Pollen and sperm heteromorphism: convergence across kingdoms? *J Evol Biol* 18: 1–18.
- Thompson DAW (1961). *On growth and form*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Thurston LM, Watson PF, Holt WV (1999). Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. *J Reprod Fert* 117: 271–280.
- Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV (2001). Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl* 22: 382-394.
- Trivers RL (1972). Parental investment and sexual selection. En Campbell B, editor. *Sexual selection and the descent of man, 1871-1971*. Chicago: Aldine Press, pp 136-179.
- Tourmente M, Gomendio M, Roldan ERS (2011a). Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evol Biol* 11: 12.
- Tourmente M, Gomendio M, Roldan ERS (2011b). Mass-specific metabolic rate and sperm competition determine sperm size in marsupial mammals. *PLoS One* 6: e21244
- Tourmente M, Rowe M, González-Barroso MM, Rial E, Gomendio M, Roldan ER (2013). Postcopulatory sexual selection increases ATP content in rodent spermatozoa. *Evolution* 67: 1838-1846.
- Turner RM (2003). Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J Androl* 24: 790-803.
- Van der Horst G, Maree L (2009). Spermblue: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotech Histochem* 84: 299-308.
- Van der Horst G, Maree L, Kotzé SH, O'Riain MJ (2012). Sperm structure and motility in the eusocial naked mole-rat, *Heterocephalus glaber*: a case of degenerative orthogenesis in the absence of sperm competition? *BMC Evol Biol* 11:351.

- Van der Horst G, Maree L (2013). Sperm form and function in the absence of sperm competition. *Mol Reprod Dev* 81: 204-216.
- Varea Sánchez M, Bastir M, Roldan ERS (2013). Geometric morphometric of rodent sperm head shape. *Plos One* 8(11):e80607
- Vitullo AD Roldan ERS, Merani MS (1988). On the morphology of spermatozoa of tuco-tucos, *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae): New data and its implications for the evolution of the genus. *J Zool* 215: 675-683.
- Ward MA (2005). Intracytoplasmic sperm injection effects in infertile *azh* mutant mice. *Biol Reprod* 73: 193-200.
- Ward MA, Burgoyne PS (2006). The effects of deletions of the mouse Y chromosome long arm on sperm function-intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-based analysis. *Biol Reprod* 74: 652-658.
- Watson PF (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec* 97: 12-15.
- Wedell N, Gage MJG, Parker GA (2002). Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends Ecol Evol* 17: 313–314.
- Wilson D, Reeder D (2005). *Mammal species of the world*. Baltimore: University Press, 3<sup>a</sup> edición.
- Wooley D (2003). Motility of spermatozoa at surfaces. *Reproduction* 126: 259-270.
- Wyrobek AJ, Bruce WR (1975). Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 4425-4429.
- Wyrobek AJ, Gordon LA, James G, Burkhart JG, Francis MW, Kapp Jr RW, Letz G, Malling HV, Topham JC, Whorton MD (1983). An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut Res* 115: 1-72.
- Yan GJ, He XK, Cao ZD, FU SJ (2013). An interspecific comparison between morphology and swimming performance on cyprinids. *J Evol Biol* 26: 1802-1815.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill JD, editores. *The physiology of reproduction*, 2<sup>a</sup> ed. Nueva York: Raven Press. pp 189–317.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL (2004). *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.