



Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultat de Biociències  
Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia  
Unitat de Zoologia

## Tesis doctoral

**La zona de polimorfismo cromosómico  
'Barcelona' de *Mus musculus domesticus*  
Schwarz y Schwarz, 1943: dinámica espacio-  
temporal de su estructura y efecto de las fusiones  
robertsonianas sobre la espermatogénesis**



**Núria Estel Medarde González**

**2013**





Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultat de Biociències  
Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia  
Unitat de Zoologia

Tesis doctoral

**La zona de polimorfismo cromosómico 'Barcelona' de  
*Mus musculus domesticus* Schwarz y Schwarz, 1943:  
dinámica espacio-temporal de su estructura y efecto  
de las fusiones robertsonianas sobre la  
espermatogénesis**

Memoria de tesis doctoral presentada por:

**Núria Estel Medarde González**

Para optar al grado de Doctor en Biología.

Con el visto bueno de los directores de la tesis:

Jacint Ventura Queija

María José López Fuster

Bellaterra, abril de 2013



A mi familia, muy especialmente a mi padre...





---

Resumen/Abstract.....	1
Capítulo 1. Introducción general.....	5
1.1. Biología del ratón doméstico.....	6
1.2. Reorganizaciones cromosómicas en <i>Mus musculus domesticus</i> .....	7
1.2.1. Fusiones robertsonianas.....	8
1.2.2. Translocación recíproca de brazos cromosómicos enteros (WARTs).....	11
1.3. Fijación de translocaciones en poblaciones naturales.....	11
1.4. Contacto entre razas cromosómicas.....	15
1.5. El sistema robertsoniano 'Barcelona'.....	16
1.6. Objetivos.....	17
Capítulo 2. Material y métodos generales.....	21
2.1. Captura de los ejemplares.....	22
2.2. Obtención del cariotipo.....	22
2.3. Obtención de datos morfométricos y biológicos.....	24
Capítulo 3. Variación espacio-temporal del sistema robertsoniano 'Barcelona'.....	26
3.1. Introducción.....	27
3.1.1. Objetivos.....	28
3.2. Material y métodos.....	28
3.3. Resultados.....	32
3.4. Discusión.....	43



---

Capítulo 4. Apoptosis y alteraciones ultraestructurales en la espermatogénesis	48
4.1. Introducción	49
4.1.1. La espermatogénesis	49
4.1.2. Espermatogénesis y apoptosis	51
4.1.2.1. Inducción al proceso apoptótico	53
4.1.2.2. Morfología celular de las células apoptóticas	54
4.1.2.3. Regulación génica de la apoptosis	55
4.1.3. Translocaciones Rb y apoptosis	56
4.1.4. Antecedentes en la zona de estudio	57
4.1.5. Objetivos	58
4.2. Material y métodos	58
4.3. Resultados	65
4.4. Discusión	77
Anexo 1	83
Capítulo 5. Variación morfológica de la cabeza del espermatozoide	87
5.1. Introducción	88
5.1.1. Objetivos	90
5.2. Material y métodos	91
5.3. Resultados	94
5.4. Discusión	102
Capítulo 6. Modularidad en la cabeza del espermatozoide	107
6.1. Introducción	108





---

6.1.1. Estructuras morfológicas complejas y modularidad.....	108
6.1.2. Modularidad, evolución y mutaciones genéticas.....	110
6.1.3. Modularidad y estructuras unicelulares.....	111
6.1.4. Compartimentación en la cabeza del espermatozoide.....	112
6.1.5. Objetivos.....	114
6.2. Material y métodos.....	114
6.3. Resultados.....	117
6.4. Discusión.....	121
Discusión general.....	125
Conclusiones.....	132
Bibliografía.....	135
Apéndices.....	174
Agraiments.....	195



---

## Resumen

En las inmediaciones de la ciudad de Barcelona existe una zona de polimorfismo robertsoniano (Rb) de ratón doméstico de Europa Occidental (*Mus musculus domesticus*) que abarca unos 5.000 km<sup>2</sup> y se halla rodeada por poblaciones cuyos individuos presentan un cariotipo estándar (St) de 40 cromosomas telocéntricos. En dicha zona se han detectado siete metacéntricos diferentes y animales Rb con números diploides comprendidos entre 27 y 40 cromosomas. El sistema robertsoniano 'Barcelona' (SRbB) representa un modelo único dentro del conjunto de las zonas Rb de *M. musculus domesticus* descritas hasta el momento puesto que carece de una raza cromosómica propia y el conjunto de cromosomas metacéntricos presenta una distribución geográfica clinal escalonada. Si bien al inicio de la presente investigación se disponía de información sobre la estructura de este sistema Rb, la dinámica de dispersión de los metacéntricos era totalmente desconocida. Con el objeto de evaluar posibles cambios en el proceso de fijación de las fusiones Rb y en el grado de aislamiento genético entre poblaciones de individuos con distintas características cariotípicas, se ha efectuado un estudio de la variación espacio-temporal de la estructura del SRbB entre los periodos 1996-2000 y 2008-2010. Asimismo, conociendo previamente la existencia de diferencias en el epitelio seminífero entre individuos St y Rb, se ha estudiado el posible efecto de las translocaciones Rb sobre el grado de muerte celular programada (apoptosis) durante los distintos estadios de la espermatogénesis. Finalmente, se ha investigado la relación entre las fusiones Rb y el tamaño y forma de la cabeza del espermatozoide, aplicando análisis de morfometría geométrica a imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, así como la existencia de modularidad variacional en dicha estructura.

Si bien se detectaron fluctuaciones locales en el grado de fijación de los metacéntricos, la estructura clinal de la zona permaneció relativamente estable a lo largo del periodo considerado. Este resultado indica la presencia de cierto grado de aislamiento genético entre poblaciones diferenciadas cariotípicamente y, por tanto, corrobora la existencia de barreras reproductivas entre ellas.

Los animales con números diploides reducidos mostraron un elevado grado de muerte en células germinales, irregularidades en los procesos de recombinación genética y alteraciones morfológicas en espermátidas redondas y en espermatozoides maduros. No obstante, la gran variabilidad detectada entre individuos sugiere que la magnitud de los

efectos ocasionados por las fusiones puede variar en función de las características estructurales de los cromosomas implicados en las fusiones y el grado de heterocigosis génica.

El análisis morfométrico de la cabeza del espermatozoide reveló diferencias substanciales entre grupos cromosómicos. Concretamente, se apreciaron divergencias en la morfología de las crestas ventrales entre espermatozoides de ejemplares St y Rb, y en la amplitud de la región post-acrosómica entre gametos de animales Rb. Dichas modificaciones podrían estar relacionadas con alteraciones en el proceso de citodiferenciación gamética debidas a las fusiones Rb.

Los análisis de modularidad indican que la cabeza del espermatozoide está dividida en tres módulos variacionales que coinciden con la compartimentación citoesquelética de la teca perinuclear. Si bien no se han detectado diferencias en el patrón de modularidad entre grupos cromosómicos, la disminución en los porcentajes de covariación entre pares de módulos en ejemplares Rb indica que las reordenaciones cromosómicas pueden inducir cambios en el mapa fenotípico-genotípico.



---

## Abstract

A Robertsonian (Rb) polymorphism zone of the western European house mouse (*Mus musculus domesticus*) is found in the vicinity of the city of Barcelona. This Rb system covers about 5.000 km<sup>2</sup> and is surrounded by populations whose individuals show a standard (St) karyotype of 40 telocentric chromosomes. In that area, up to seven different metacentrics and Rb specimens with diploid numbers ranging from 27 to 40 chromosomes have been detected. The 'Barcelona' Robertsonian system (BRbS) constitutes a unique model among the whole Rb systems described to date, since it lacks an exclusive chromosomal race and the set of metacentrics are geographically distributed following a staggered clinal pattern. Although information on the structure of the system was available at the beginning of the present research, little was known about the dispersal dynamics of the fusions throughout time. Thus, in order to evaluate possible changes in the fixation rates of the Rb fusions and in the degree of genetic isolation among populations differing in some karyotypic characteristics, a study on the spatio-temporal variation of the structure of the BRbS during the periods 1996-2000 and 2008-2010 has been carried out. Likewise, taking into account the finding of differences in the seminiferous epithelium between St and Rb specimens, the possible effect of Rb fusions on the rate of apoptotic germ cell death has been analyzed in all stages of the spermatogenesis in *M. musculus domesticus*. Finally, the relationship between the Rb fusions and the shape and size of the sperm head has been tested by applying geometric morphometrics to images obtained through a scanning electron microscope, a technique also applied to evaluate the existence of variational modularity in such sperm structure.

Although local fluctuations in the fixation rate of metacentrics were detected, the clinal structure of the zone remained relatively stable over the period considered. This result indicates the existence of certain degree of genetic isolation between populations karyotypically differentiated, which corroborates the existence of reproductive barriers among them.

Specimens with low diploid numbers showed a relevant signal of germ cell death, abnormalities in the genetic recombination and morphological alterations both in round spermatids and in mature spermatozooids. However, the great variability detected among individuals suggests that the magnitude of the effects caused by Rb fusions on

the seminiferous epithelium may vary depending on the structural characteristics of the chromosomes involved in the fusions and on the degree of genic heterozygosity.

Morphometric analysis on the sperm head revealed substantial differences among chromosomal groups. Divergences in the shape of the ventral spurs were detected between sperms from St and Rb specimens, while variation in the post-acrosomal width was also noticed among Rb gametes. These changes might be related to alterations in the gamete morphogenesis promoted by Rb fusions.

Modularity analyses indicated that the sperm head is divided into three variational modules that fit with the cytoskeleton compartmentalization of the perinuclear theca. Although no differences in the modularity pattern were found among chromosomal groups, the decrease in the covariation rates between pairs of modules in Rb specimens suggests that Rb fusions might induce changes in the phenotype-genotype map of individuals.



# Capítulo 1.



## Introducción general

---



## 1.1. Biología del ratón doméstico

El ratón doméstico, *Mus musculus domesticus* (Schwarz y Schwarz, 1943), es un roedor perteneciente a la familia Muridae (1130 especies en 261 géneros), de pequeño tamaño (12.5-29 g de masa corporal; Gosálbez, 1987), aspecto grácil y con pelaje marrón grisáceo en la región dorsal y ligeramente más claro en la ventral (Fig. 1.1.1). Si bien su patrón de actividad es principalmente crepuscular y nocturno, puede alternar ciclos de una a cuatro horas de descanso y vigilia,



Figura 1.1.1. Ejemplar de *M. musculus domesticus* capturado en la provincia de Barcelona.

estando esta última fase relacionada principalmente con la búsqueda de alimento (Gosálbez, 1987; Ballenger, 1999). Se trata de un animal cosmopolita fuertemente ligado a la presencia humana y que muestra una escasa capacidad competitiva en hábitats naturales. La formación de los primeros asentamientos humanos en el Neolítico, hace aproximadamente 10.000 años, fue determinante para la expansión geográfica de la especie puesto que supuso la aparición de un nuevo nicho ecológico que le permitió reducir la competencia por los recursos frente a otros roedores (Boursot y col., 1993). Posteriormente, la apertura de rutas comerciales favoreció su dispersión a nivel mundial gracias a su transporte pasivo a través de dichas vías (Auffray y col., 1990).

El comportamiento social de este roedor puede variar notablemente dependiendo de la disponibilidad de recursos alimenticios (Soriguer y López, 1986). En zonas con abundancia de alimento, el ratón doméstico tiende a formar grandes grupos familiares estables y sedentarios, donde el comportamiento agresivo es infrecuente entre congéneres y la actividad reproductora es continua durante prácticamente todo el año. Sin embargo, cuando el alimento escasea o la densidad poblacional es alta, los grupos



familiares se reducen, adoptando los individuos un comportamiento más agresivo y territorial. En estas circunstancias, aparecen medidas de regulación interna poblacional que pueden producir un retraso en la adquisición de la madurez sexual en las hembras jóvenes, ciclos anoéstricos o de larga duración en las hembras adultas, reabsorciones de los embriones y tamaños de camada pequeños, factores que provocan una disminución del potencial reproductivo y limitan el crecimiento demográfico (Golley y col., 1975). La dispersión, que afecta sobre todo a machos subadultos, constituye otro importante factor de control poblacional. Debido a la agresividad de los adultos, los individuos juveniles se ven obligados a emigrar a zonas periféricas y colonizar nuevos territorios. Este comportamiento determina que el ratón doméstico tenga una gran capacidad colonizadora, siendo pionero en la ocupación de asentamientos humanos respecto a otras especies de su mismo género, como por ejemplo el ratón moruno, *Mus spretus* (Walkova y col., 1989; Golley y col., 1975).

## 1.2. Reorganizaciones cromosómicas en *Mus musculus domesticus*

El género *Mus* es muy conservador en lo que se refiere a su cariotipo puesto que todas sus especies presentan una dotación estándar (St) de 40 cromosomas telocéntricos con un patrón de bandas G prácticamente idéntico. No obstante, la subespecie *M. musculus domesticus* muestra una gran variabilidad cariotípica debido a que mecanismos generadores de reorganizaciones cromosómicas, como las fusiones robertsonianas (Rb) y las translocaciones recíprocas de brazos cromosómicos enteros (WARTs), han permitido la introducción de cromosomas metacéntricos en sus poblaciones



Figura 1.2.1. Cariotipo (2n=33) de un individuo Rb de Vilanova i La Geltrú.





(Capanna y Redi, 1995; Hauffe y Piálek, 1997; Castiglia y Capanna, 1999) (Fig 1.2.1; Fig 1.2.2).

### 1.2.1. Fusiones robertsonianas

El tipo de translocación que se encuentra más frecuentemente en el reino animal es la fusión Rb (Robertson, 1916) en la que un cromosoma telocéntrico completo se adhiere a otro no homólogo por la región centromérica generando un único cromosoma metacéntrico (Fig. 1.2.2).

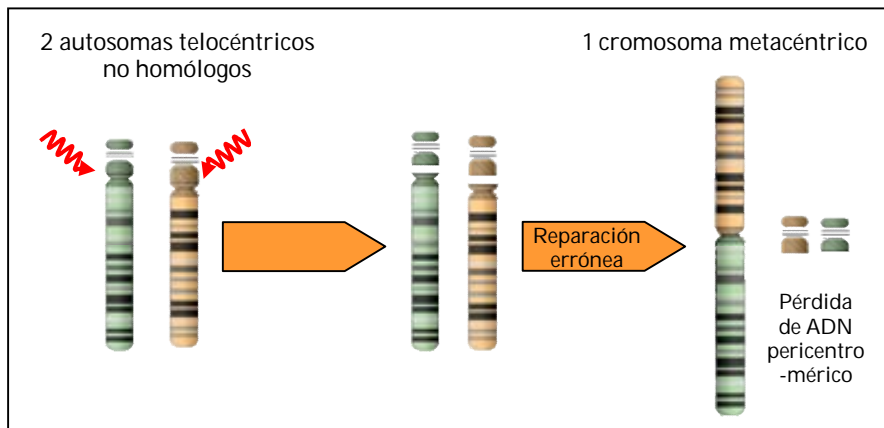


Figura 1.2.2. Esquema representativo de la formación de una translocación Rb.

Imagen modificada de *Clinical Tools, Inc.*

Cuando se produce la fusión de dos cromosomas homólogos con otros dos homólogos, para formar un par de metacéntricos estructuralmente similares, se dice que la fusión Rb se encuentra en estado homocigótico. Cuando es sólo uno de los dos cromosomas homólogos el que forma la fusión, se considera que el metacéntrico se halla en heterocigosis. A estos animales se les denomina heterocigotos simples, y si tienen más de un metacéntrico en heterocigosis, heterocigotos simples múltiples. No obstante, puede darse el caso que en un mismo par de homólogos, uno esté fusionado con un cromosoma y el otro con un tercer cromosoma. Este hecho da lugar a la formación de heterocigotos complejos en los que dos metacéntricos diferentes presentan un brazo



cromosómico en común (Figura 1.2.3). Este fenómeno, conocido como homología monobranquial (Britton-Davidian y col., 2002), ha sido objeto de múltiples estudios sobre recombinación puesto que da lugar a configuraciones meióticas muy complejas y poco estables (Searle, 1993).

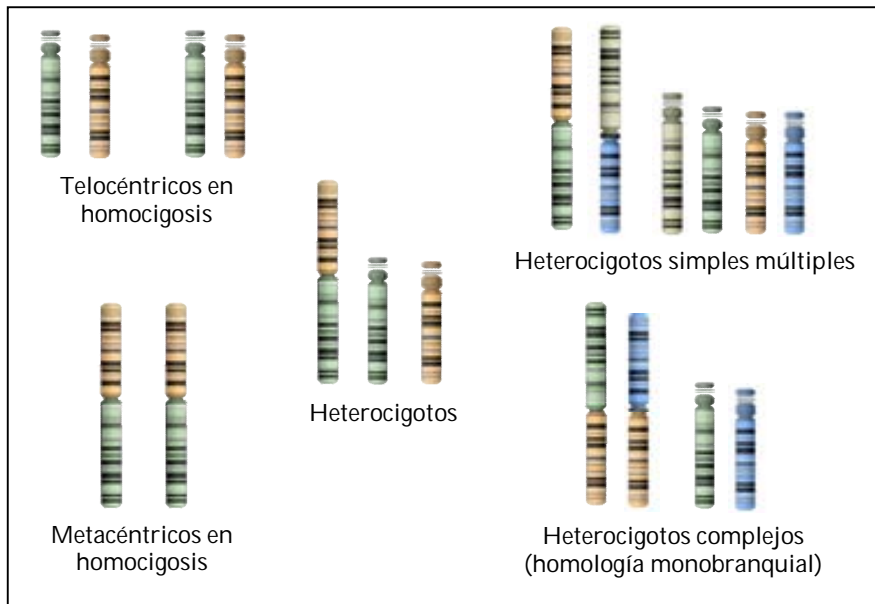


Figura 1.2.3. Esquema representativo de los tipos de heterocigosis estructural.

Imagen modificada de *Clinical Tools, Inc.*

Redi y col. (1990) y posteriormente Sage y col. (1993), propusieron un modelo de formación de metacéntricos fundamentado en tres condiciones principales:

1. Los centrómeros de los cromosomas implicados se deben agrupar durante la interfase meiótica.
2. La heterocromatina centromérica debe ser uniforme tanto en cantidad como en tipo. Así, la presencia de una elevada cantidad de secuencias repetidas en el ADN satélite permitiría que la heterocromatina centromérica de la hebra de un cromosoma aparejase bases con una secuencia similar a la de la hebra de un cromosoma no homólogo.



### 3. Uno de los cinetocoros funcionales debe ser inactivado.

Estudios más recientes han demostrado que los mecanismos que originan dicho tipo de translocaciones pueden variar dependiendo de la especie (Fagundes y Yonenaga-Yassuda, 1998; Pellegrino y col., 1999; Finato y col., 2000; Kasai y col., 2000; Castiglia y col., 2002; Ruiz-Herrera y col., 2002; Viera y col., 2004). Concretamente, análisis moleculares en ratón doméstico indican que las fusiones Rb se originan por una rotura en las secuencias de ADN satélite centroméricas de ambos cromosomas no homólogos implicados en la fusión (Garagna y col., 2001a, 2002). Este hecho hace inviable la aparición de fenómenos como la fisión cromosómica, ya que tanto las secuencias teloméricas como el material centromérico son esenciales para mantener la estabilidad y la integridad cromosómica (Slijepcevic, 1998; Zakian, 1997). Sin embargo, en otras especies de roedores (Viera y col., 2004) y en algunas de primates (Ruiz-Herrera y col., 2002) se ha observado que las secuencias teloméricas persisten en las regiones centroméricas durante el proceso de formación de los metacéntricos, resultado que sugiere la existencia de un mecanismo de fusión cromosómica diferente al observado en el ratón doméstico (Britton-Davidian y col., 2005).

En *M. musculus domesticus* todos los cromosomas, a excepción de los sexuales, intervienen en los procesos de translocación Rb (Piálek y col., 2005). No obstante, no todos los autosomas participan de manera equitativa, ya que, tal y como apuntan Gazave y col. (2003), los autosomas más pequeños tienden a fusionarse con menor frecuencia. Asimismo, la selección natural no actúa de manera similar para las distintas combinaciones de metacéntricos que puedan originarse. Estudios recientes indican que diversos factores, como las características genómicas y la morfología de los cromosomas involucrados en distintas fusiones Rb, pueden reducir la tasa de fijación de determinados metacéntricos a nivel poblacional (Castiglia y Capanna, 2000; Coan y col., 2005; Sans-Fuentes y col., 2007).



### 1.2.2. Translocación recíproca de brazos cromosómicos enteros (WARTs)

Diversas investigaciones han demostrado el importante papel que tienen las WARTs como mecanismos inductores de variabilidad cariotípica, especialmente en poblaciones naturales de ratón doméstico en las que aparecen translocaciones Rb (Capanna, 1982; Corti y col., 1986; Searle, 1993; Capanna y Redi, 1995; Hauffe y Piálek, 1997; Piálek y col., 2001, 2005). En las WARTs el intercambio de brazos cromosómicos se da tanto entre dos cromosomas metacéntricos como entre un metacéntrico y un telocéntrico, generándose así nuevos metacéntricos (Winking, 1986; Searle, 1993; Capanna y Redi, 1995; Garagna y col., 1995). Estudios filogenéticos sobre razas cromosómicas que ocupan regiones con un elevado polimorfismo postulan que los modelos que incluyen las WARTs como posible mecanismo de evolución cariotípica son más parsimoniosos que los que sólo se basan en la fusión y fisión céntrica, puesto que en las WARTs no es necesario la reconstrucción de un telómero o un centrómero (Hauffe y Piálek, 1997; Castiglia y Capanna, 1999). Así, este tipo de translocaciones cromosómicas puede haber ejercido un papel importante en la diversificación cariotípica de muchas poblaciones Rb de ratón doméstico (Hauffe y Piálek, 1997; Britton-Davidian y col., 2005).

### **1.3. Fijación de translocaciones en poblaciones naturales**

La fijación de una reordenación cromosómica en una población, en la que todos sus individuos presentan un cariotipo con un número y morfología constantes, es un hecho difícil de explicar cuando nos hallamos en un escenario natural en el que las fuerzas evolutivas tienden a actuar en contra de los heterocigotos. Se ha sugerido que factores diversos, como la endogamia, la deriva genética o la existencia de procesos que promuevan la fragmentación y el aislamiento poblacional, son determinantes para permitir la fijación de reorganizaciones cromosómicas en una población (Fraguedakis-Tsolis y col., 1997; Nachman y Searle, 1995; Piálek y col., 2005). Asimismo, se ha señalado la existencia de



factores adicionales que pueden influir también en este sentido. Según King (1993), la probabilidad de fijación de una reorganización cromosómica depende de la actuación, tanto de forma independiente como combinada, de: i) la tasa de aparición de la reorganización cromosómica en la población, que depende de la propensión innata de cada especie; ii) si el tipo de reorganización o su posición ocurre al azar, o bien si se halla asociada a algún tipo de selección; iii) si las reorganizaciones aparecen como entidades individuales, implicando la fijación de nuevos cambios de forma secuencial, o si aquéllas surgen simultáneamente como acontecimientos múltiples involucrando a dos o más cromosomas; y iv) si reorganizaciones concretas tienden a fijarse por azar o por distorsión del patrón de segregación.

Estudios efectuados en ratón de laboratorio han permitido detectar altas tasas de aparición de reorganizaciones Rb asociadas a la presencia de secuencias de ADN satélite similares entre autosomas que facilita la fusión de cromosomas no homólogos (Nachman y Searle, 1995). Del mismo modo, se ha estimado que la tasa de fijación de dichas translocaciones en poblaciones naturales es especialmente alta, siendo al menos dos órdenes de magnitud mayor que la detectada en muchos mamíferos (Nachman y col., 1994; Nachman y Searle, 1995). Asimismo, se ha observado que en poblaciones de ratón doméstico los metacéntricos suelen ir acompañados de otros metacéntricos a lo largo de zonas geográficas concretas (Boursot y col., 1993). Esta circunstancia no sólo sugiere la existencia de una elevada frecuencia de mutación (Nachman y Searle, 1995), sino también una alta tasa de fijación, posiblemente secuencial, de las distintas reorganizaciones (Capanna y col., 1977). En consecuencia, no es sorprendente que en algunas poblaciones, en las que además de estos factores inherentes a la subespecie se presente un cierto grado de aislamiento y unas altas tasas de endogamia, ocurra con cierta frecuencia la aparición de polimorfismos cromosómicos. Gropp y col. (1969) describieron por vez primera la presencia de fusiones Rb en una población de ratón doméstico en 'Val di Poschiavo' (Suiza). Estos animales presentaban un total de siete translocaciones Rb [Rb(1.3), Rb(4.6), Rb(5.15), Rb(8.12), Rb(9.14), Rb(11.13), Rb(16.17)] y números



diploides ( $2n$ ) de hasta 26 cromosomas. Estudios posteriores, demostraron que esta reducción en el número cromosómico, atribuible a la presencia de fusiones Rb, no estaba limitada a 'Val di Poschiavo', sino que también se extendía a otras poblaciones de Italia (Capanna y col., 1976), Suiza (Gropp y col., 1972), Bélgica (Hübner y col., 1985; Bauchau y col., 1990), Escocia (Broker, 1982), Dinamarca (Fel-Clair y col., 1996) y España (Adolph y Klein, 1981; Gündüz y col., 2001; Sans-Fuentes, 2004), entre otras. Asimismo, Capanna y col. (1974) observaron que algunas de las poblaciones Rb descritas presentaban una cierta proximidad geográfica y compartían determinadas combinaciones de metacéntricos. Este hecho les condujo a denominar como 'sistemas Rb' a aquellos grupos de poblaciones Rb con un origen evolutivo aparentemente común. Posteriormente, el hallazgo de agrupaciones de individuos con un mismo juego de metacéntricos en homocigosis fijado, o prácticamente fijado, localizados en un área geográfica restringida dio origen al concepto de 'raza cromosómica' (Hausser y col., 1994). Sin embargo, debido a que algunas de las poblaciones metacéntricas no cumplen las características anteriores, recientemente se ha introducido el término 'población metacéntrica' para referirse a aquellas agrupaciones geográficas de ratones con una combinación de cromosomas metacéntricos particular que se hallan separadas de otras zonas Rb por poblaciones de ratones con cariotipo St (Piálek y col., 2005).

Hasta el momento se han descrito más de 100 poblaciones metacéntricas y 60 razas cromosómicas con  $2n$  comprendidos entre 22 y 40 cromosomas (Boursot y col., 1993; Nachman y Searle, 1995, Piálek y col., 2005), distribuidas por el continente europeo, Madeira (Britton-Davidian y col., 2000), Túnez (Saïd y col., 1986), Turquía (Gündüz y col., 2000) e incluso Isla Marion, en la convergencia Antártica (Robinson, 1978) (Fig. 1.3.1).

El proceso de establecimiento de un patrón filogenético entre poblaciones Rb, así como la determinación del origen de estos sistemas, es un hecho que ha generado controversia puesto que se han hallado combinaciones de metacéntricos similares en regiones geográficas distantes. Algunos autores han sugerido que dicha distribución podría ser debida a la dispersión a gran escala



de individuos portadores de metacéntricos, proceso que posteriormente podría haber evolucionado de manera diferente en cada región (Tichy y Vucak, 1987; Winking y col., 1988; Bauchau, 1990). Sin embargo, el estudio basado en el análisis de 28 poblaciones Rb de ratón doméstico indicó la existencia de una mayor similitud genómica entre animales St y Rb de una misma área geográfica, que entre aquéllos procedentes de distintos sistemas Rb (Britton-Davidian y col., 1989). Estos resultados llevaron a sugerir que la formación de metacéntricos es independiente y convergente entre distintas regiones geográficas, siendo el resultado de la sucesiva incidencia de las mismas combinaciones cromosómicas (Nachman y col., 1994). Posteriormente, esta hipótesis fue apoyada por análisis de microsatélites centroméricos de los cromosomas implicados en la formación de la fusión Rb(5.15), una de las translocaciones más ampliamente distribuidas en la región mediterránea, cuyos resultados demostraron la aparición independiente de esta fusión en España e Italia (Riginos y Nachman, 1999). No obstante, el análisis detallado de dicho metacéntrico entre los sistemas Rb del centro y del norte de Italia desveló su origen común, confirmando la opción basada en la dispersión de individuos Rb entre áreas geográficas distanciadas (Riginos y Nachman, 1999).



Figura 1.3.1. Distribución de las razas Rb descritas en Europa y Norte de África. Imagen extraída de Piálek y col. (2005).



## 1.4. Contacto entre razas cromosómicas

Las zonas híbridas cromosómicas son regiones en las que poblaciones cromosómicamente diferenciadas contactan, se reproducen y dan lugar a descendencia con cariotipos intermedios (Barton y Hewitt, 1985; Searle y col., 1993). Esta definición incluye desde situaciones en las que se produce hibridación esporádica u ocasional entre especies en simpatria, hasta escenarios en los que aparecen estrechas zonas de hibridación entre taxones con distribuciones parapátricas perfectamente delimitadas (Spirito y col., 1980; Corti y col., 1990; Searle, 1991; Saïd y Britton-Davidian, 1991). Puesto que las reordenaciones cromosómicas pueden jugar un papel importante en la interrupción del flujo génico entre grupos de individuos cariotípicamente distintos, estas zonas ofrecen el marco idóneo para el estudio de los factores implicados en el aislamiento reproductivo y la diferenciación morfológica y genética entre poblaciones. Cuando tiene lugar el contacto entre dos razas cromosómicas de *M. musculus domesticus* diferenciadas solamente por unos pocos metacéntricos, el flujo génico puede darse sin restricciones (Wallace y col., 2002). En este caso, es frecuente la formación de un amplio rango de genotipos sobre los que pueden actuar mecanismos selectivos que contrarresten el flujo genético y mantengan las poblaciones como unidades diferenciadas a pesar de la hibridación. Por el contrario, la acumulación de numerosas translocaciones Rb se relaciona con una hipofertilidad híbrida o esterilidad híbrida (Wallace y col., 1992; Castiglia y Capanna, 2000), en la que la reducida eficacia de los híbridos puede limitar severamente el flujo génico entre razas (Hauffe y Searle, 1998; Nunes y col., 2011). Los modelos evolutivos clásicos consideran la esterilidad híbrida como el factor principal involucrado en estos procesos de especiación, ya que la aparición de problemas durante los procesos de segregación meiótica y la formación de productos recombinantes generadores de gametos no balanceados promueve que los individuos heterocigotos para las translocaciones cromosómicas sean parcial o totalmente estériles. Sin embargo, algunos de los modelos teóricos más recientes plantean





un escenario diferente, señalando a la reducción de la recombinación entre cromosomas portadores de diferentes reorganizaciones como el factor decisivo en los procesos de especiación cromosómica (véase, por ejemplo, revisión de Faria y Navarro, 2010).

### **1.5. El sistema robertsoniano 'Barcelona'**

En el noreste de la Península Ibérica se encuentra un sistema de polimorfismo cromosómico de ratón doméstico en el que individuos con translocaciones Rb se extienden a lo largo de una superficie de más de 5.000 km<sup>2</sup> que abarca parte de las provincias de Barcelona, Tarragona y Lérida (Gündüz y col., 2001; Sans-Fuentes, 2004). Adolph y Klein (1981) detectaron por primera vez ratones con fusiones Rb en esta zona, mencionando concretamente la presencia de las translocaciones Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(9.11) y Rb(12.13). Posteriormente, Nachman y col. (1994), Gündüz y col. (2001) y Sans-Fuentes y col. (2007) hallaron tres nuevas fusiones en este sistema, la Rb(6.10), Rb(3.8) y Rb(7.17), respectivamente. Si bien en un principio se consideró la existencia de una raza propia de esta zona, a la que se denominó "raza Barcelona" (Gündüz y col., 2001), en ninguna de las prospecciones realizadas con posterioridad se ha detectado individuos con las siete fusiones en homocigosis (Gündüz y col., 2001; Sans-Fuentes, 2004) distribuidos a lo largo de una zona geográficamente bien delimitada. Puesto que este escenario no se ajusta a los criterios enunciados por Hausser y col. (1994) para definir una raza cromosómica, Sans-Fuentes (2004) propuso considerar este sistema Rb como una zona de polimorfismo Rb en lugar de una zona híbrida resultante del contacto entre la raza St y una raza Rb propia. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la presente tesis se ha optado por denominar a esta zona de polimorfismo como sistema robertsoniano 'Barcelona' (SRbB), recuperando el término geográfico que un día se aplicó a la presunta raza Rb. El SRbB se halla rodeado de poblaciones St y en él se ha detectado una amplia gama de cariotipos y de números diploides (2n) que oscilan entre los 27 y 40 cromosomas. Asimismo, la



zona presenta un importante grado de heterocigosis estructural (Ht), habiéndose observado un número máximo de siete fusiones en heterocigosis en un mismo individuo (Sans-Fuentes, 2004). La distribución geográfica de los metacéntricos sigue un patrón clinal escalonado, disminuyendo su frecuencia de manera progresiva desde el área en el que se registra un mayor polimorfismo cromosómico, localizada en las proximidades de la reserva natural del Garraf, hasta la zona de contacto con las poblaciones St, a unos 40 km de distancia de ésta última (Gündüz y col., 2001; Sans-Fuentes, 2004).

La información publicada hasta el presente indica que el SRbB constituye un modelo único dentro del conjunto de zonas híbridas de ratón doméstico, debido a la exclusiva composición de metacéntricos, la distribución geográfica de los mismos y, según se ha comentado anteriormente, la ausencia de una raza cromosómica exclusiva. Asimismo, diversas investigaciones han demostrado la existencia de diferencias significativas entre individuos Rb y St a escalas osteológica (Muñoz-Muñoz y col., 2003; Sans-Fuentes, 2004; Muñoz-Muñoz y col., 2006; Muñoz-Muñoz, 2008; Sans Fuentes y col., 2009; Muñoz-Muñoz y col., 2011), histológica (Sans-Fuentes, 2004; Sans-Fuentes y col., 2010) y etológica (Sans-Fuentes, 2004; Sans-Fuentes y col., 2005), resultados indicativos de la existencia de barreras al flujo genético entre grupos cromosómicos.

## **1.6. Objetivos**

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es ampliar el nivel de conocimiento sobre el SRbB, profundizando en aspectos concretos relativos a su dinámica a lo largo del tiempo y al efecto de las fusiones Rb sobre la reproducción. Atendiendo a ello, los objetivos específicos de esta investigación son los siguientes:

- 1) Determinar posibles variaciones de la estructura del SRbB a lo largo del tiempo (concretamente entre los periodos 1996-2000 y 2008-2010),



considerando el grado de fijación de las fusiones en la población, el nivel de subdivisión genética y la distribución geográfica de los metacéntricos.

Si bien estudios previos en este sistema han aportado información sobre su estructura general (Gündüz y col., 2001; Sans-Fuentes, 2004), cabe tener en cuenta que la comprensión de los mecanismos evolutivos implicados en el proceso de divergencia entre poblaciones cromosómicas se halla fuertemente limitado por el desconocimiento de las pautas de variación de la estructura de las zonas híbridas Rb a lo largo del tiempo. Estudios sobre la variación espacio-temporal han demostrado que los sistemas Rb pueden persistir como zonas de tensión entre selección en contra de los híbridos y migración (Castiglia y Capanna, 1999; Gazave y col., 2003). No obstante, la presencia de variaciones temporales en la estructura poblacional indica que estas zonas se encuentran sometidas a un continuo proceso de cambio (Castiglia y Capanna, 1999). Este hecho sugiere que en el SRbB podría darse un escenario similar, donde el tipo y la magnitud de las variaciones ocurridas a nivel local podrían influir en cierto grado sobre la estructura y evolución del sistema a lo largo de las generaciones.

2) Cuantificar el grado de muerte celular programada (apoptosis) en el epitelio seminífero de animales del SRbB con distinto grado de polimorfismo cromosómico y determinar los tipos celulares más susceptibles a sufrir apoptosis en cada caso.

Según se ha comentado en párrafos precedentes, la disminución de la fertilidad en los híbridos es uno de los principales factores implicados en el proceso de interrupción del flujo génico entre poblaciones diferenciadas cariotípicamente (Britton-Davidian y col., 1989; Searle, 1993). Datos previos referentes a la zona de estudio han demostrado que las translocaciones Rb pueden provocar alteraciones en el proceso espermatogénico, comportando una disminución en la producción de espermátidas en individuos con diversas fusiones en heterocigosis (Sans-Fuentes y col., 2010). Asimismo, estudios realizados con animales Rb de laboratorio (Merico y col., 2003; 2008) indican la existencia de una estrecha asociación entre la presencia de múltiples translocaciones Rb en



heterocigosis y la activación de la vía de muerte celular programada en el epitelio seminífero. Estos resultados sugieren que la estructura del cariotipo podría ejercer cierto efecto sobre las vías de regulación de muerte en células germinales y, por tanto, incidir sobre el proceso de producción de gametos en determinados individuos Rb.

3) Determinar la presencia de alteraciones ultraestructurales en células germinales del epitelio seminífero de individuos con un elevado grado de polimorfismo y estimar posibles diferencias morfológicas en la cabeza del espermatozoide asociadas a la presencia de translocaciones Rb.

Si bien diversos estudios sobre fertilidad en híbridos Rb indican que las reordenaciones cromosómicas afectan principalmente a las etapas iniciales de la espermatogénesis (White, 1978; Baker y Birckham, 1986, Everett y col., 1996; Castiglia y Capanna, 2000), algunos trabajos sugieren cierto efecto de las fusiones Rb en fases posteriores (Pinton y col., 2008; Firman y Simmons, 2009; Pan y col., 2009). Consecuentemente, cabe pensar que la presencia de irregularidades durante el proceso de elongación espermatídica puede comportar la aparición de alteraciones morfológicas en espermatozoides maduros y, por tanto, actuar como agentes de diferenciación entre poblaciones cariotípicas.

4) Evaluar la existencia de modularidad en la cabeza del espermatozoide del ratón doméstico atendiendo a su heterogeneidad citoesquelética, compartimentación de membrana y función específica.

Recientemente se ha demostrado que la cabeza del espermatozoide es una estructura compleja que presenta una clara heterogeneidad citoesquelética y compartimentación en sus membranas (Breed, 2004; Selvaraj y col., 2006, 2009). Este hecho apunta a que dicha estructura podría presentar cierta autonomía entre las distintas regiones morfológicas que la constituyen y que, por tanto, actúa como una entidad modular. Si bien es posible encontrar en la bibliografía multitud de estudios de modularidad fenotípica (o modularidad variacional) en estructuras osteológicas complejas (Cheverud, 1996; Goswami y



---

Polly, 2010; Muñoz-Muñoz y col., 2011; Burgio y col., 2012), poco se sabe sobre la existencia de este fenómeno a escala unicelular.

5) Estimar si las fusiones Rb alteran los posibles patrones de covariación fenotípica en la cabeza del espermatozoide.

Análisis morfométricos realizados en animales del SRbB han demostrado que las translocaciones Rb pueden alterar los patrones de covariación fenotípica entre módulos en estructuras osteológicas como el cráneo o la mandíbula (Sans-Fuentes y col., 2009; Muñoz-Muñoz y col., 2011). Este hecho sugiere que, en caso de existir modularidad variacional en la cabeza del espermatozoide, las mutaciones también podrían comportar modificaciones semejantes a este nivel.



## Capítulo 2.



*Autor: J. Medarde*

## Material y métodos generales

---



## 2.1. Captura de los ejemplares

Los ejemplares analizados se han obtenido a través de prospecciones realizadas en un total de 29 granjas o hípicas distribuidas a lo largo de las provincias de Barcelona, Tarragona y Lleida (véase Capítulo 3). Se capturaron 364 individuos mediante trampas Sherman (Fig. 2.1.1), previamente impregnadas con distintos tipos de aceite vegetal y colocadas, a última hora de la tarde, en corrales, pajares o almacenes de comida para animales estabulados. La recogida de las trampas se llevó a cabo a primera hora de la mañana. Los animales se capturaron vivos y fueron transportados inmediatamente al laboratorio, dónde fueron identificados taxonómicamente.



Figura 2.1.1. Trampa Sherman empleada en el presente estudio.

Se determinó el estado sexual de cada ejemplar siguiendo los criterios indicados por Gosálbez (1987). Tras tres días de aclimatación, se procedió a la eutanasia del animal mediante dislocación cervical y se determinó su masa corporal mediante una balanza digital (GF-200, 210-0.02 g); seguidamente se obtuvo su cariotipo a partir de extracto de médula ósea femoral.

Los procedimientos de manipulación animal empleados en la presente tesis han seguido las directrices estipuladas por la comisión ética en experimentación animal y humana (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona y por el Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (Direcció General del Medio Natural i Biodiversitat) de la Generalitat de Catalunya (procedimiento de experimentación número 6328).

## 2.2. Obtención del cariotipo

En cada ejemplar, una vez retirada la musculatura, se seccionó el fémur a nivel de las diáfisis, en la zona próxima a cada epífisis. Con objeto de extraer la



máxima cantidad de médula ósea, se inyectó en la cavidad medular del fémur 1 ml de medio de cultivo 199 (Sigma) con una jeringuilla y se drenó el contenido en un tubo cónico Dreyer. A continuación se disgregó el extracto varias veces con una pipeta Pasteur hasta obtener una solución homogénea. Se centrifugó a 1000 rpm durante cinco minutos y se retiró todo el sobrenadante sin dañar el precipitado. Se añadió una gota de solución hipotónica (KCl al 0.075 M a 37°C) y se procedió a homogeneizar el precipitado golpeando suavemente el tubo con el dedo. Seguidamente se añadió más solución hipotónica gota a gota, agitando el precipitado repetidamente, hasta llenar un cuarto de tubo. Tras 15 minutos de reposo a 37°C, se centrifugó la solución a 1000 rpm durante cinco minutos. Sin romper el precipitado, se retiró todo el sobrenadante posible y se añadieron 0.75 ml de fijador Carnoy (tres partes de metanol por una de ácido acético). Éste fijador se retiró inmediatamente y se substituyó por uno nuevo. Cuando la superficie del precipitado adquirió una tonalidad blanquecina, se retiró el sobrenadante y se homogeneizó el precipitado con nuevo Carnoy, al igual como se había procedido con la solución hipotónica, hasta llenar un cuarto de tubo. Se centrifugó nuevamente la solución a 1000 rpm durante cinco minutos, se retiró el sobrenadante y, como en el paso anterior, se añadió nuevo fijador hasta obtener una solución turbia y homogénea. Seguidamente se realizaron las extensiones para observar los cromosomas en metafase. A tal efecto, sobre una base húmeda, se decantaron con un microcapilar tres gotas de solución en un portaobjetos recién extraído del frigorífico, dejando una cierta separación entre ellas. Inmediatamente, se decantó una gota más de fijador nuevo sobre cada una de las anteriores, dejándose secar la preparación a temperatura ambiente. Para cada individuo se realizó un promedio de seis extensiones, que se incubaron a 65° durante 12h. Siguiendo el protocolo establecido por Mandahl (1992), se procedió al marcaje de bandas G con colorante Wright y se identificaron los cromosomas al microscopio óptico (Fig. 2.2.1) siguiendo los criterios establecidos por el *Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* (1972).





Figura 2.2.1. Cariotipo estándar de *M. musculus domesticus* constituido por 40 cromosomas telocéntricos. Puede observarse el patrón de bandas G específico para cada cromosoma. Imagen extraída de <http://www.takapo.com>

### 2.3. Obtención de datos morfométricos y biológicos

Paralelamente al proceso de obtención del cariotipo se tomaron las siguientes medidas somáticas (Gosálbez, 1987) (Fig. 2.3.1): i) longitud de la cola (C), longitud desde el vértice del ángulo formado por la base proximal ventral de la cola y la parte posterior de la prominencia anal hasta el ápice de la cola (sin considerar el pincel de pelos terminal); ii) longitud de la cabeza y cuerpo (CC), longitud desde la punta del hocico hasta el vértice definido en la medida anterior; iii) longitud de la oreja (O), longitud máxima desde la escotadura inferior hasta el margen distal de la oreja; iv) longitud del pie posterior (P), longitud desde el extremo distal del dedo más largo (sin considerar la uña) hasta el extremo del talón.

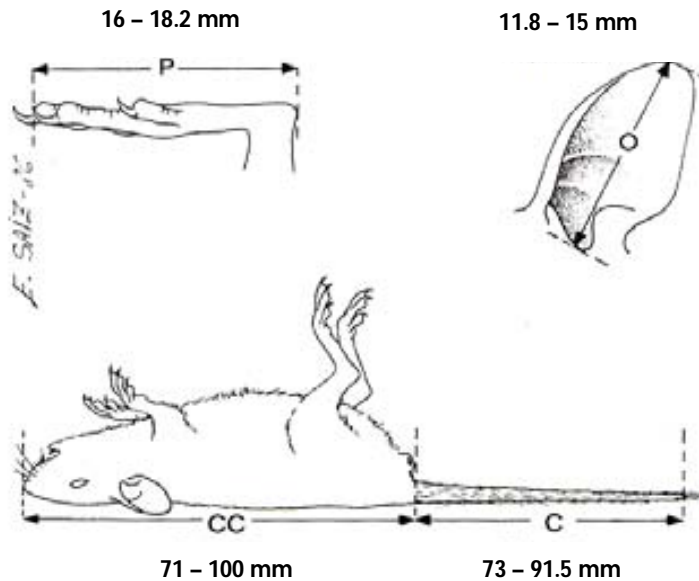


Figura 2.3.1. Medidas corporales y rangos de variación de cada una de ellas en *M. musculus domesticus*. CC: longitud de la cabeza y cuerpo; C: longitud de la cola; P: longitud del pie posterior; O: longitud de la oreja. Dibujo extraído de Gosálbez (1987).

Para determinar el estado de actividad sexual de cada animal se anotaron las siguientes medidas y características del aparato reproductor: a) machos: peso y diámetros mayor y menor de cada testículo; longitud de la vesícula seminal, tomada como la máxima distancia entre el punto de unión de ambas vesículas hasta el extremo distal de la vesícula más grande; b) hembras: estado de la vagina (abierta o cerrada); número de cicatrices placentarias y/o embriones en cada útero. Finalmente, se determinó a simple vista la presencia de parásitos en hígado, intestinos y pulmón.



## Capítulo 3.



**Variación espacio-temporal  
del sistema robertsoniano  
'Barcelona'**

---

---



### 3.1. Introducción

El seguimiento de las variaciones que acontecen en las zonas híbridas a lo largo del tiempo ha sido objeto de gran interés en multitud de estudios (véase Buggs, 2007) dado que éstos pueden reflejar cambios en la eficacia biológica de los individuos [ej., dispersión a favor de aquel/llos alelo/s más favorable/s en un escenario concreto o de un alelo dominante (Mallet, 1985)] o en la estructura de la población [ej., movimientos resultantes del incremento de la densidad poblacional o de la variación en la tasa de dispersión (Lande, 1985; Kimura, 1985)]. Por ello, los sistemas Rb de ratón doméstico constituyen un interesante escenario evolutivo para estudiar la dinámica de las reorganizaciones cromosómicas a escala temporal (Spirito y col., 1980; Bauchau y col., 1990; Hübner y Koulischer, 1990; Hauffe y Searle, 1993; Saïd y col., 1993; Fel-Clair y col., 1996; Castiglia y Capanna, 1999; Faria y Navarro, 2010). Si bien ciertos autores han sugerido que dichos sistemas son efímeros e inestables (Harrison, 1990), muchos pueden persistir en equilibrio dinámico a lo largo del tiempo y el espacio (Barton y Gale, 1993), actuando como zonas de tensión entre la selección en contra de los híbridos y la migración (Endler, 1977; Barton y Hewitt, 1985). De este modo, los análisis espacio-temporales ofrecen la posibilidad de detectar posibles movimientos a escala temporal que pueden llegar a alterar los acontecimientos evolutivos en la zona de contacto (Harrison, 1993; Buggs, 2007), así como obtener información relativa a la estructura espacial y patrones de dispersión de la zona, grado de aptitud de los híbridos y fuerza de selección en contra de éstos (Barton y Gale, 1993; Searle, 1993). Aunque se han realizado diversos estudios sobre la variación espacio-temporal a largo término en algunos sistemas Rb (Hauffe y Searle, 1993; Castiglia y Capanna, 1999; Faria y Navarro, 2010), la detección de cambios graduales o rápidos en estas zonas puede pasar desapercibida cuando la escala temporal considerada es demasiado larga. Consecuentemente, es necesaria la realización de estudios de este tipo a corto plazo en los que no solamente se determinen los cambios en la estructura de la zona, sino que también se atienda a la dinámica



de parámetros poblacionales como indicadores del grado de fijación de las distintas reorganizaciones en la población, la facilidad con la que unos alelos determinados pasan de un grupo genotípico a otro, el tipo y grado de selección de los híbridos, o la intervención de factores extrínsecos a la propia dinámica de la especie que puedan alterar el equilibrio del sistema.

### 3.1.1. Objetivos

Teniendo en cuenta estas observaciones, se ha llevado a cabo un estudio específico para detectar posibles variaciones estructurales en el SRbB a lo largo de los últimos 13 años. Dicho periodo, en una región mediterránea templada, corresponde aproximadamente a unas 50 generaciones de ratón doméstico (Castiglia y Capanna, 1999). Se asume que este tiempo es suficiente para evidenciar variaciones puntuales que, a su vez, permitan obtener una visión más precisa de la dinámica del área de polimorfismo a una escala temporal mayor. Según lo expuesto, los objetivos específicos de este apartado de la tesis son: i) aportar información sobre la estructura pasada y actual del sistema, en relación a la composición cromosómica de las distintas localidades prospectadas; ii) detectar posibles variaciones locales de las características cromosómicas y la diversidad genética, a lo largo del periodo considerado; iii) comparar la distribución geográfica pasada y presente de cada metacéntrico.

## 3.2. **Material y métodos**

### Periodo 2008-2010

Entre los años 2008 y 2010 se capturaron y cariotiparon 304 ejemplares procedentes de 29 granjas del SRbB (Fig. 3.3.1, Apéndice 1). Para analizar las características cromosómicas del sistema, se calcularon la media y el rango del número diploide ( $2n$ ) por localidad, y las frecuencias de los metacéntricos por localidad y fusión. La desviación de dichas frecuencias en cada población, en relación al equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), se evaluó mediante una



prueba de probabilidades exactas<sup>1</sup>, siguiendo el método establecido por Raymond y Rousset (1995). Adicionalmente, se realizó una prueba global de desviación del equilibrio H-W para el conjunto de metacéntricos y poblaciones de acuerdo con el método de Fisher (Raymond y Rousset, 1995). El grado de heterocigosis hallado en cada localidad se evaluó mediante el cálculo del número medio de cromosomas en heterocigosis por individuo (índice H), el promedio de alelos en heterocigosis por locus (A/I) en cada localidad, y el porcentaje de animales con uno a cinco metacéntricos en condición heterocigótica a lo largo de la zona de estudio.

A nivel poblacional, se estimó el grado de heterocigosis por fusión y para el conjunto de fusiones detectadas mediante los estadísticos F de Wright ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$ , y  $F_{IT}$ ), siguiendo el método descrito por Weir y Cockerham (1984). El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) calcula la reducción de la heterocigosis de un individuo debido a la existencia de cruces no aleatorios dentro de su subpoblación. Este coeficiente oscila entre 1 y -1, dónde valores cercanos a 1 indican déficit de heterocigotos y -1 designa el exceso de animales heterocigotos. El índice de fijación ( $F_{ST}$ ) permite evaluar el grado de subdivisión genética, en términos de reducción en la heterocigosis en la población debido a la deriva genética. Este índice oscila entre 0 y 1, aunque suele ser mayor de cero debido al efecto *Wahlund* que asegura una heterocigosis poblacional media superior a la propia de cada localidad ( $H_T > H_S$ ). Si todas las subpoblaciones están en equilibrio H-W con las mismas frecuencias alélicas, entonces  $F_{ST} = 0$ . En caso contrario,  $F_{ST}$  puede adquirir valores próximos a 1, indicando un elevado grado de subdivisión genética. Finalmente, el coeficiente de endogamia global ( $F_{IT}$ ) incluye la contribución debida a los cruces no estocásticos ocurridos dentro de las subpoblaciones ( $F_{IS}$ ) y la debida a la propia subdivisión ( $F_{ST}$ ). Estos factores se relacionan según la ecuación:

$$(1-F_{IT}) = (1-F_{IS})(1-F_{ST})$$

---

<sup>1</sup> Hardy-Weinberg exact tests: Probability Test.



Así,  $F_{IT}$  calcula la reducción en heterocigosis de un individuo en relación a la población total. Sus valores fluctúan entre 1 y -1, siendo 1 el indicador de máxima endogamia por déficit de heterocigosis y -1 de endogamia nula por exceso de heterocigosis. Para determinar la significación de los índices  $F$ , se generó una distribución nula para cada uno de ellos a partir de 5.000 permutaciones. El valor observado se consideró significativo cuando excedía del 95% de la distribución simulada. El valor promedio y el error estándar se estimó mediante el método *Jackknife* (Weir, 1990), que evalúa dichos parámetros a partir del cómputo de una muestra de observaciones aleatorias.

Para cuantificar el déficit de heterocigotos en relación al equilibrio H-W (Rousset y Raymond, 1995) se llevó a cabo una prueba  $U^2$ , en la que se asume el déficit de heterocigotos en la población como hipótesis alternativa.

El programa GENEPOP versión 4.0 (Raymond y Rousset, 1995) se utilizó para obtener las frecuencias metacéntricas de las poblaciones prospectadas, el valor de equilibrio H-W y la prueba  $U$  para los heterocigotos. Los estadísticos  $F$  de Wright (valores estimados, significación por permutaciones y *jackknifing*) se calcularon con el programa GENETIX versión 3.3 (Belkhir y col., 1996-1998).

### Análisis temporales

Los datos aportados por Gündüz y col. (2001) y Sans-Fuentes (2004), correspondientes a la estructura del SRbB durante el período 1996-2000, fueron agrupados para comparar: i) las características cromosómicas por localidad (frecuencias,  $2n$  y heterocigosis); ii) el grado de subdivisión poblacional en relación a cada metacéntrico (estadístico  $F_{ST}$ ); y iii) el patrón de dispersión clinal para cada fusión.

Se seleccionaron las localidades de ambas muestras temporales en las que se hallaron individuos Rb para contrastar, en primer lugar, la media y el rango de  $2n$ , el índice  $H$ , la proporción de individuos con uno a cinco metacéntricos en

---

<sup>2</sup> Global score  $U$  test for heterozygote deficiency.



heterocigosis, y el valor medio de A/I para cada localidad; y, en segundo lugar, los estadísticos F para cada metacéntrico.

Con objeto de evaluar las diferencias temporales en la frecuencia de cada fusión y localidad, se realizó una prueba de variación génica<sup>3</sup> entre las localidades prospectadas en común en ambos periodos: Garraf, Gavà, Vilanova i la Geltrú, Viladecans, La Granada, Sant Martí Sarroca, Sant Sadurní d'Anoia, Calafell, Bellaterra, Les Pobles y Santa Coloma de Queralt (GENEPOP versión 4.0 de Raymond y Rousset, 1995).

Debido a que en gran parte de las localidades situadas al norte de la provincia de Barcelona los ejemplares presentaron cariotipos St, o cercanos al St, para la comparación de los patrones de distribución clinal entre los periodos 1996-2000 y 2008-2010 solamente se utilizaron las localidades de la zona sur-oeste del área de polimorfismo<sup>4</sup>. El centro del sistema Rb se estimó como el punto medio entre localidades con los 2n más bajos (Garraf, Viladecans, La Granada, El Prat de Llobregat, Gavà y Sant Martí Sarroca) (Fig. 3.3.1). Se calcularon las distancias geográficas de cada localidad prospectada tomando como punto de partida el centro Rb estimado. Los patrones de distribución clinal de cada metacéntrico se ajustaron mediante la función de distribución logística  $f(x) = \frac{e^{s(x-c)}}{1 + e^{s(x-c)}}$ , siendo  $s$  y  $c$  la pendiente y el centro de cada clina, respectivamente, y  $x$  la distancia geográfica respecto el centro Rb. Los parámetros  $c$  y  $s$  se obtuvieron con el programa C-Fit, versión 0.6 (Lenormand, 2005). Adicionalmente, se calculó la amplitud ( $w$ ) de las distintas clinas como  $|4|/s$  (Endler, 1977). El valor de máxima verosimilitud para cada par de clinas se calculó con el programa C-Fit siguiendo el algoritmo de metrópolis de Szymura y Barton (1986). Este cálculo se repitió restringiendo los centros y las pendientes de las clinas contrastadas para determinar, respectivamente, la coincidencia y la concordancia existente entre ellas. Así, se asumió que dos veces la diferencia en los valores de máxima verosimilitud entre el modelo restringido y el no restringido sigue una distribución  $\chi^2$  con un número de

<sup>3</sup> *G test: genotypic test for population differentiation.*

<sup>4</sup> Criterio establecido por Gündüz y col. (2001).





grados de libertad igual a la diferencia de parámetros estimados (Fel-Clair y col., 1996). En las pruebas múltiples se aplicó la corrección de Bonferroni para ajustar los valores de  $P$  de concordancia ( $P_{\text{conc}}$ ) y coincidencia ( $P_{\text{coinc}}$ ) (Sokal y Rohlf, 1995). Los ejemplares con información cariotípica incompleta o bien las localidades con menos de cuatro individuos se excluyeron de los análisis.

### 3.3. Resultados

#### Periodo 2008-2010

En la Figura 3.3.1 y la Tabla 3.3.1 se muestran los resultados relativos a las características cromosómicas del SRbB correspondientes al período 2008-2010. En la muestra estudiada se hallaron las siete combinaciones de metacéntricos descritas previamente: [Rb(3.8), Rb(4.14), Rb(5.15), Rb(6.10), Rb(7.17), Rb(9.11) y Rb(12.13)], aunque no se capturó ningún individuo con las siete fusiones en homocigosis. Los  $2n$  de los animales oscilaron entre 29 y 40 cromosomas y se obtuvo un total de 106 cariotipos diferentes. Los valores más bajos de  $2n$  se encontraron en animales procedentes de Gavà ( $2n=30.50$ ), La Granada ( $2n=31.56$ ), Viladecans ( $2n=31.66$ ) y El Prat de Llobregat ( $2n=31.79$ ). No obstante, en algunas de las localidades más cercanas al centro Rb fue dónde se detectaron algunos de los rangos de  $2n$  más amplios (Garraf:  $2n=29-40$ , Gavà:  $2n=29-36$  y Vilanova i la Geltrú:  $2n=31-38$ ).

El análisis de las frecuencias de metacéntricos reveló una amplia distribución de las fusiones Rb(4.14), Rb(12.13), Rb(9.11) y Rb(5.15) en la zona de estudio, presentando frecuencias globales de 0.52, 0.51, 0.49 y 0.41, respectivamente. Sin embargo, las fusiones Rb(6.10), Rb(3.8) y, especialmente, Rb(7.17) mostraron una distribución más restringida (con frecuencias de: 0.20, 0.12 y 0.01, respectivamente). En particular, la fusión Rb(7.17) solamente se detectó con frecuencias muy bajas en las localidades de Garraf (0.08) y Sant Martí Sarroca (0.11).

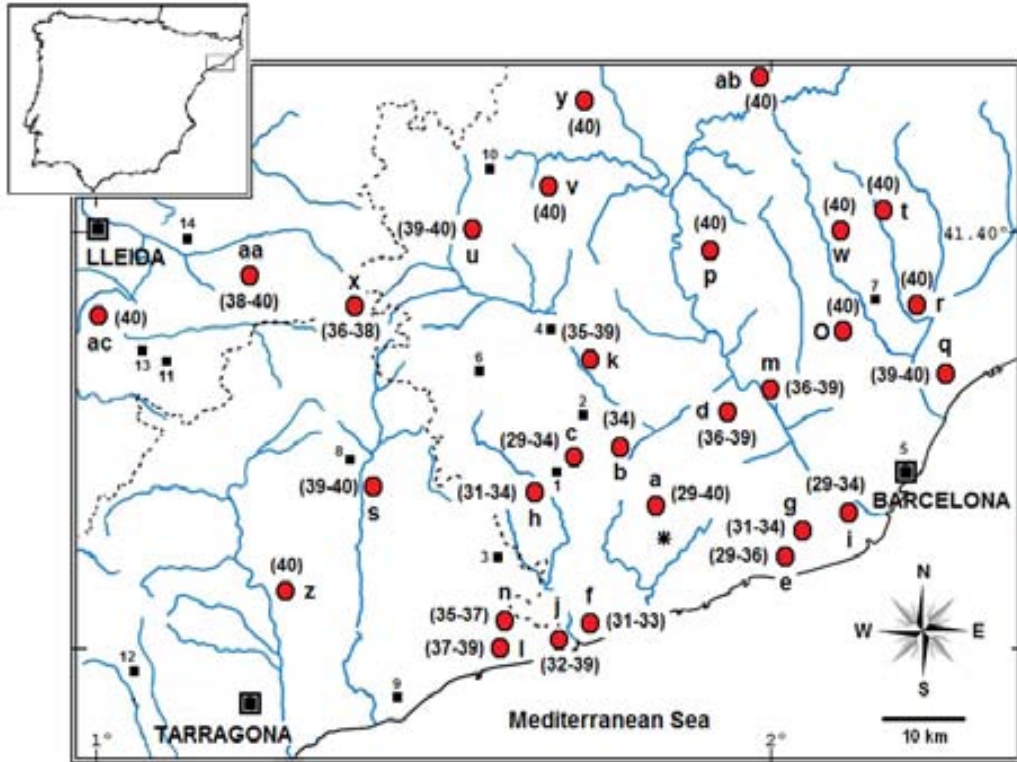


Figura 3.3.1. Localidades prospectadas en el SRbB (véase Tabla 3.3.1). En paréntesis se muestra el rango de los números diploides ( $2n$ ) encontrado en el lugar de muestreo. Los números indican las granjas analizadas durante el periodo 1996-2000 y que ya no existían en el 2008-2010. Las localidades restantes se designan con letras. El asterisco señala el centro del sistema Rb.

No se apreciaron desviaciones significativas en relación al equilibrio H-W ( $P > 0.05$  para todas las localidades y metacéntricos). Este resultado fue corroborado por el estimador  $F_{IS}$  que adquirió valores cercanos a 0 para todos los ejemplares Rb analizados (Tabla 3.3.2).

Los datos obtenidos indicaron una elevada presencia de animales con heterocigosis estructural dentro de la zona de estudio. Solamente 20 de los 205 individuos Rb fueron homocigotos para todas las fusiones, mientras que el resto resultaron ser heterocigotos para al menos una fusión. El número medio de metacéntricos en heterocigosis por individuo (H; Tabla 3.3.1) y el número medio de alelos por locus (A/I; Tabla 3.3.3) revelaron que los animales con mayor número de fusiones en heterocigosis fueron capturados en localidades



cercanas al centro Rb (Garraf:  $H=2.61$ ,  $A/I=2.00$ ; La Granada:  $H=2.56$ ,  $A/I=1.86$ ; Viladecans:  $H=2.55$ ,  $A/I=1.86$ ; El Prat de Llobregat:  $H=2.03$ ,  $A/I=1.86$ , y Cubelles:  $H=2.28$ ,  $A/I=1.86$ ). Pese a que los individuos con una (28.64%), dos (30.81%), tres (24.86%) o cuatro (18.91%) fusiones en heterocigosis se hallaron frecuentemente en el área prospectada, los heterocigotos para cinco metacéntricos aparecieron de forma ocasional (1.85%). No se encontró ningún individuo con más de cinco fusiones en el total de la muestra analizada.

A pesar de la ausencia de una raza Rb, las clinas cromosómicas se definieron desde la zona con las frecuencias de metacéntricos más elevadas, como punto de origen, hacia la zona periférica con animales St. Las clinas ajustadas para cada fusión se muestran en la Figura 3.3.2. La fusión Rb(7.17) no fue considerada debido a su restringida distribución. Las localidades polimórficas con las frecuencias de metacéntricos más altas fueron las situadas, principalmente, a unos 25 km del centro Rb. A medida que la distancia geográfica fue en aumento, la frecuencia de los individuos Rb disminuyó, implicando un incremento gradual de los  $2n$  hasta alcanzar los 40 cromosomas. Los animales capturados a unos 30 km del centro presentaron un moderado número de translocaciones, mientras que aquéllos colectados a distancias superiores a los 35 km poseían generalmente cariotipos St. Las pruebas de concordancia no mostraron la existencia de diferencias significativas en el patrón de distribución entre metacéntricos. No obstante, los patrones de distribución de las fusiones Rb(3.8) y Rb(6.10) fueron significativamente no coincidentes ( $P<0.01$ ), presentando los centros de sus respectivas clinas desplazados en relación al resto de fusiones (Tabla 3.3.4).

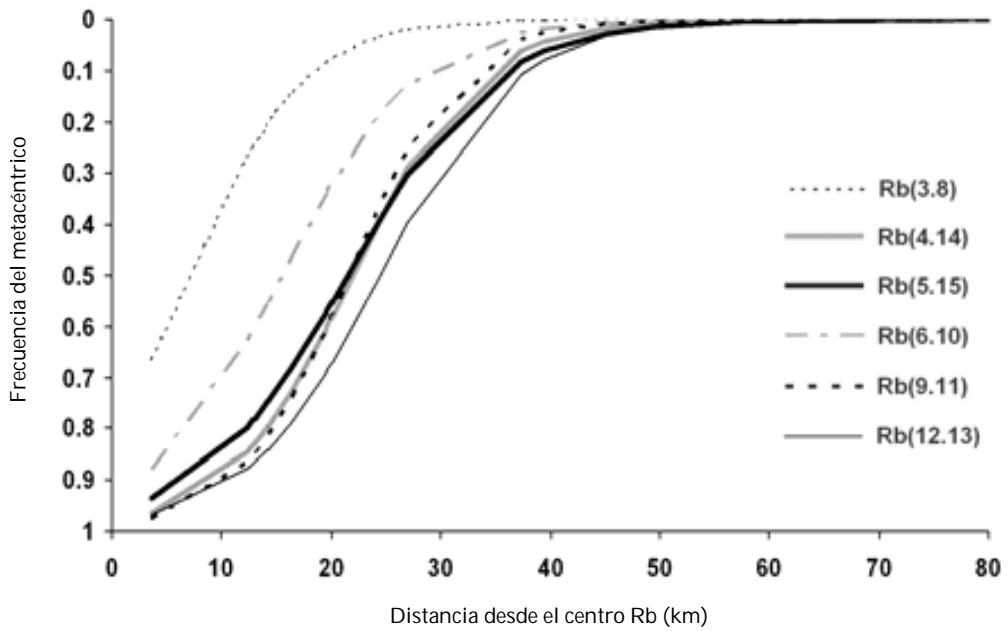


Figura 3.3.2. Distribución clinal de los metacéntricos durante el periodo 2008-2010. La variación de las frecuencias a lo largo del sistema Rb se muestra para todas las fusiones excepto para la Rb(7.17).



Tabla 3.3.1 Localidades y características cromosómicas de los individuos del SRbB correspondientes a los periodos 2008-2010 y 1996-2000 (véase también Fig. 2.1).

Localidad <sup>a</sup>	km	N <sup>b</sup>	2n Medio	Rango 2n	H <sup>c</sup>	Frecuencia de los cromosomas metacéntricos						
						3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
Periodo 2008-2010												
a. Garraf	3.5	13	32.76	29-40	2.61	0.51	0.73	0.42	0.35	0.08	0.74	0.78
b. Sant Pau d'Ordal	8.4	1	34.00	34	4	0	0.50	0.50	1	0	0.50	0.50
c. La Granada	12.4	16	31.56	29-34	2.56	0.46	0.87	0.81	0.44	0	0.81	0.81
d. Corbera de Llobregat	12.8	8	37.00	36-39	1.25	0	0.62	0.13	0	0	0.44	0.31
e. Gavà	13.1	13(1)	30.50	29-36	1.46	0.31	0.88	0.88	0.73	0	0.96	0.96
f. Vilanova i la Geltrú	14.2	6	33.66	31-38	1.33	0.16	0.75	0.83	0	0	0.67	0.75
g. Viladecans	14.3	9	31.66	30-34	2.55	0.33	0.72	0.78	0.72	0	0.89	0.72
h. Sant Martí Sarroca	16.4	9	32.77	31-34	1	0	1	0.67	0	0.11	0.94	0.89
i. El Prat de Llobregat	19.5	27	31.79	29-34	2.03	0.13	0.70	0.91	0.65	0	0.81	0.91
j. Cubelles	19.6	14(3)	34.85	32-39	2.28	0.04	0.42	0.64	0.18	0	0.68	0.61
k. Sant Sadurní d'Noya	19.9	19(2)	37.21	35-39	1.42	0	0.61	0	0	0	0.37	0.42
l. Calafell	20.0	19	37.76	37-39	1.84	0.07	0.28	0	0.08	0	0.16	0.53
m. El Papiol	20.1	8	37.62	36-39	0.87	0	0.13	0.25	0	0	0.69	0.06
n. Bellveí	24.4	6	36.16	35-37	1.83	0	0.50	0.16	0.25	0	0.42	0.58
o. Bellaterra	28.1	7	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
p. Vacarisses	31.6	7	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
q. Badalona	36.0	11(2)	39.84	39-40	0.15	-	-	-	-	-	-	-
r. Sta. Perpètua de la Mogoda	36.8	10	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
s. Les Pobles	37.4	13(2)	39.83	39-40	0.15	0	0	0.08	0	0	0	0
t. Castellar del Vallès	37.7	8	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
u. Jorba	39.4	3	39.66	39-40	0.33	0	0.16	0	0	0	0	0
v. Castellfollit del Boix	39.9	14	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
w. Caldes de Montbuí	42.8	2	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
x. Santa Coloma de Queralt	45.1	7	36.86	36-38	1.71	0	0.71	0.50	0	0	0	0.36
y. Fals	48.2	3(2)	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
z. Nulles	49.6	7	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
aa. Ametlla de Segarra	57.7	9	39.44	38-40	0.33	0	0.27	0	0	0	0	0
ab. Olost	75.7	16(1)	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
ac. Arbeca	81.1	6	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0



Localidad <sup>a</sup>	km	N <sup>b</sup>	2n Medio	Rango 2n	H <sup>c</sup>	Frecuencia de los cromosomas metacéntricos						
						3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
Periodo 1996-2000												
a. Garraf	3.5	34	30.22	28-35	1.82	0.69	0.86	0.77	0.72	0.07	0.97	0.79
1. Avinyonet del Penedès	7.4	4	31.20	30-33	0.25	0	1	0.88	0.50	0	1	1
b. Sant Pau d'Ordal	8.7	55	30.15	28-34	1.22	0.44	0.95	1	0.69	0	0.90	0.93
2. Lavern	10.0	24	32.12	31-33	1.46	0	0.79	0.81	0.37	0	1	0.95
c. La Granada	12.4	67	30.79	27-35	1.79	0.44	0.98	0.89	0.32	0.14	0.84	0.89
e. Gavà	13.1	9	30.22	29-32	1.33	0.55	1	1	0.38	0	1	0.94
f. Vilanova i la Geltrú	14.2	36	31.89	30-34	1.33	0.24	0.90	0.82	0.12	0.04	0.93	0.94
g. Viladecans	14.3	4	30.20	29-31	0.75	0.12	1	0.75	1	0	1	1
h. Sant Martí Sarroca	16.4	4	32.50	32-33	0.50	0	1	1	0	0	0.75	1
k. Sant Sadurní d'Anoia	19.9	7	34.70	33-37	1.57	0	0.71	0.64	0.07	0	0.57	0.50
l. Calafell	20.0	20	36	35-37	1.30	0	0.75	0.15	0	0.02	0.17	0.90
3. Sant Llorenç del Penedès	24.6	5	36.60	36-38	2.20	0	0.50	0.50	0	0	0.30	0.40
4. Vallbona d'Anoia	25.1	6	39.33	37-40	0.20	0	0	0	0	0	0	0.10
5. Barcelona	27.8	13	34.07	32-36	1.46	0.15	0.31	0.53	0	0	1	0.96
o. Bellaterra	28.1	31	39	38-40	0.32	0	0.06	0.08	0	0	0	0.03
6. La Llacuna	31.1	5	35.80	35-37	1.50	0	0.25	0.25	0	0	0.25	1
7. Sabadell	33.2	9	38.55	38-39	0.56	0	0	0	0	0	0	0.72
s. Les Pobles	37.4	23	33.12	37-40	1.17	0.02	0.22	0.26	0	0	0	0.17
8. Les Ordes	38.3	1	38	38	0	0	1	0	0	0	0	0
9. La Riera	44.3	11	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
x. Santa Coloma de Queralt	45.1	7	38.30	37-40	1.14	0	0.57	0.07	0	0	0	0.14
10. Calaf	49.6	8	39.50	38-40	0.17	0	0.08	0	0	0	0	0
11. Fulleda	70.4	22	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
12. Les Borges del Camp	71.2	5	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
13. L'Espluga Calba	73.0	9	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
14. Anglesola	73.6	5	39.60	39-40	0.40	0	0.20	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Las localidades (a-ac, 1-14) se hallan ordenadas en relación a la distancia (km) al centro del sistema Rb. Las localidades numeradas del 1 al 14 corresponden a granjas abandonadas o en las que no se capturó ningún individuo en el periodo 2008-2010. <sup>b</sup> N hace referencia al número de ejemplares en los que se ha determinado el cariotipo completo. Las cifras entre paréntesis se refieren a aquellos animales capturados con cariotipo no identificado completamente. <sup>c</sup> H es el número medio de fusiones en heterocigosis por individuo.



Tabla 3.3.2. Estadísticos  $F$ ,  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$ , y  $F_{IT}$ , estimados según Weir y Cockerham (1984). El promedio y el error estándar (E.E.) de los estadísticos se obtuvo mediante el remuestreo *jackknifing* para cada metacéntrico y para su conjunto en los periodos 2008-2010 y 1996-2000.

Rb	$F_{IS}$	Promedio $F_{IS}$	E.E.	$F_{ST}$	Promedio $F_{ST}$	E.E.	$F_{IT}$	Promedio $F_{IT}$	E.E.
2008-2010									
3.8	-0.0544	-0.0562	0.0227	0.2345*	0.2369	0.0638	0.1929*	0.1942	0.0716
4.14	0.0078	-0.0009	0.0755	0.2789*	0.2783	0.0968	0.2845*	0.2787	0.1162
5.15	0.0749	0.0697	0.0759	0.5372*	0.5506	0.1023	0.5719*	0.5809	0.0961
6.10	-0.1186	-0.1249	0.0519	0.4063*	0.4095	0.0746	0.3358*	0.3375	0.1013
7.17	-0.0594	-0.0594	0.0288	0.0523	0.0472	0.0287	0.0040	-0.0103	0.0080
9.11	0.0770	0.0788	0.0787	0.4377*	0.4369	0.0959	0.4810*	0.4795	0.0891
12.13	-0.0315	-0.0361	0.1096	0.3909*	0.3919	0.1143	0.3717*	0.3712	0.1388
Global	-0.0034	-0.0025	0.0283	0.3925*	0.3946	0.0438	0.3904*	0.3936	0.0539
1996-2000									
3.8	0.0104	0.0121	0.0512	0.2999*	0.2799	0.1033	0.3072*	0.2916	0.1274
4.14	-0.0191	0.0202	0.0907	0.5633*	0.5871	0.1351	0.5549*	0.5834	0.1592
5.15	0.0499	0.0540	0.0715	0.5194*	0.5276	0.1153	0.5434*	0.5509	0.1053
6.10	0.0406	0.0460	0.0916	0.3860*	0.3791	0.1115	0.4109*	0.4104	0.1338
7.17	-0.0289	-0.1182	0.1933	0.0596	0.0831	0.0446	0.0325	0.0354	0.1466
9.11	0.1437	0.1809	0.1531	0.7041*	0.7055	0.1298	0.7466*	0.7499	0.1025
12.13	-0.0659	-0.0681	0.0572	0.5498*	0.5859	0.1798	0.5202*	0.5572	0.1926
Global	0.0205	0.0206	0.0204	0.4937*	0.4963	0.0595	0.5041*	0.5713	0.0630

(\*):  $P < 0.05$



Tabla 3.3.3. Índices de diversidad genética para las localidades Rb analizadas.

Localidad	H esp	H obs	P(0.95) <sup>a</sup>	P(0.99) <sup>b</sup>	A/I
Periodo 2008-2010					
a. Garraf	0.3838	0.3736	1	1	2
c. La Granada	0.3033	0.3661	0.8571	0.8571	1.8571
d. Corbera de Llobregat	0.2299	0.1786	0.5714	0.5714	1.5714
e. Gavà	0.1965	0.2088	0.5714	0.5714	1.5714
f. Vilanova i la Geltrú	0.2500	0.1905	0.7143	0.7143	1.7143
g. Viladecans	0.3131	0.3651	0.8571	0.8571	1.8571
h. Sant Martí Sarroca	0.1349	0.1746	0.7143	0.7143	1.7143
i. El Prat de Llobregat	0.2481	0.2857	0.8571	0.8571	1.8571
j. Cubelles	0.3178	0.3265	0.7143	0.8571	1.8571
k. Sant Sadurní d'Anoia	0.2044	0.2030	0.4286	0.4286	1.4286
l. Calafell	0.2157	0.2707	0.7143	0.7143	1.7143
m. El Papiol	0.1629	0.0714	0.4286	0.4286	1.4286
n. Bellvei	0.3036	0.2619	0.7143	0.7143	1.7143
s. Les Pobles	0.0203	0.0220	0.1429	0.1429	1.1429
x. Santa Coloma de Queralt	0.1953	0.2245	0.4286	0.4286	1.4286
aa. Ametlla de Segarra	0.0573	0.0476	0.1429	0.1429	1.1429
Periodo 1996-2000					
a. Garraf	0.2748	0.2647	0.8571	1	2
b. Sant Pau d'Ordal	0.1890	0.1740	0.5714	0.7143	1.7143
c. La Granada	0.2646	0.2559	0.8571	1	2
e. Gavà	0.1534	0.1905	0.4286	0.4286	1.4286
f. Vilanova i la Geltrú	0.2029	0.1931	1	1	2
g. Viladecans	0.0848	0.1071	0.2857	0.2857	1.2857
h. Sant Martí Sarroca	0.0536	0.0714	0.1429	0.1429	1.1429
k. Sant Sadurní d'Anoia	0.2843	0.2245	0.7143	0.7143	1.7143
l. Calafell	0.1639	0.1857	0.5714	0.7143	1.7143
o. Bellaterra	0.0473	0.0415	0.2857	0.4286	1.4286
s. Les Pobles	0.1508	0.1677	0.4286	0.5714	1.5714
x. Santa Coloma de Queralt	0.1254	0.1633	0.4286	0.4286	1.4286
<sup>1</sup> Avinyonet del Penedès	0.1027	0.0357	0.2857	0.2857	1.2857
<sup>2</sup> Lavern	0.1690	0.2083	0.4286	0.5714	1.5714
<sup>3</sup> Sant Llorenç del Penedès	0.2714	0.3143	0.5714	0.5714	1.5714
<sup>4</sup> Vallbona d'Anoia	0.0457	0.0571	0.1429	0.1429	1.1429
<sup>5</sup> Barcelona	0.1796	0.2088	0.4286	0.5714	1.5714
<sup>7</sup> Sabadell	0.0536	0.0714	0.1429	0.1429	1.1429
<sup>10</sup> Calaf	0.0218	0.0238	0.1429	0.1429	1.1429
<sup>14</sup> Anglesola	0.0457	0.0571	0.1429	0.1429	1.1429

Abreviaturas: A/I, número medio de alelos en heterocigosis por locus en cada localidad; H<sub>esp</sub> y H<sub>obs</sub>, heterocigosis esperada y observada, respectivamente, para todos los locus en cada localidad. a, b polimorfismo de cada localidad para todos los locus con un intervalo de confianza del 95% y del 99%, respectivamente.





Tabla 3.3.4 Tests de concordancia (por encima de la diagonal) y coincidencia (por debajo de la diagonal) de las clinas metacéntricas correspondientes al periodo 2008-2010. Se representan los valores de  $\chi^2$  obtenidos en la comparación entre el modelo de máxima verosimilitud restringido y el no restringido para las pendientes (concordancia) y los centros (coincidencia) de las clinas. El nivel de significación se obtuvo después de efectuar la corrección de Bonferroni.

Metacéntrico	3.8	4.14	5.15	6.10	9.11	12.13	Global
3.8	—	0.15	1.31	0.38	0.06	0.61	2.17
4.14	119.48**	—	0.76	0.08	0.56	0.19	1.65
5.15	84.81**	0.17	—	0.23	2.66	0.19	0.02
6.10	19.98**	37.48**	25.69**	—	0.92	0.01	0.51
9.11	141.39**	0.11	0.019	37.76**	—	1.46	5.16
12.13	147.43**	4.19	5.28	64.15**	6.26	—	0.55
Global	160.74**	27.07**	15.01**	7.13	28.36**	58.03**	—

(\*\*)  $P < 0.01$

### Análisis temporales

Con objeto de efectuar comparaciones temporales por localidad, se calcularon los parámetros cromosómicos mencionados en el apartado precedente y los estadísticos de diversidad génica para el periodo 1996-2000 (Tablas 3.3.1, 3.3.2 y 3.3.3). En la mayor parte de las localidades contrastadas, se detectó un incremento de la media y de los rangos de  $2n$  durante el periodo 2008-2010. Asimismo, el estudio de las frecuencias metacéntricas entre subpoblaciones (prueba G) reveló cambios en los animales procedentes de Calafell [Rb(4.14),  $P < 0.001$ ; Rb(5.15),  $P = 0.025$ ; Rb(6.10),  $P = 0.011$ ; Rb(12.13),  $P < 0.001$ ], Garraf [Rb(5.15),  $P = 0.002$ ; Rb(6.10),  $P < 0.001$ ; Rb(9.11),  $P < 0.001$ ], Sant Sadurní d'Anoia [Rb(5.15),  $P < 0.001$ ; Rb(9.11),  $P = 0.032$ ], Les Pobles [Rb(4.14),  $P = 0.007$ ; Rb(12.13),  $P = 0.023$ ], La Granada [Rb(4.14),  $P < 0.011$ ], Gavà [Rb(6.10),  $P = 0.031$ ], Vilanova i la Geltrú [Rb(9.11),  $P < 0.019$ ] y Santa Coloma de Queralt [Rb(5.15),  $P = 0.032$ ]. De hecho, durante el último periodo, en los individuos de Viladecans, Garraf y La Granada se apreció un importante incremento del índice H (de 0.75 a 2.55, de 1.82 a 2.61 y de 1.79 a 2.56, respectivamente; Tabla 3.3.1). Esta tendencia se observó también en los ejemplares capturados en Sant Martí Sarroca, Calafell y Santa Coloma de



Queralt, aunque la variación entre ambos periodos no fue tan acusada como en las localidades antes mencionadas. Contrariamente, en los animales procedentes de Les Pobles y Bellaterra se observó una reducción en la media de cromosomas en heterocigosis (Tabla 3.3.1). Aunque en esta última localidad se detectó la presencia de las translocaciones Rb(4.14), (5.15) y (12.13) durante el periodo 1996-2000, ninguno de los individuos obtenidos en el último periodo presentó fusiones Rb. El grado de heterogeneidad cariotípica entre muestras temporales mostró valores elevados para casi todos los metacéntricos, resultado que sugiere la existencia de una diferenciación entre subpoblaciones (Tabla 3.3.2). No obstante, los valores de  $F_{ST}$  para las fusiones Rb(12.13), (4.14) y, especialmente, Rb(9.11) indicaron una diferenciación interpoblacional superior durante el primer periodo.

La variación de los parámetros clinales (centros y amplitudes) ajustados para los dos periodos estudiados (1996-2000 y 2008-2010) se muestra en la Figura 3.3.3. La prueba de máxima verosimilitud en la concordancia no reveló cambios significativos en la amplitud de las clinas entre ambas épocas. Sin embargo, las pruebas de coincidencia demostraron diferencias en los centros de las clinas de los metacéntricos Rb(4.14), (6.10) y, en menor grado, del metacéntrico Rb(5.15) (Figura 3.3.3). Estos resultados indican la aparición de ligeros cambios temporales en la distribución geográfica de algunas fusiones, pese a que la estructura del sistema se haya mantenido relativamente estable a lo largo del periodo considerado.

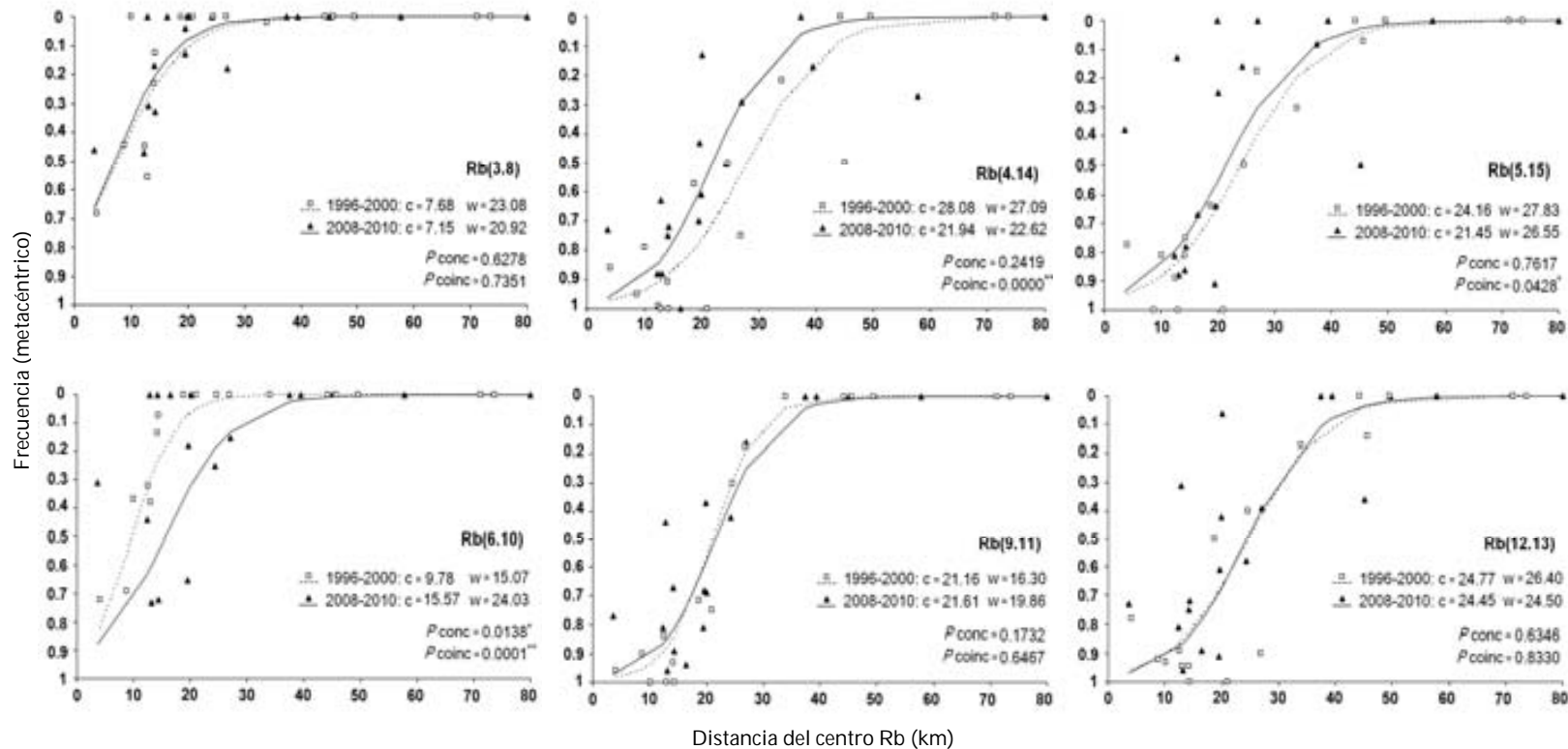


Figura 3.3.3. Comparación de las distribuciones clinales para cada metacéntrico entre los periodos 1996-2000 y 2008-2010. Abreviaturas:  $c$ , centro de las clinas ajustadas;  $w$ , amplitud clinal;  $P_{conc}$ , probabilidad de concordancia obtenida en la prueba de máxima verosimilitud entre el modelo restringido y el no restringido para la amplitud de las clinas;  $P_{coinc}$ , probabilidad de coincidencia obtenida en la prueba de máxima verosimilitud entre el modelo restringido y el no restringido para los centros clinales. (\*):  $P < 0.05$ ; (\*\*):  $P < 0.01$ . Nivel de significación obtenido tras aplicar la corrección de Bonferroni.



### 3.4. Discusión

Estudios previos sobre el SRbB postularon la existencia de una raza cromosómica propia de esta zona (Adolph y Klein, 1981; Nachman y col., 1994; Gündüz y col., 2001; Muñoz-Muñoz y col., 2003; Sans-Fuentes, 2004). Sin embargo, los datos aportados en estos trabajos tratados conjuntamente con los obtenidos en esta tesis permiten indicar que en dicho sistema no existe una raza parental, definida en el sentido de Hausser y col. (1994). Asimismo, las combinaciones de metacéntricos obtenidas en cada localidad (Apéndice 1) tampoco apoyan la presencia de una población constituida por individuos con una serie de fusiones fijadas en estado homocigótico, *sensu* Piálek y col. (2005). En consecuencia, según ya fue sugerido por Sans-Fuentes (2004), resulta más apropiado definir este sistema como una zona de polimorfismo Rb en lugar de una zona híbrida entre dos razas cromosómicas.

Los datos cromosómicos obtenidos en el presente estudio demuestran que, en ambos periodos analizados, los animales con el mayor número de fusiones se han detectado cerca de las localidades de Garraf y Viladecans, resultado indicativo de que el centro geográfico de polimorfismo Rb debe encontrarse en esta zona. No obstante, la media y el rango de  $2n$  aumentó entre los periodos considerados (1996-2000 y 2008-2010) en localidades próximas al centro del sistema. Durante el último periodo se capturó incluso un animal con cariotipo estándar en la localidad de Garraf (véase Tabla 3.3.1, Apéndice 3.1). Estos resultados sugieren que procesos de introgresión de animales hacia el centro del sistema Rb podrían estar alterando las frecuencias de metacéntricos esperadas en el área de estudio. La llegada de ratones alóctonos al centro de una zona metacéntrica ha sido también descrita en otras poblaciones Rb de Italia (Franchini y col., 2007; Castiglia y Capanna, 1999) y Madeira (Nunes y col., 2005). En estos casos, tal y como podría suceder en el SRbB, factores de carácter antrópico actuaron sobre los procesos de dispersión de los ratones comensales (Chatti y col., 1999; Castiglia y Capanna, 1999). Así, por ejemplo, el transporte pasivo mediante vehículos de mercancías, especialmente entre áreas



agrícolas, podría haber promovido eventos de introgresión independientemente de la dispersión natural de los individuos (Cucchi y col., 2005; Franchini y col., 2007), comportando la interacción entre animales con distinto grado de polimorfismo en determinadas localidades. Dicha hipótesis podría explicar el aumento observado en el grado de heterocigosis por localidad (índices H y A/I), en el porcentaje de individuos con múltiples cromosomas en heterocigosis durante el último periodo 2008-2010 y en las variaciones del grado de subdivisión genética en la zona de estudio. En relación a este último aspecto, los valores  $F_{ST}$  obtenidos para ambas muestras temporales (1996-2000 y 2008-2010) indicaron niveles significativos de fragmentación entre subpoblaciones en el área estudiada. Dichos valores fueron incluso menores para el periodo 2008-2010, resultado que sugiere la existencia de una ligera homogeneización genotípica entre localidades.

Según Franchini y col. (2007), el elevado grado de fragmentación genética detectado en poblaciones de ratón doméstico puede explicarse por la propia dinámica poblacional de la especie, en la que el comensalismo juega un papel importante como factor limitante en la dispersión de individuos entre localidades. Por ello, debe considerarse que el grado de subdivisión poblacional puede verse alterado cuando se producen cambios en el uso y gestión de las áreas agrícolas. Así, mientras que un incremento del comercio entre distintas localidades o regiones podría determinar la intrusión de animales alóctonos, homogeneizando el nivel de fragmentación genética con el paso de las generaciones, el reemplazo de granjas por zonas urbanas (como sucede en las cercanías de Barcelona, Tarragona y Lérida) o la conversión de la agricultura tradicional a prácticas intensivas, podría incrementar el grado de aislamiento entre algunas poblaciones, facilitando la fijación de fusiones por deriva o endogamia. Ello explicaría las altas frecuencias inesperadas de algunas fusiones en ciertos ejemplares capturados lejos del centro del sistema (por ejemplo, en las localidades de Santa Coloma de Queralt y Ametlla de Segarra). De todos modos, cabe la posibilidad de que la presencia de fluctuaciones en el grado de subdivisión genética entre periodos se deba a la reciente aparición de algunas



de las mutaciones cromosómicas detectadas en la zona de estudio. Bajo estas circunstancias, cabe sugerir que la población Rb todavía no ha alcanzado su propio equilibrio entre migración y deriva, y que, por tanto, las diferencias detectadas en los  $F_{ST}$  entre ambos periodos podrían simplemente reflejar como el sistema está alcanzando su equilibrio.

Las teorías clásicas de eficiencia híbrida sugieren que los ratones con cierto número de translocaciones en heterocigosis tienden a ser eliminados de la zona híbrida debido a los efectos adversos de dichas mutaciones sobre la fertilidad por generación de un alto porcentaje de gametos aneuploides (Wallace y col., 1992; Hauffe y Searle, 1998). No obstante, en el SRbB se describieron animales con siete fusiones en heterocigosis durante el periodo 1996-2000. En la muestra más reciente han sido detectados frecuentemente individuos con hasta cuatro metacéntricos en heterocigosis. *A priori*, esta situación sugiere que la selección no está actuando contra los híbridos de forma tan severa como sería de esperar. Paradójicamente, durante las prospecciones realizadas en el periodo 2008-2010 no se obtuvieron individuos con más de cinco fusiones en heterocigosis. Esta situación podría indicar que la selección solamente actúa en contra de los heterocigotos si el número de fusiones supera dicho umbral. Esta circunstancia concuerda con los resultados obtenidos en otros sistemas Rb de ratón doméstico, en los que la presencia de una a tres fusiones en heterocigosis no necesariamente implica la aparición de drásticas alteraciones en la reproducción (Wallace y col., 1992, 2002).

En modelos de selección en contra de los híbridos, la amplitud de una clina metacéntrica, entendida como un parámetro indicativo del flujo génico, puede proporcionar información suplementaria acerca del grado de aislamiento reproductivo en una zona de contacto (Barton y Gale, 1993). En particular, la presencia de clinas estrechas y coincidentes (con centros semejantes) reflejaría procesos de restricción al flujo génico entre poblaciones y una fuerte selección en contra de los híbridos. Por el contrario, la presencia de clinas amplias indicaría una notable aptitud de los híbridos y la desaparición parcial de barreras de restricción del flujo génico entre poblaciones (Barton, 1979; Sage y



col., 1993; Auffray y col., 1990). Los análisis del patrón de distribución general del SRbB mostraron la presencia de varias clinas Rb con notable amplitud (Figura 3.3.2), indicando que el flujo génico entre ratones St y Rb ocurre sin severas restricciones. Este hallazgo concuerda con los resultados obtenidos en los parámetros cromosómicos (rangos y medias del  $2n$ , H, A/I por localidad, y frecuencias para cada metacéntrico), en los que el intercambio genético entre poblaciones puede ejercer un papel importante.

Los análisis comparativos entre clinas, correspondientes al periodo 2008-2010, indicaron que todas las fusiones mantienen un patrón concordante a lo largo del área estudiada. Por el contrario, la no-coincidencia de los centros para los metacéntricos Rb(3.8) y (6.10), significativamente desplazados del resto de las clinas, reveló un patrón de distribución escalonado. Cuando se hallan diferencias cromosómicas substanciales entre razas St y Rb, como ocurre en ratones de Italia (Franchini y col., 2010) y Túnez (Saïd y col., 1999), las fuerzas selectivas tienden a preservar las clinas unidas debido a la fuerte esterilidad de los híbridos (Searle, 1993). Por el contrario, el escalonamiento puede producirse cuando dichas diferencias cromosómicas son menores y las fuerzas restrictivas son más débiles, por ejemplo, en un contexto de contacto primario entre animales Rb y St con pocas fusiones. Considerando que la presencia de una translocación Rb puede conducir a la aparición de nuevas reorganizaciones cromosómicas (Winking, 1986), en un escenario de contacto primario, el escalonamiento de las clinas podría reflejar el orden de aparición de las fusiones. Así, la fusión más ampliamente distribuida, como es el caso de la Rb(12.13), sería la primera en haberse originado y aquéllas con la distribución más reducida, es decir la Rb(3.8) y Rb(7.17), serían las de aparición más reciente (Figura 3.3.3). La hipótesis de origen por contacto primario del SRbB se ve reforzada por el hecho de que la combinación de metacéntricos descrita en la zona estudiada no ha sido observada en ningún otro sistema Rb (Piálek y col., 2005). Asimismo, los resultados obtenidos en distintos análisis moleculares indican un origen independiente de las fusiones compartidas con otros sistemas Rb (Riginos y Nachman, 1999). Si bien, la presencia de escalonamiento clinal ha



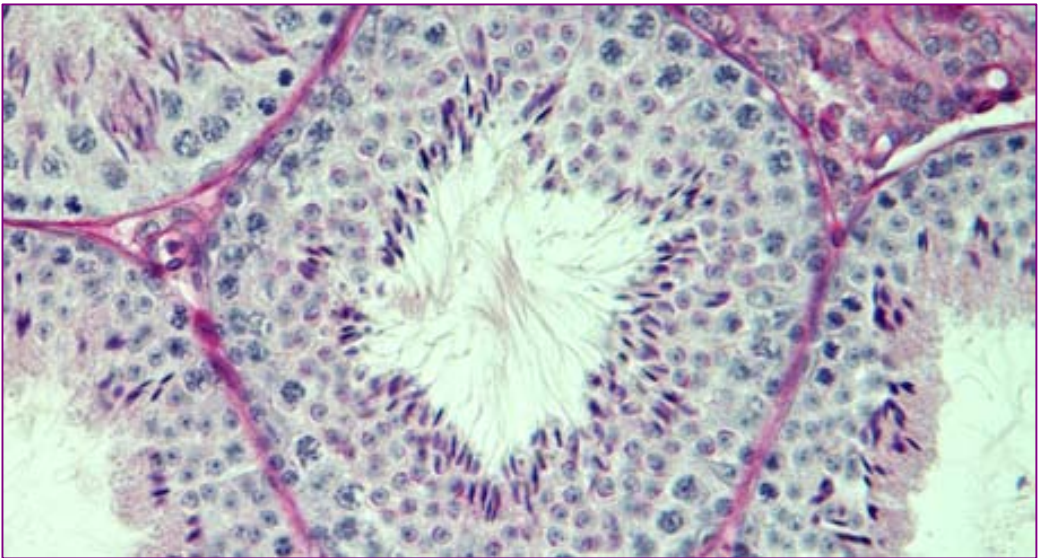
sido detectado en otros sistemas Rb de *M. musculus domesticus*, la presencia de razas metacéntricas en regiones geográficas colindantes apoya la hipótesis de contacto secundario en estas zonas (Gündüz y col., 2010).

La comparación temporal de las clinas de cada fusión indicó que el patrón de distribución de la estructura general de la zona no varió significativamente entre 1996-2000 y 2008-2010. No obstante, los metacéntricos Rb(4.14), Rb(6.10) y Rb(5.15) mostraron cambios en la posición de los centros de sus clinas. Pese a que la tendencia actual refleja un movimiento de retroceso para las fusiones Rb(4.14) y Rb(5.15) hacia el centro geográfico de polimorfismo, la clina del Rb(6.10) indica que esta fusión se ha propagado a lo largo del periodo considerado. El desplazamiento de las zonas híbridas ha sido objeto de estudio ante situaciones en las que acontece algún tipo de ventaja ecológica (Bull y Burzacott, 2001), etológica (Cabrero y col., 1999; Leaché y Cole, 2007), o de cualquier otro tipo, en las que ciertos taxones híbridos se ven favorecidos. En estos casos, es posible que ocurra un desplazamiento de la zona híbrida a favor del taxón de rango superior (Barton y Hewitt, 1985; Dorken y Pannell, 2007; Yannic y col., 2009). No obstante, aunque no se cumplan estas circunstancias de ventaja selectiva, pueden tener lugar movimientos en la zona de tensión como respuesta al desplazamiento de individuos desde zonas de alta densidad demográfica hacia zonas menos pobladas (Barton y Hewitt, 1985). En el SRbB, el desequilibrio entre actividades humanas (urbanización, transporte comercial o abandono de zonas rurales) y la dinámica de radiación de *M. musculus domesticus* podría ser la causa del desplazamiento del centro de algunas clinas. La magnitud y la frecuencia de estos eventos, así como el grado de fijación de cada fusión en cada población, podría alterar indirectamente el equilibrio entre selección y dispersión en la zona de tensión. Por lo tanto, variaciones intrínsecas en la composición cromosómica podrían repercutir sobre la estructura global de la zona de contacto. No obstante, es necesario continuar evaluando los efectos de las complejas variaciones sucedidas localmente en el patrón clinal global para evitar sobrestimas en los cambios detectados entre periodos temporales.





## Capítulo 4.



**Apoptosis y alteraciones  
ultraestructurales en la  
espermatogénesis**

---



## 4.1. Introducción

### 4.1.1. La espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo mediante el cual células germinales primordiales proliferan, reducen su dotación cromosómica a la mitad y se citodiferencian para dar lugar a un elevado número de gametos masculinos maduros (Oakberg, 1956). En el ratón doméstico, el proceso de producción de gametos se inicia en la fase embrionaria, cuando las células germinales colonizan las crestas genitales unos once días después de la cópula (McLaren y Southee, 1997). Estas células continúan dividiéndose mitóticamente durante las siguientes 72 horas y se detienen, como T-espermatogonias, hasta poco después del nacimiento del individuo (McLaren, 1984).

La fase de proliferación mitótica se reinicia con la activación de las T-espermatogonias, que dan lugar a espermatogonias del tipo A1 (Fig. 4.1.1). Éstas son capaces de generar numerosos clones celulares mediante sucesivas divisiones mitóticas. La morfología de las células producidas en cada división mitótica presenta características diferentes a las parentales. Así, es posible diferenciar las espermatogonias A1-4 durante las primeras tres mitosis, las espermatogonias de tipo intermedio después de la cuarta mitosis y, finalmente, las de tipo B después de la quinta división. Las espermatogonias de tipo B serán las encargadas de la formación de los espermatoцитos primarios, al igual que en el resto de casos mediante mitosis.

La fase de división meiótica no se inicia hasta, al menos, una semana después del nacimiento. Durante esta etapa, cada espermatoцитo primario en fase de preleptoteno duplica su material genético y experimenta la primera profase meiótica. En esta fase, las cromátidas hermanas de los cromosomas homólogos contactan para formar el complejo sinaptonemal y, consecuentemente, el intercambio de material genético. La primera división meiótica finaliza con el desplazamiento de los cromosomas homólogos hacia los extremos opuestos de la célula y la citoquinesis. De este modo, a partir de cada espermatoцитo primario resultan dos espermatoцитos secundarios dotados con un único juego



de cromosomas. Con la segunda división meiótica cada espermatocito secundario formará dos espermátidas redondas, que tan sólo presentarán una de las cromátidas, resultantes de la primera división meiótica.

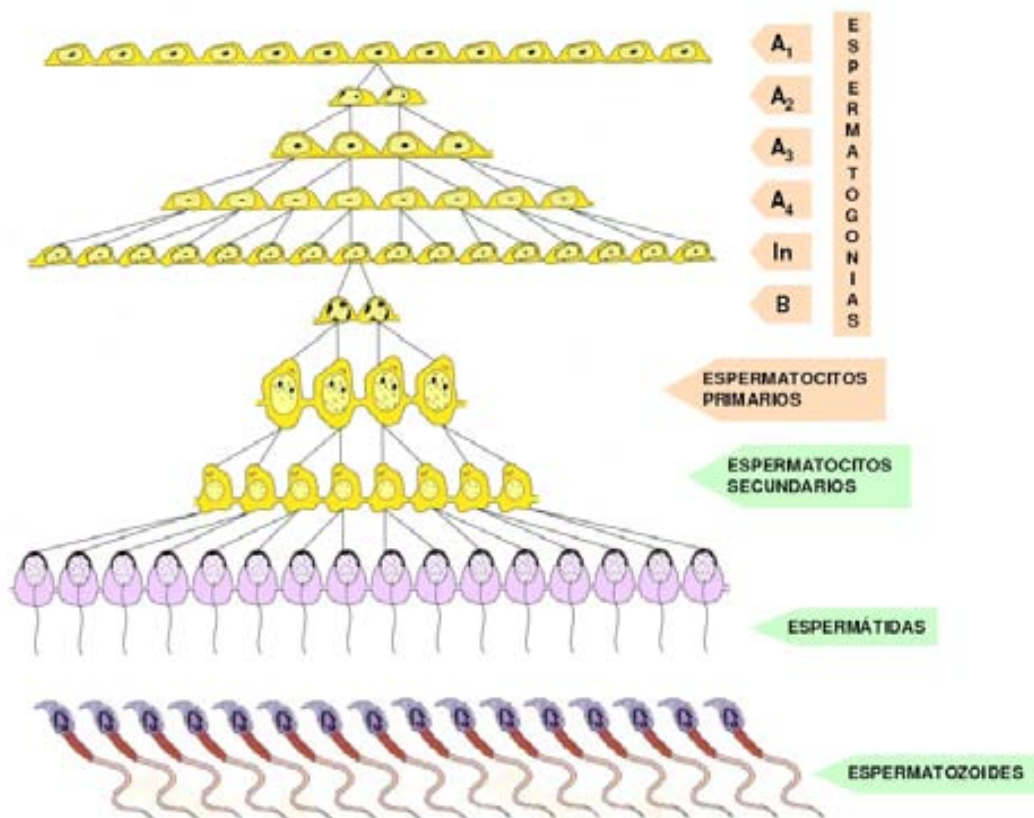


Figura 4.1.1. Esquema de la espermatogénesis en el ratón doméstico. Los tipos celulares diploides se indican en rosa y los haploides en verde. Imagen extraída de Sans-Fuentes (2004).

Estas espermátidas sufrirán procesos de citodiferenciación (espermiogénesis), en los que se llevará a cabo la compactación del material genético, la elongación de la célula y el desprendimiento de gran parte del componente citoplasmático (Fig. 4.1.2). En el caso del ratón doméstico, durante la espermiogénesis las espermátidas pasan de presentar una morfología redondeada a formas alargadas complejas, pobres en citoesqueleto y en las que se diferencia un proceso apical y un largo flagelo. Esta etapa se completará con la formación de espermatozoides maduros, que se desprenderán a la cavidad luminal a través de



la espermiación, un proceso de ruptura de las conexiones citoplasmáticas existentes entre el gameto y el epitelio seminífero.

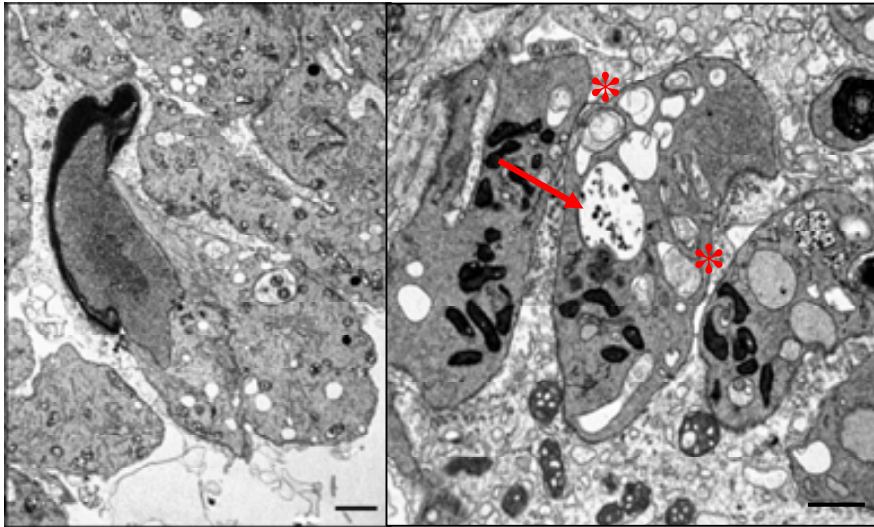


Figura 4.1.2. Micrografía electrónica de transmisión de una espermátida de *M. musculus domesticus* en fase de elongación (izquierda) y detalle de restos citoplasmáticos de las espermátidas elongadas en proceso de endocitosis (derecha). En esta última imagen pueden apreciarse vacuolas con doble membrana (\*) y lisosomas con actividad enzimática (→). Barras de escala = 2  $\mu$ m.

#### 4.1.2. Espermatogénesis y apoptosis

La espermatogénesis es un proceso sensible y relativamente poco eficiente en el que, en condiciones normales, se pierde entre un 25 y un 75 % de las células que potencialmente pueden originar espermatozoides (Heninger y col., 2004). Para que la producción de gametos ocurra de forma adecuada es necesaria la correcta expresión de multitud de genes espermatogénéticos específicos, responsables de configurar la maquinaria transcripcional imprescindible para la elongación y compactación del espermatozoide. La aparición de alteraciones, sobre todo durante las fases premeióticas y meióticas, puede acarrear graves problemas de fertilidad en los individuos (Redi y Capanna, 1978). Por ello, la intervención de mecanismos reguladores, como la apoptosis (también llamada muerte celular programada), es esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular.



La apoptosis es un proceso genéticamente controlado a través del cual las células de un tejido inducen su propia muerte sin que se produzca lisis celular o una respuesta inflamatoria, característica que la distingue de otras vías de muerte celular, como la necrosis (Fig. 4.1.3). Este proceso acontece de forma habitual durante el ciclo espermatogénico como método de restricción sobre el número de células germinales para garantizar la continua generación de gametos masculinos (Roosen-Runge, 1977). No obstante, también tiene gran importancia en la eliminación selectiva de espermátocitos que no completan la meiosis, de espermatogonias dañadas o de espermátidas con malformaciones o aneuploidias (Print y Loveland, 2000).

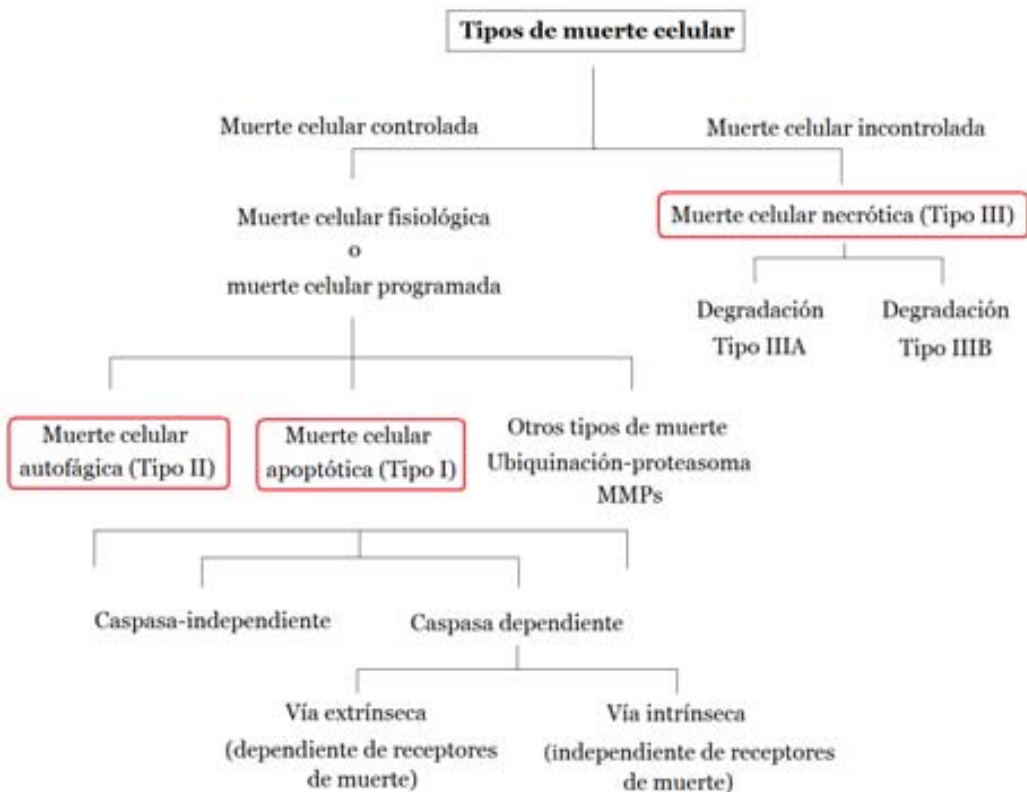


Figura 4.1.3. Esquema de los distintos tipos de muerte celular según Kim (2004).



#### 4.1.2.1. Inducción al proceso apoptótico

La apoptosis puede activarse mediante diversas señales que pueden tener un origen fisiológico (intrínsecas) o ambiental (extrínsecas) (Reed, 2000; Zimmermann y Green, 2001). La activación intrínseca (Figs. 4.1.3 y 4.1.4) se inicia mediante señales procedentes de la propia célula, que son mediadas por las mitocondrias y en las que se liberan proteínas proapoptóticas, como el citocromo C o el Factor de Inducción Apoptótico (AIF), al activarse las vías de estrés celular. La liberación del citocromo C induce la activación de una cadena de proteasas citoplasmáticas proapoptóticas, las caspasas, mediante la formación de un complejo multiproteico llamado apoptosoma. Estas caspasas serán las encargadas de integrar y amplificar las señales apoptóticas con el fin de iniciar el proceso de fragmentación nuclear, mediante la activación de ADNasas y la inhibición de enzimas de reparación del material genético. Contrariamente, la vía apoptótica mediada por el AIF se ha definido como caspasa-independiente puesto que induce la activación directa de nucleasas, ocasionando fragmentación del ADN nuclear (Galluzzi y col., 2007). Si bien la actuación de las mitocondrias es esencial en el proceso de inducción de muerte celular de forma intrínseca, recientemente se ha demostrado que el retículo endoplasmático también es capaz de desencadenar la activación en cascada de las caspasas sin necesidad de la liberación mitocondrial de citocromo C (Morishima y col., 2002; Galluzzi y col., 2007). Este mecanismo sigue siendo objeto de estudio ya que se desconoce su modo de actuación.

La inducción apoptótica por vías extrínsecas (Fig. 4.1.4) tiene lugar cuando se produce la activación de receptores de membrana asociados al proceso de muerte celular [como, por ejemplo, Fas (Lizama y col., 2007), Apo-1 (Dhein y col., 1995) o TNF (Factores de Necrosis Tumoral; Rath y Aggarwal, 1999)]. Como resultado, se genera un complejo de membrana desencadenante de la activación en cascada de caspasas. Al igual que en el proceso iniciado por la ruta intrínseca, dichas proteasas inducen la activación de un programa genético que



conduce, generalmente, a la nucleólisis por acción de endonucleasas (Silvestri y col., 1995).

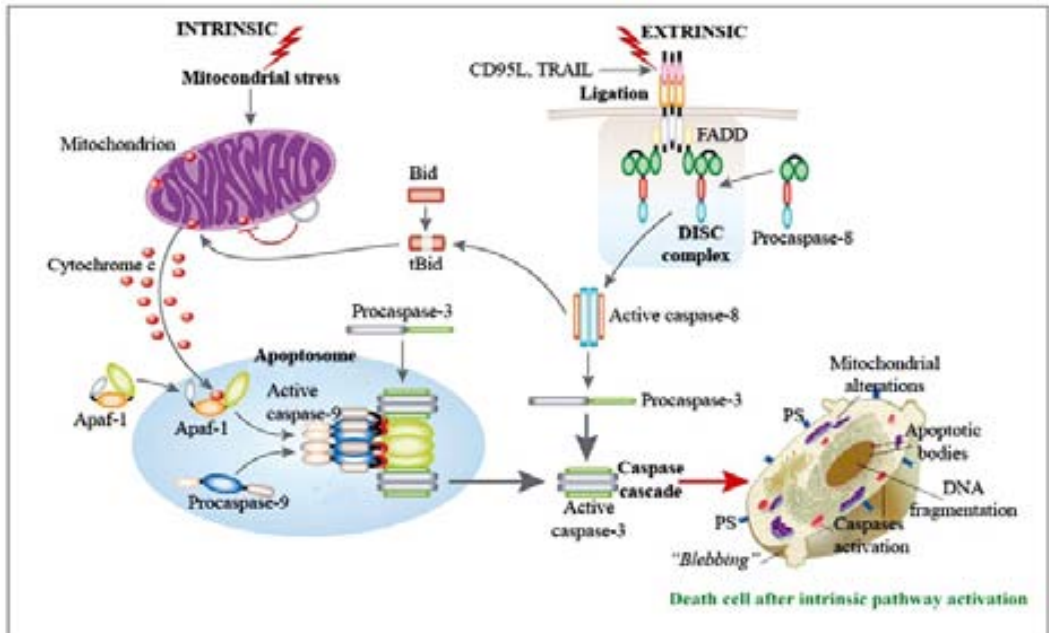


Figura 4.1.4. Esquema de las vías de inducción apoptótica. Figura extraída de Calvino-Fernández y Parra-Cid (2010).

#### 4.1.2.2. Morfología de las células apoptóticas

Cuando las células reciben las señales específicas responsables del desencadenamiento del proceso apoptótico, sufren una serie de cambios morfológicos característicos asociados a los procesos de fragmentación nuclear y a la reducción del volumen celular (Kerr y col., 1972). Así, las células apoptóticas adquieren un aspecto contraído, en el que es posible observar la separación entre la membrana celular y el citoesqueleto. A su vez, el citoplasma se hace electrodenso debido a la gran concentración de orgánulos en la región citoplasmática y a la condensación de la cromatina nuclear, que acaba formando grandes acúmulos alrededor de la membrana nuclear (picnosis) (Fig. 4.1.5). No obstante, durante la mayor parte del proceso, las membranas se mantienen indemnes, de modo que no se produce la liberación de componentes



citoplasmáticos y, por tanto, no se desencadena ninguna respuesta inflamatoria (Fadock y col., 1992). Además, los orgánulos permanecen también intactos hasta las fases más tardías de muerte celular, hecho que sugiere que la actividad metabólica en la célula se prolonga considerablemente (Martin, 1993). Durante las últimas etapas apoptóticas se inicia una fase de escisión, tanto nuclear como citoplasmática, generadora de pequeños fragmentos celulares (cuerpos apoptóticos) que serán rápidamente fagocitados por macrófagos o por células epiteliales vecinas (Wyllie y col., 1984; Fadock y col., 1992; Cohen, 1993a).

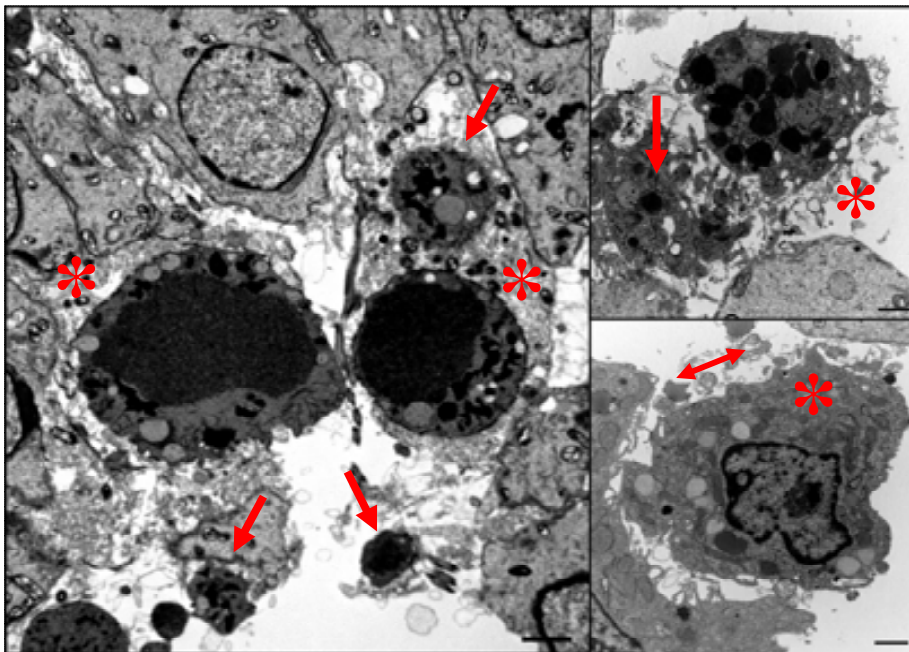


Fig. 4.1.5. Micrografías electrónicas de células apoptóticas. Puede apreciarse la contracción celular y el aspecto electrodensó del núcleo (\*), así como la formación de pequeños cuerpos apoptóticos en la región periférica (→). Barras de escala = 2  $\mu$ m.

#### 4.1.2.3. Regulación génica de la apoptosis

Los primeros estudios sobre la regulación génica de la apoptosis se realizaron en el nematodo *Caenorhabditis elegans* y permitieron identificar algunos de los genes implicados en la síntesis de proteínas apoptóticas, genes tales como *egl-1*, *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* (Ellis y col., 1991). Recientemente se ha demostrado que,





pese a que los tres primeros codifican proteínas inductoras de la apoptosis, el gen *ced-9* codifica una proteína con actividad antiapoptótica, capaz de bloquear la cascada de activación de las caspasas (Elinos-Báez y col., 2001). En vertebrados, la maquinaria involucrada en la regulación de la apoptosis es mucho más compleja que en *C. elegans*, de modo que, además de existir moléculas homólogas a las halladas en el nemátodo (Bcl-2, Apaf-1 y caspasas, de función equivalente a las proteínas codificadas por *ced-9*, *egl-1* y *ced-3*, respectivamente), también actúan otras proteínas adicionales, como las proapoptóticas Bcl-2, Bax y Bak, y las antiapoptóticas IAP y CIB1 (Yuan y col., 2006; Lizima y col., 2007; Merico y col., 2008). Consecuentemente, el destino de una célula a morir o sobrevivir vendrá determinado por las diferencias en la expresión de estas proteínas, actuando algunas como promotoras y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis (Boise y col., 1993, 1995; Yang y col., 1995; Christakos y Liu, 2004).

#### 4.1.3. Translocaciones Rb y apoptosis

Diversos estudios efectuados en ratón doméstico han demostrado la existencia de una estrecha asociación entre translocaciones Rb, alteraciones durante la espermatogénesis y activación de la vía de muerte celular apoptótica (Eaker y col., 2001; Merico y col., 2008; Manterola y col., 2009). La presencia de múltiples configuraciones trivalentes en individuos heterocigotos se ha considerado como uno de los mecanismos de activación apoptótica de mayor importancia, dada su propensión a alterar los procesos de disyunción meiótica durante las fases más tardías de la espermatogénesis (Searle, 1993; Everet y col., 1996; Eaker y col., 2001) y a incrementar los apareamientos cromosómicos defectivos durante la recombinación entre cromátidas hermanas (Castiglia y Capanna, 2002; Wallace y col., 2002; Merico y col., 2003; Pinton y col., 2009). No obstante, las reorganizaciones cromosómicas pueden también actuar sobre las vías de muerte celular mediante la inducción de cambios en la interacción física de porciones específicas del genoma, repercutiendo sobre el control de la



expresión de genes esenciales para la correcta maduración del epitelio seminífero (Garagna y col., 2001b). Como respuesta homeostática a la presencia de alteraciones gaméticas, es frecuente la inducción del proceso apoptótico en las células afectadas, evitándose así la formación y proliferación de gametos aneuploides o no aptos para la fecundación (Eaker y col., 2001; Wallace y col., 1992, 2002; Merico y col., 2003, 2008). La menor producción de células germinales y la disminución del tamaño de camada son algunas de las alteraciones asociadas a la presencia de dichas reorganizaciones, fenómenos que acaban comportando la aparición de individuos sexualmente menos aptos (White, 1978; Said y col., 1993; Rieseberg, 2001; Manterola y col., 2009). De todos modos, cabe tener en cuenta que las posibles modificaciones del potencial reproductor de los individuos causadas por la presencia de metacéntricos puede variar considerablemente en función del número y tipo de fusiones (Redi y Garagna, 1985; Eaker y col., 2001; Merico y col., 2003, 2008), la presencia de incompatibilidades génicas entre los individuos parentales (Redi y col., 1985; Searle, 1993; Hauffe y Searle, 1998; Castiglia y Capanna, 2002) y/o el número y disposición espacial de los puntos de intercambio genético en los metacéntricos durante las primeras etapas meióticas (Garagna y col., 1989; Wallace y col., 1992, 2002; Merico y col., 2003).

#### 4.1.4. Antecedentes en la zona de estudio

Estudios previos en el SRbB han demostrado la existencia de ciertas alteraciones en la espermatogénesis relacionadas con la presencia de translocaciones Rb (Sans-Fuentes y col., 2010). Concretamente, se observó una menor producción de células germinales (tanto espermatocitos como espermátidas) y un número claramente mayor de túbulos seminíferos defectivos en aquellos individuos portadores de tres fusiones en heterocigosis. Asimismo, los valores referentes al grado de muerte germinal (GCD) y al número de células de Sertoli indicaron la existencia de una mayor muerte celular en los heterocigotos múltiples, y de valores semejantes entre los



animales St y aquellos Rb con todas las fusiones en homocigosis. Estos resultados sugieren que la apoptosis podría desempeñar un papel relevante en el proceso de ajuste del número de células germinales y en el control de la calidad de los gametos producidos. No obstante, la gran variabilidad interindividual detectada en el estudio de Sans-Fuentes y col. (2010) sugiere que la disminución de células germinales podría deberse al efecto combinado de diversos factores, como el número de fusiones, el tipo de cromosomas implicados en cada fusión y/o la presencia de heterocigosis estructural.

#### 4.1.5. Objetivos

Tomado en consideración los antecedentes acabados de indicar, el objetivo principal de este apartado de la tesis es determinar, mediante un análisis cuantitativo, si existe una variación significativa de muerte celular programada en función del grado de polimorfismo Rb existente en la zona de estudio. Asimismo, se pretende conocer si existen alteraciones ultraestructurales asociadas a la presencia de fusiones, tanto en células germinales en proceso de citodiferenciación como en gametos epididimales ya formados.

## 4.2. Material y métodos

Se analizó el epitelio seminífero de 23 testículos izquierdos procedentes de individuos capturados durante los meses de primavera de los años 2011 y 2012 (Apéndice 2; Anexo 1). Las muestras fueron distribuidas en tres grupos según el número diploide ( $2n$ ) del ejemplar: Rb(28-32), Rb(33-37) y St ( $2n=40$ ). Asimismo, en función del grado de heterocigosis estructural (Ht) se establecieron las siguientes agrupaciones: H1 (una fusión Rb en heterocigosis), H2 (dos fusiones Rb en heterocigosis), H3 (tres fusiones Rb en heterocigosis) y MM (todas las fusiones en homocigosis). Las muestras se fijaron en solución 'Bouin' durante dos horas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se substituyó el fijador por etanol 70°, renovándose de forma periódica hasta que



el tejido adquirió un tono blanquecino. Posteriormente, los testículos se deshidrataron pasándolos por un gradiente de alcoholes (etanol 70°- 96°- absoluto) y xileno y, a continuación, se envolvieron en Paraplast 56°. Para cada muestra se seleccionaron tres bloques histológicos de seis secciones seriadas (tres para efectuar la cuantificación de apoptosis y tres para la identificación de los estadios de maduración de los túbulos seminíferos) de cinco micras de espesor correspondientes a la zona central del testículo. La señalización de las células apoptóticas en el tejido estudiado se realizó mediante el método de ensayo TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling*), específico para la detección de fragmentación del ADN por nucleasas endógenas. Concretamente se utilizó el kit 'ApopTag Plus Peroxidase *in situ* Apoptosis Detection' (Chemicon International, Temecula, CA, USA). Seguidamente, las secciones se contracolorearon con verde de metilo al 0,5% durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para cada individuo se calculó el promedio de túbulos apoptóticos por sección, considerando como tales aquéllos con un mínimo de 3 células TUNEL positivas (T+). Si bien el número de túbulos totales por sección varió entre individuos, se obtuvo el % de túbulos T+ para cada individuo con objeto de evitar sobreestimas al agrupar los ejemplares en relación al grupo cromosómico. Adicionalmente se cuantificó el promedio de células T+ por túbulo apoptótico y los tipos celulares afectados por dicho proceso. Estos datos se compararon con el índice GCD, estimador del grado de muerte de células germinales en el tejido testicular. Dicho índice se obtuvo a partir del recuento de espermatocitos en paquiteno (SP) y espermátidas redondas (SR) en un total de 40 túbulos seminíferos por sección, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ GCD} = 100 (1 - \text{SR}/(4\text{SP}))$$

Con objeto de evaluar qué estadios de maduración son más susceptibles de sufrir apoptosis, se calculó el porcentaje de túbulos T+ para cada estadio. Se estimó la frecuencia relativa de cada uno de los estadios de maduración espermátidica en el tejido mediante recuento de un mínimo de 100 túbulos



seminíferos por sección. Asimismo, se estimó la presencia de posibles alteraciones en la duración de los estadios por animal y por grupo cromosómico.

La identificación de los estadios de los túbulos seminíferos y los tipos celulares presentes en cada estadio se llevó a cabo siguiendo los criterios establecidos por Oackberg (1956) y Russell y col. (1990), basados en la morfología de las espermatidas, el grado de desarrollo acrosómico, los tipos celulares presentes en el tejido y el grado de condensación cromatínica de los espermatoцитos (Fig. 4.2.1.). Los estadios identificados fueron los siguientes:

#### Estadio I

En el epitelio se pueden diferenciar tres tipos celulares: i) espermatoцитos en fase de paquiteno, de aspecto redondo y núcleo con condensación cromatínica que ocupa la mayor parte del interior nuclear; ii) espermatidas redondas en estadio I, caracterizadas por la ausencia general de componentes acrosómicos y por presentar un tamaño menor que los espermatoцитos secundarios; iii) espermatidas elongadas en estadio de maduración XIII, en el que las espermatidas ya alargadas y con núcleos notablemente compactados empiezan a diferenciar el ápice del proceso apical.

#### Estadio II-III

Estadio caracterizado por presentar cuatro tipos celulares: i) espermatogonias A4 e intermedias, de aspecto ovoide, núcleo homogéneo aunque con condensaciones de cromatina alrededor de la envoltura nuclear; ii) espermatoцитos en paquiteno, con grandes acúmulos de cromatina en el núcleo y de tamaño ligeramente mayor que en el estadio anterior; iii) espermatidas redondas II-III, en las que la vesícula acrosómica adquiere un mayor tamaño y contacta con el núcleo; según el grado de desarrollo se determinará como estadio II ó III; iv) espermatidas elongadas en estadio XIV, en las que la cabeza se engrosa y acorta, adquiriendo un aspecto más robusto.



#### Estadio IV

En este estadio se distinguen cuatro tipos celulares: i) espermatogonias intermedias y del tipo B, de aspecto muy similar, aunque en estas últimas el grado de condensación nuclear es ligeramente mayor; ii) espermatocitos en paquiteno, de mayor tamaño que los espermatocitos del estadio precedente y con una condensación cromatídica más densa; iii) espermátidas IV, caracterizadas por presentar una vesícula proacrosómica bien desarrollada y de contorno ovoide, no circular como en fases previas; iv) espermátidas en estadio XV, de aspecto más estilizado y con acúmulos de mitocondrias cerca del flagelo.

#### Estadio V

Este estadio consta de: i) espermatogonias del tipo B; ii) espermatocitos en paquiteno en los que es posible distinguir componentes nucleolares; iii) espermátidas redondas V, en las que la vesícula acrosómica se expande alrededor del núcleo disponiéndose en un ángulo de 45 a 95°; iv) espermátidas elongadas en fase XV, en las que es posible observar la alineación de las mitocondrias con el flagelo y la formación de la pieza media.

#### Estadio VI

Estadio integrado por: i) espermatogonias B; ii) espermatocitos en paquiteno de tamaño considerable; iii) espermátidas redondas VI, en las que la vesícula proacrosómica está expandida alrededor del núcleo formando un ángulo de 100-120°; iv) espermátidas elongadas en fase XV, en las que se inicia la formación de la cresta ventral superior.

#### Estadio VII

El estadio VII se compone de: i) espermatocitos en preleptoteno y en paquiteno; ii) espermátidas redondas en fase VII, con la vesícula acrosómica formando un ángulo entre 120 y 150° y en las que se aprecia la maquinaria de ensamblaje del flagelo; iii) espermátidas elongadas en fase XVI, caracterizadas por la presencia de una cresta ventral superior bien formada y el inicio de la rotura del complejo



tubular o manquete (estructura microtubular circundante al proceso apical del gameto).

### Estadio VIII

En este estadio es posible distinguir: i) espermatocitos en leptoteno y paquiteno, éstos últimos con un tamaño notablemente mayor al resto de tipos celulares; ii) espermátidas redondas VIII, caracterizadas por el desplazamiento del núcleo y vesícula acrosómica hacia un extremo del citoplasma; durante esta fase el núcleo empieza a alargarse ligeramente, adquiriendo una perfil ovoide; iii) espermátidas elongadas XVI, en las que el desprendimiento del citoplasma sobrante forma un cuerpo residual citoplasmático en la región de inserción flagelar; también es posible distinguir la cresta ventral inferior y una notable curvatura del proceso apical.

### Estadio IX

El estadio IX presenta: i) espermatocitos en leptoteno y en fase paquiteno; ii) espermátidas en estadio IX, en las que se ha iniciado el proceso de elongación ápico-caudal; en este estadio cerca del 50% de la superficie dorsal del núcleo se encuentra cubierta por el acrosoma, y el flagelo y los haces de microtúbulos del manquete se hallan completamente desarrollados.

### Estadio X

En este estadio se aprecian: i) espermatocitos en fase de leptoteno/cigoteno y en paquiteno, siendo éstos últimos los de mayor tamaño en el epitelio; ii) espermátidas X, en las que continúa el proceso de elongación y aplanamiento bilateral; el ápice del proceso apical empieza a pronunciarse y el componente citoplasmático se desplaza paulatinamente hacia la base del gameto.

### Estadio XI

De manera semejante al estadio precedente, en el estadio XI los espermatocitos en fase de cigoteno presentan una morfología notablemente más reducida, redondeada y condensada que los espermatocitos en fase diploteno (de



contorno irregular y con cromatina menos condensada). Las espermátidas en fase XI son alargadas y estrechas, y con la región basal terminada en un ángulo marcado.

### Estadio XII

En este estadio finaliza la primera división meiótica de los espermatocitos en fase de paquiteno, dando lugar a la formación de los primeros espermatocitos secundarios, de aspecto muy similar a las espermátidas en estadio I. Las espermátidas en fase XII continúan elongándose y desechando el material citoplasmático restante con la ayuda del manquete. Alrededor del extremo del proceso apical, es posible distinguir un ala dorsal formada por un aplanamiento del acrosoma y una segunda ala ventral compuesta por una porción de la envoltura nuclear rodeada por extensiones del acrosoma.

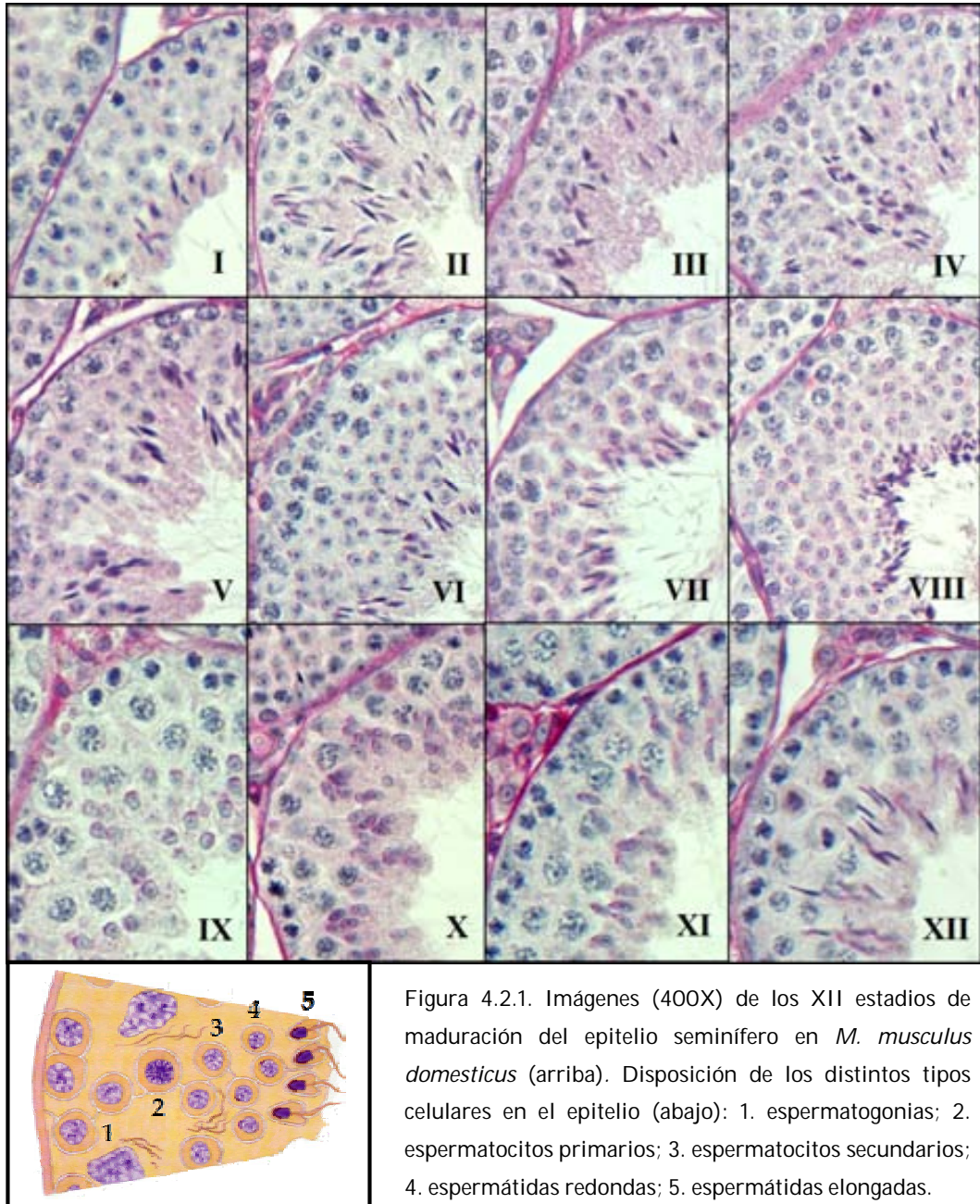
En los análisis se consideraron exclusivamente aquellos túbulos con sección circular y cavidad luminal perceptible. Las diferencias entre pares de muestras se calcularon mediante el estadístico t de Student. Las significaciones obtenidas fueron corregidas según el método de Bonferroni.

Para evaluar la presencia de alteraciones ultraestructurales en el epitelio seminífero, se diseccionó el testículo derecho de 10 animales [5 pertenecientes al grupo 2n = (28-32) y 5 St]. Cada testículo se fijó inmediatamente en una solución de glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 2% y tampón fosfato (PB 0.1 M). Pasadas 2 horas, se realizaron cuatro lavados de 10 min en PB. Las muestras se post-fijaron en tetraóxido de osmio al 1%, ferrocianuro potásico al 0.8% y PB durante 2 horas. Después de cuatro lavados en PB, se deshidrataron en una serie creciente de soluciones de acetona (del 50 al 100%) y se incluyeron en resina Epon a 60° durante 48h. Se realizaron cortes semifinos de 1 µm de espesor y se seleccionaron los túbulos seminíferos en estadio I, VIII y XII para obtener secciones ultrafinas de 70 nm, mediante un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT (Leica Microsistemas, GmbH, Alemania). Los cortes ultrafinos se dispusieron en rejillas de cobre de 200 mesh y se contrastaron con acetato de





uranilo al 2% y solución Reynolds, siguiendo los procedimientos convencionales para microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las muestras se observaron al microscopio electrónico de transmisión (Jeol JEM-1400, 80kV), equipado con una cámara UltraScan Gatan ES1000 CCD.





Con objeto de detectar posibles alteraciones morfológicas en los espermatozoides ya formados, se disgregó el epidídimo caudal izquierdo de cinco animales Rb ( $2n=28-32$ ) en 5 ml de solución PB (0.1 M). Después de homogeneizar cada muestra, se filtró 1 ml de la solución espermática a través de una membrana Nucleopore ( $0.2 \mu\text{m}$ ) y se fijó en glutaraldehído al 2.5%, paraformaldehído al 2% y PB 0.1 M para poder ser observada al microscopio electrónico de barrido (SEM) (véase el apartado de Material y métodos del Capítulo 5). El volumen de solución restante se empleó para realizar observaciones al microscopio óptico. Para ello, se efectuaron dos frotis por muestra que, posteriormente, fueron coloreadas con el *kit* de tinción Hemacolor©.

### 4.3 Resultados

El ensayo TUNEL permitió apreciar diferencias significativas en el grado de muerte celular entre los animales St y Rb. Concretamente, las secciones testiculares Rb presentaron un porcentaje promedio de túbulos apoptóticos significativamente más elevado que en el grupo St ( $P<0.05$  en todos los casos; Tabla 4.3.1). El análisis de las muestras correspondientes a los animales con fusiones Rb mostraron valores de apoptosis notablemente superiores en los individuos con una fusión en heterocigosis (H1: % túbulos  $T_+=11.73$ ,  $P<0.05$  para todos los contrastes). En el resto de secciones correspondientes a individuos Rb las diferencias no fueron significativas, existiendo cierto grado de homogeneidad en el % promedio de túbulos  $T_+$  (Tabla 4.3.1).

La presencia de múltiples translocaciones Rb afectó al número y tipo de células  $T_+$  por túbulo apoptótico (Tabla 4.3.1, Fig. 4.3.1). En relación al primer parámetro, los individuos Rb(33-37) presentaron un número de células  $T_+$  muy similar al de los St (promedio de 6 y 5 células  $T_+$  por túbulo apoptótico, respectivamente). Sin embargo, las secciones correspondientes a los Rb(28-32) mostraron un valor promedio claramente mayor al del resto de grupos, superando las 13 células  $T_+$  por túbulo apoptótico. Un patrón semejante fue



detectado al atender al grado de heterocigosis, observándose un mayor número de células apoptóticas en los animales con múltiples fusiones en homocigosis.

Tabla 4.3.1. Valores (promedio  $\pm$  desviación estándar) de las variables de muerte celular por grupo cromosómico.

Grupo cromosómico	% GCD	% Túbulos T+ (sección)	Células T+ / túbulo T+
<b>2n</b>			
St	26.2 $\pm$ 5.6	4.1 $\pm$ 1.4	5.2 $\pm$ 0.9
Rb(33-37)	41.9 $\pm$ 2.0	8.4 $\pm$ 1.6	6.4 $\pm$ 2.7
Rb(28-32)	38.8 $\pm$ 7.9	7.3 $\pm$ 3.3	13.3 $\pm$ 6.8
<b>Ht</b>			
St	26.2 $\pm$ 5.6	4.1 $\pm$ 1.4	5.2 $\pm$ 0.9
MM	40.2 $\pm$ 3.5	7.5 $\pm$ 1.2	18.8 $\pm$ 6.6
H1	48.0 $\pm$ 4.1	11.7 $\pm$ 0.2	9.3 $\pm$ 1.5
H2	35.6 $\pm$ 8.3	6.5 $\pm$ 3.2	4.7 $\pm$ 1.4
H3	40.3 $\pm$ 3.1	7.2 $\pm$ 2.1	7.1 $\pm$ 2.9

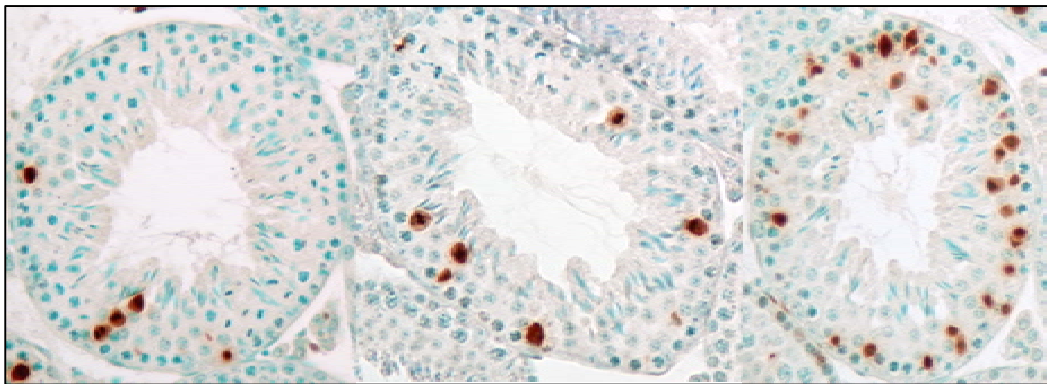


Figura 4.3.1. Túbulos T+ de individuos St (izquierda), Rb(33-37) (centro) y Rb(30-32) (derecha) en los que pueden apreciarse las células apoptóticas (marcadas en pardo). Imágenes capturadas a 400x.

El contraste entre grupos 2n mostró un incremento substancial en el promedio de espermatozoides primarios y de espermátidas T+ por túbulo apoptótico en los individuos del grupo Rb(28-32) (Fig. 4.3.2. a). Sin embargo no se detectaron



diferencias significativas en estos parámetros entre los grupos Rb(33-37) y St. Concretamente, los espermatoцитos primarios en fase de paquiteno fueron los más afectados en los estadios del I al X, tanto en los animales St como Rb (Fig. 4.3.3). Asimismo, en el estadio de maduración XII, se detectó un notable grado de señalización apoptótica en los espermatoцитos primarios en fase de diacinesis y metafase I (Fig. 4.3.4). Este patrón se apreció claramente en las muestras Rb con números diploides más bajos.

En relación al grado de heterocigosis, el promedio de espermatoцитos y espermátidas T+ por túbulo apoptótico fue significativamente superior en los individuos MM, llegando a duplicar los valores obtenidos para los individuos con múltiples fusiones en heterocigosis (Fig. 4.3.2. b).

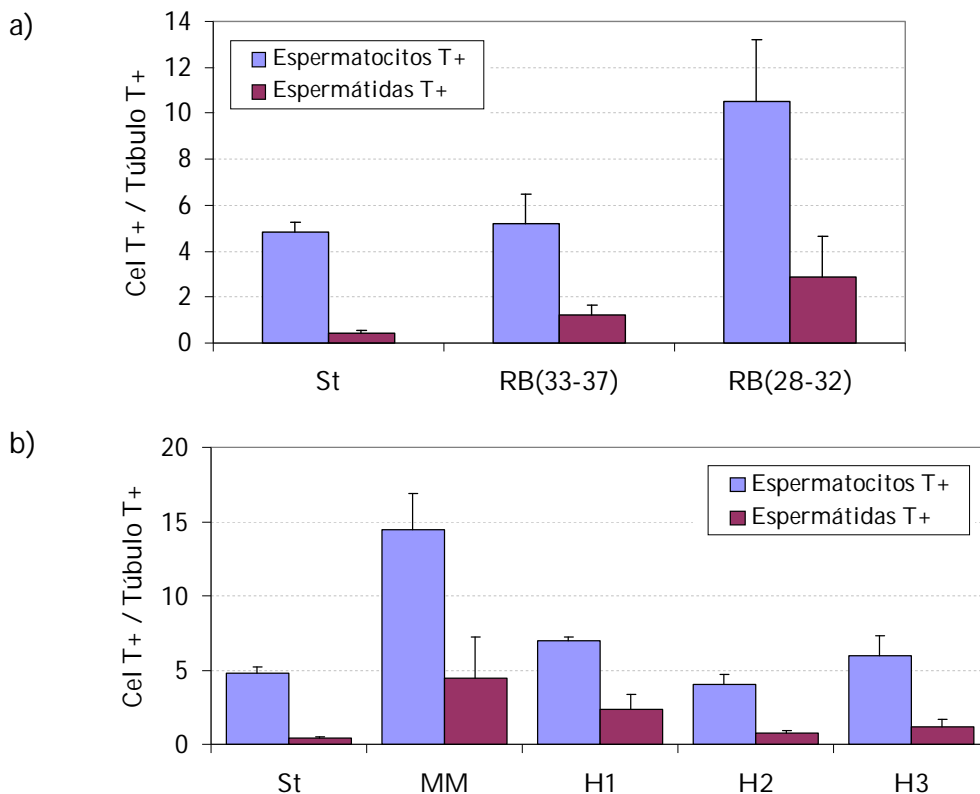


Figura 4.3.2. Valores (promedio y desviación estándar) de espermatoцитos y espermátidas apoptóticas por túbulo apoptótico (T+) en los distintos grupos de número diploide (a) y grado de heterocigosis (b).

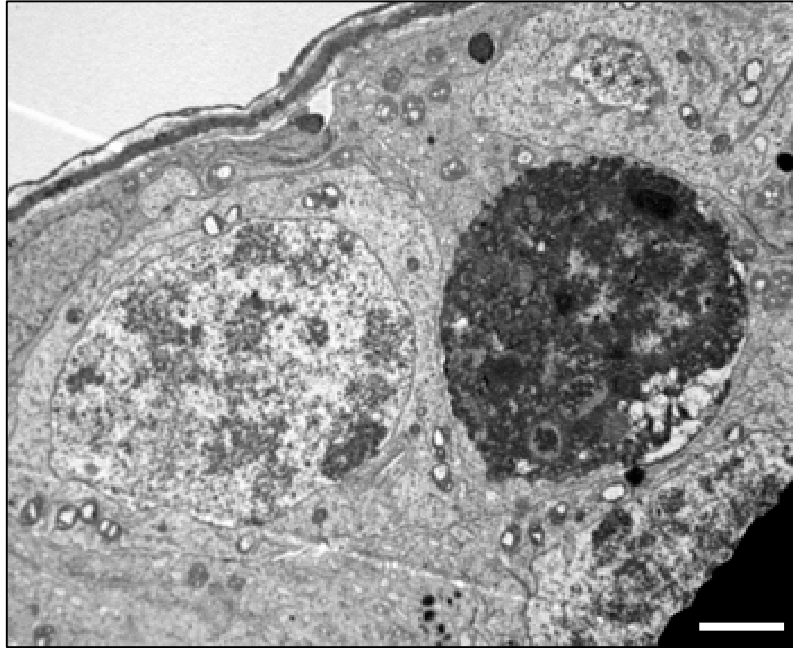


Figura 4.3.3. Micrografía electrónica de un espermatocito apoptótico en fase de paquiteno (parte derecha de la imagen); puede apreciarse su aspecto electrodenso y contraído. Barra de escala = 2  $\mu$ m.

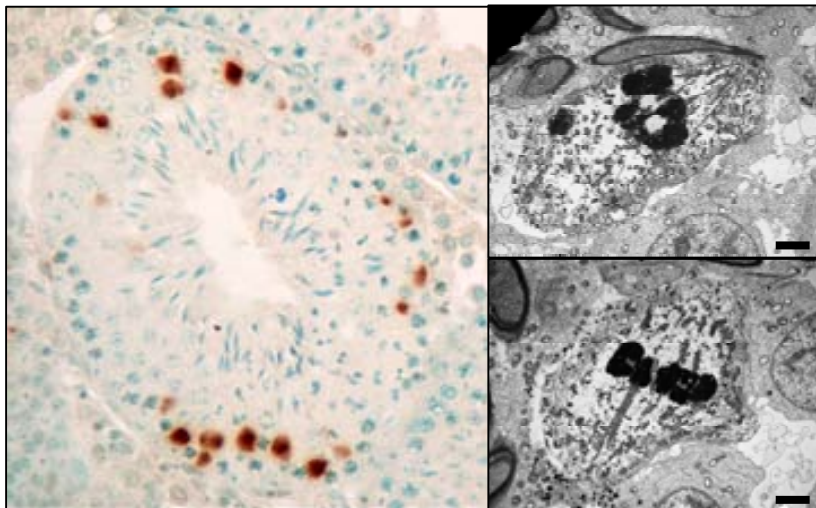


Figura 4.3.4. Imagen de un túbulo seminífero T+ en estadio de maduración XII tomada a 400x (izquierda). En color pardo puede apreciarse la señalización TUNEL+ de los espermatocitos en metafase I. Detalle de espermatocitos en metafase I en proceso de degeneración (derecha). Barra de escala = 2  $\mu$ m.



La variación del índice GCD mostró un patrón semejante al observado mediante la técnica TUNEL, corroborando las diferencias detectadas entre animales St y Rb, así como entre los grupos H1 y H2, H3 y MM (Tabla 4.3.1). La ratio espermatocono-espermátida (SP/SR) en los individuos St se aproximó a 1:3, resultado que no se apartó substancialmente del valor esperado. Sin embargo, los animales Rb presentaron ratios ligeramente menores, alcanzando en ciertos casos valores inferiores a 1:2 (Fig. 4.3.5).

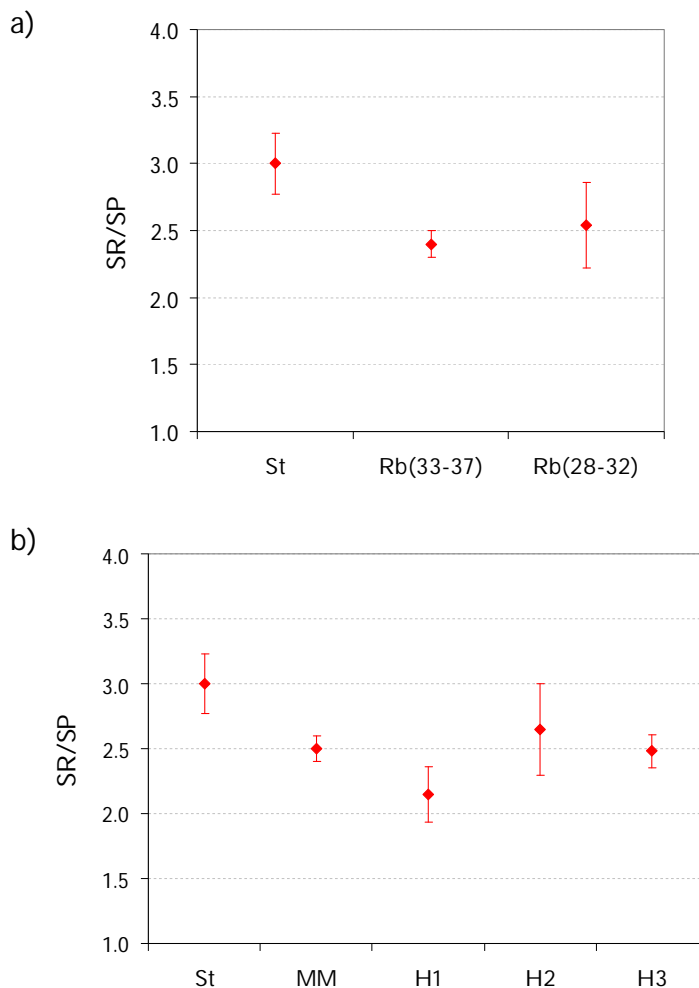


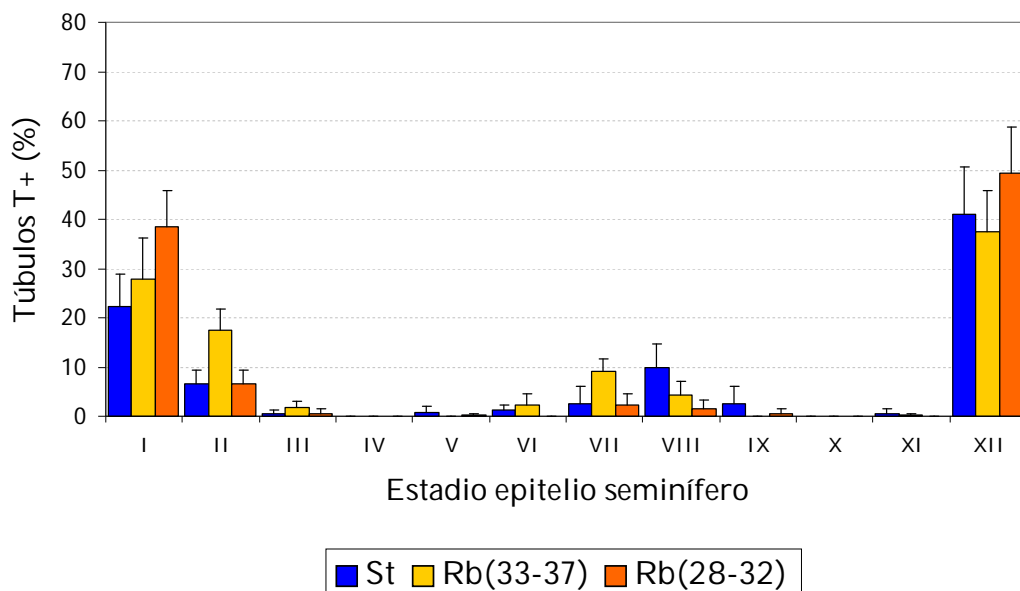
Figura 4.3.5. Valores (promedio  $\pm$  desviación estándar) de la ratio de espermátidas redondas (SR) por espermatocono (SP), según el número diploide (a) y el grado de heterocigosis (b).



Si bien los estadios de maduración espermática más susceptibles a sufrir apoptosis fueron el I y el XII, en todas las secciones examinadas, se detectaron ligeras variaciones de los porcentajes de incidencia apoptótica entre grupos cromosómicos (Fig. 4.3.6). Concretamente, se encontraron diferencias significativas en las fases de maduración I y VIII entre los individuos St y Rb(28-32) ( $P=0.016$  y  $P=0.027$ , respectivamente), y en los estadios II y VII entre el grupo Rb(33-37) y el Rb(28-32) ( $P=0.049$  y  $P=0.019$ , respectivamente), así como entre los grupos Rb(33-37) y St ( $P=0.050$  y  $P=0.047$ , respectivamente) (Fig. 4.3.6. a).

El porcentaje de túbulos T+ en función del grado de Ht, presentó un patrón similar al de 2n. Así, se detectaron diferencias significativas entre los grupos St y MM en los estadios I y VIII ( $P=0.028$  y  $P=0.022$ , respectivamente), y H1 respecto a H2 y H3 en el estadio VII ( $P=0.034$  y  $P=0.025$ , respectivamente) (Fig. 4.3.6. b).

a)



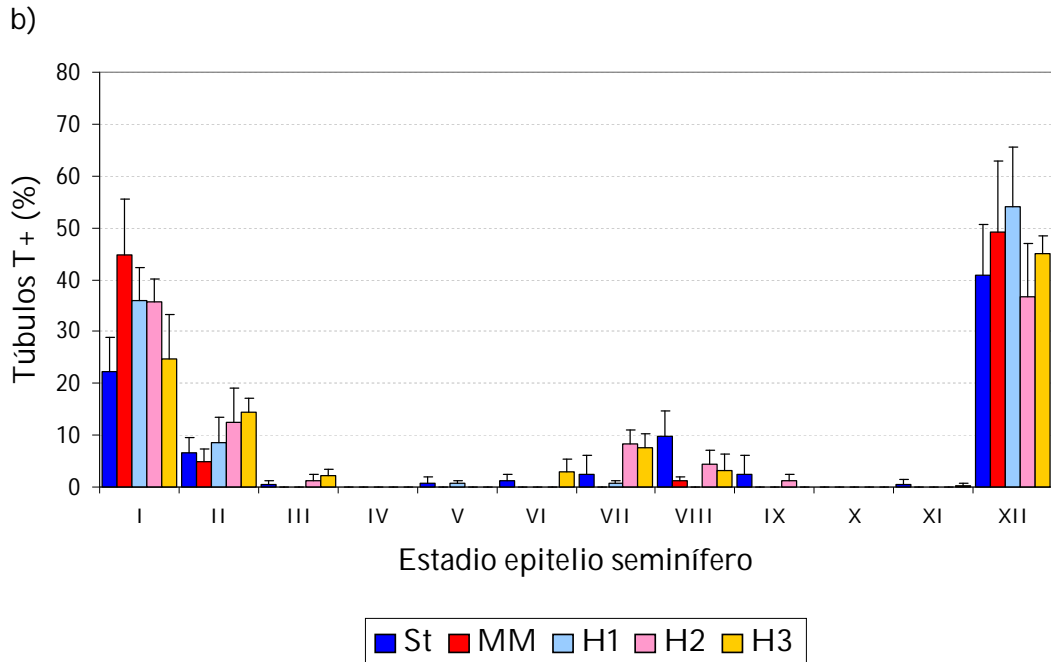


Figura 4.3.6. Variación del porcentaje de túbulos apoptóticos (T+) según el estadio de maduración, atendiendo a los grupos de número diploide (a) y grado de heterocigosis (b).

En los estadios I, II y VII, el grado de muerte celular fue mayor en los grupos con translocaciones Rb que en el St. Sin embargo, en el estadio VIII se detectó una reducción significativa del número de túbulos apoptóticos en la muestra Rb. El estudio detallado de dicho estadio mediante TEM en los animales Rb con números diploides inferiores, reveló la presencia de alteraciones morfológicas ultraestructurales en las espermatidas redondas. Concretamente, se observaron invaginaciones de la membrana nuclear en regiones contiguas a la vesícula acrosómica, la pérdida del contorno nuclear ovoide, característico de dicho estadio de maduración, y asimetrías en el grado de desarrollo de la vesícula acrosómica (Fig. 4.3.7).



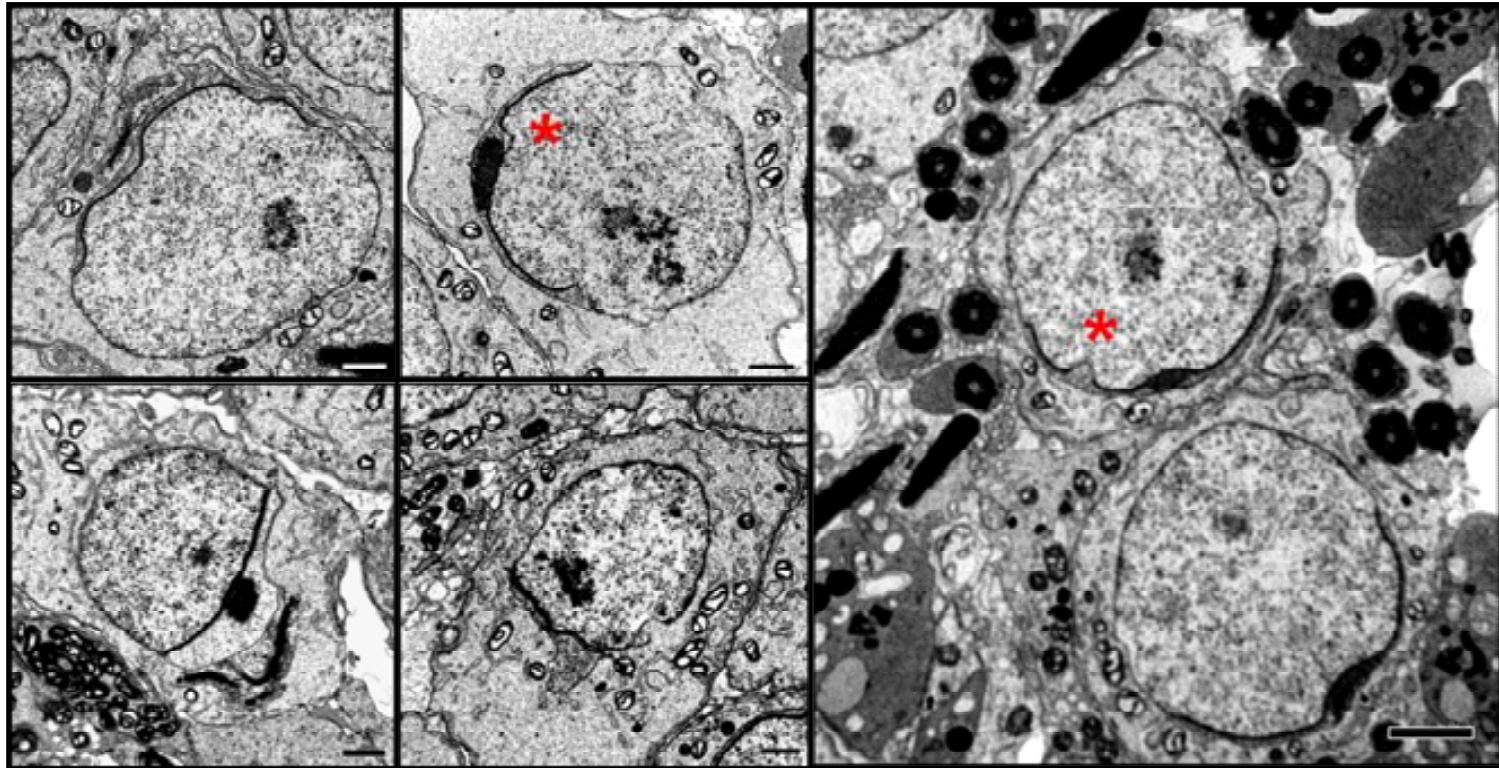
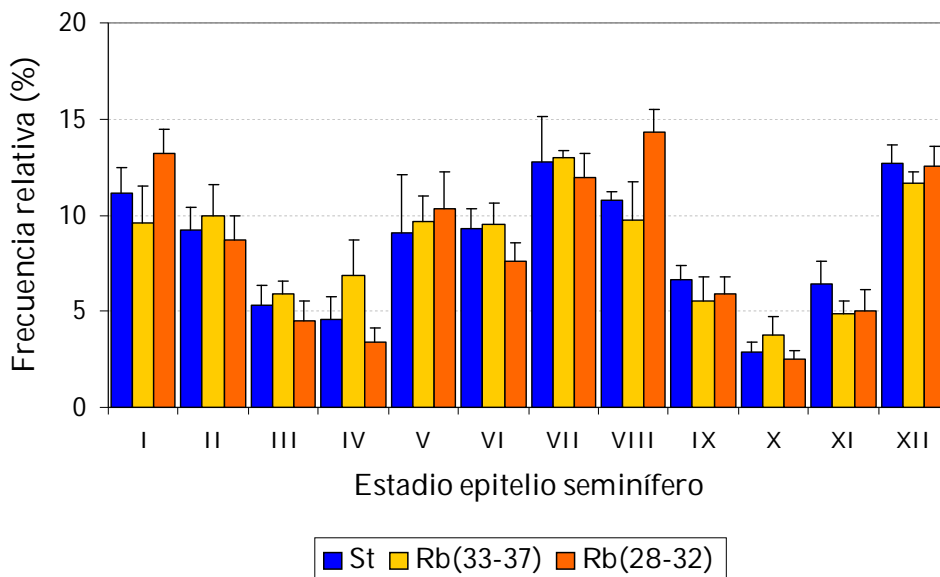


Figura 4.3.7. Alteraciones morfológicas en espermatidas redondas en estadio VIII procedentes de individuos Rb  $2n=28$  con todas las fusiones en homocigosis. Puede apreciarse la presencia de invaginaciones (\*) y morfologías nucleares anómalas, así como el desarrollo asimétrico de la vesícula acrosómica. Barra = 2  $\mu$ m.



El análisis de la frecuencia de los doce estadios del epitelio seminífero en el global de las secciones histológicas reveló una notable similitud entre el patrón hallado en animales St y Rb. Los estadios más frecuentes fueron el I, VII, VIII y XII en todos los grupos cromosómicos (Fig. 4.3.8). No obstante, se detectaron variaciones puntuales en los valores obtenidos para la muestra Rb. En las secciones correspondientes a los animales Rb(28-32) se apreció un aumento significativo del porcentaje global de los estadios I y VIII respecto al grupo St ( $P=0.0416$  y  $P=0.018$ , respectivamente) y Rb(33-37) ( $P=0.0311$  y  $P=0.030$ , respectivamente). Los individuos Rb(33-37) mostraron una fase de maduración IV larga, superando la frecuencia hallada para el grupo Rb(28-32) ( $P=0.0194$ ) (Fig. 4.3.8. a). Resultados similares se obtuvieron en los análisis según el grado de heterocigosis, apreciándose una mayor duración de las fases IV y VIII para los H2 y MM, respectivamente (Fig. 4.3.8. b).

a)



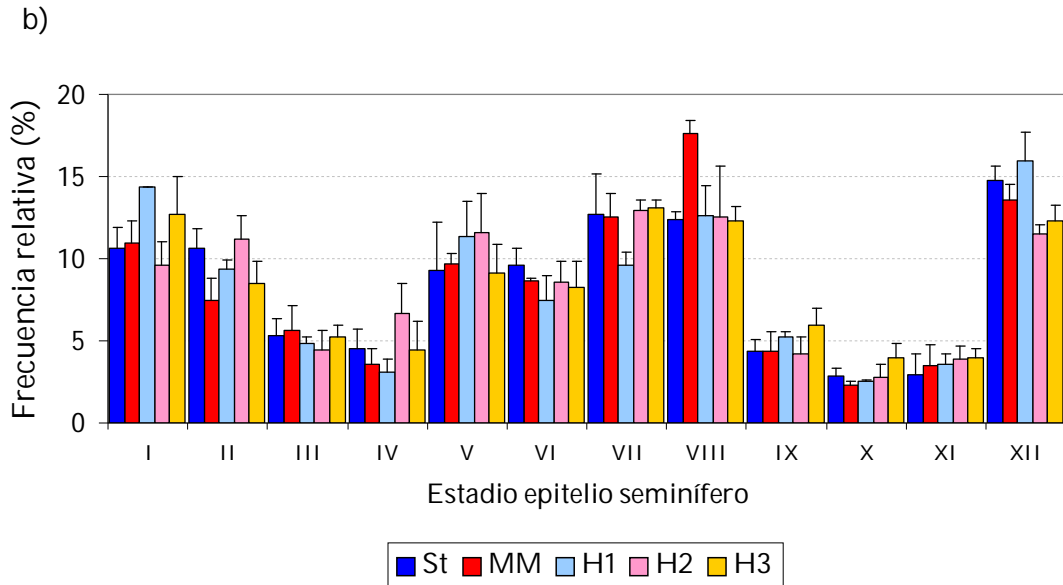
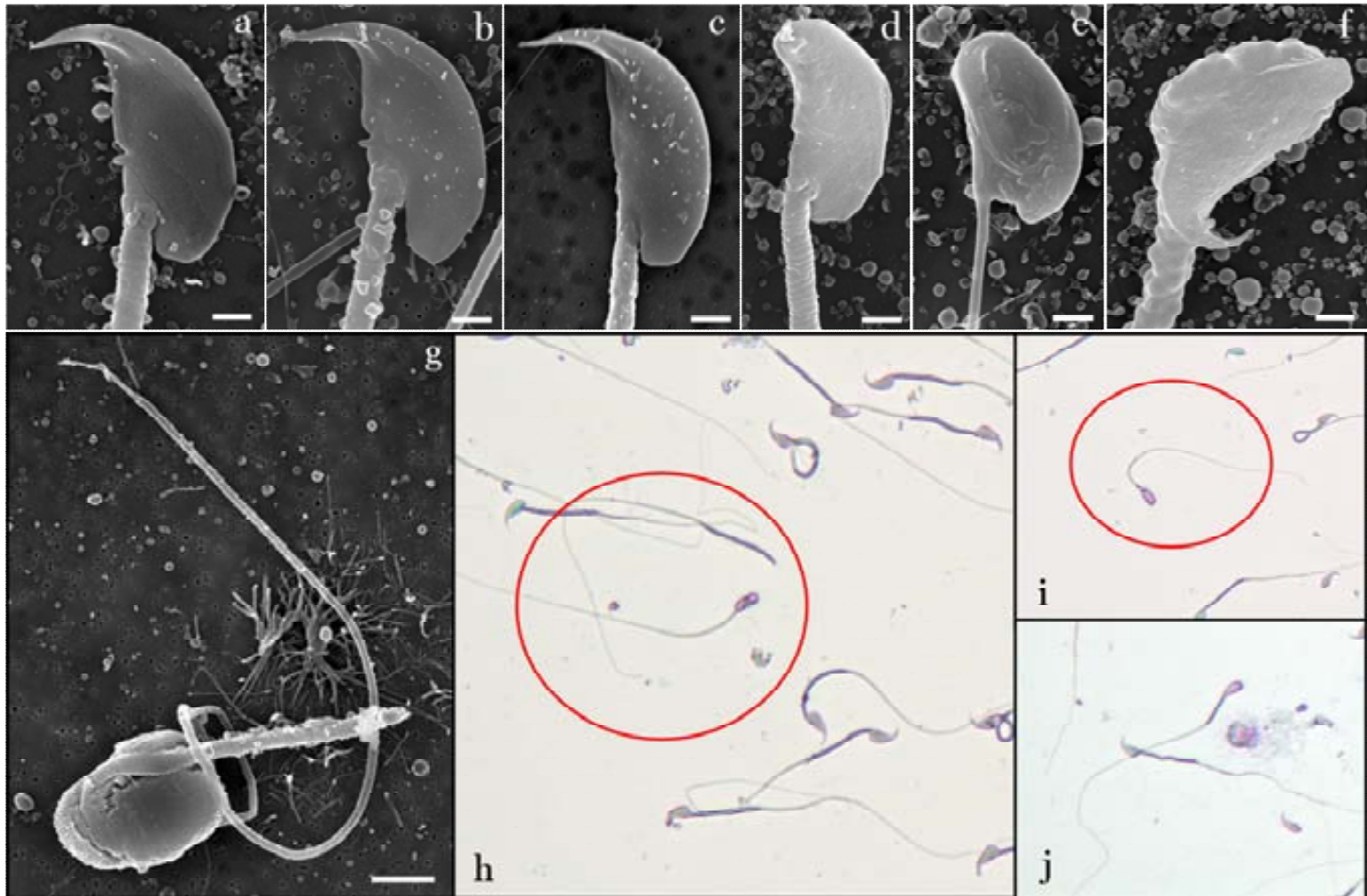


Figura 4.3.8. Variación de la frecuencia de los estadios de maduración estimados por sección histológica, en los grupos de número diploide (a) y grado de heterocigosis (b).

La observación de las muestras epididimales permitió detectar diversos tipos de alteraciones morfológicas en los espermatozoides Rb (Fig. 4.3.9). Éstas se apreciaron principalmente en la región de la cabeza del gameto, plasmándose especialmente en la ausencia del típico aspecto falciforme debido a la adhesión de la cabeza al flagelo o a la reducción del proceso apical (Fig. 4.3.9. d-j). En algunos casos también se observaron otras irregularidades, como la presencia de bifurcaciones en la región del flagelo (Fig. 4.3.9. n, p) o la existencia de dobles cabezas (Fig. 4.3.9. k-m). Dada la gran resolución ofrecida por el SEM, fue posible detectar también alteraciones adicionales en regiones específicas de la cabeza del espermatozoide, como la reducción de las crestas ventrales (Fig. 4.3.9. c), estructuras apenas apreciables mediante microscopía óptica o la prolongación exagerada de la región postacrosómica (Fig. 4.3.9. b).



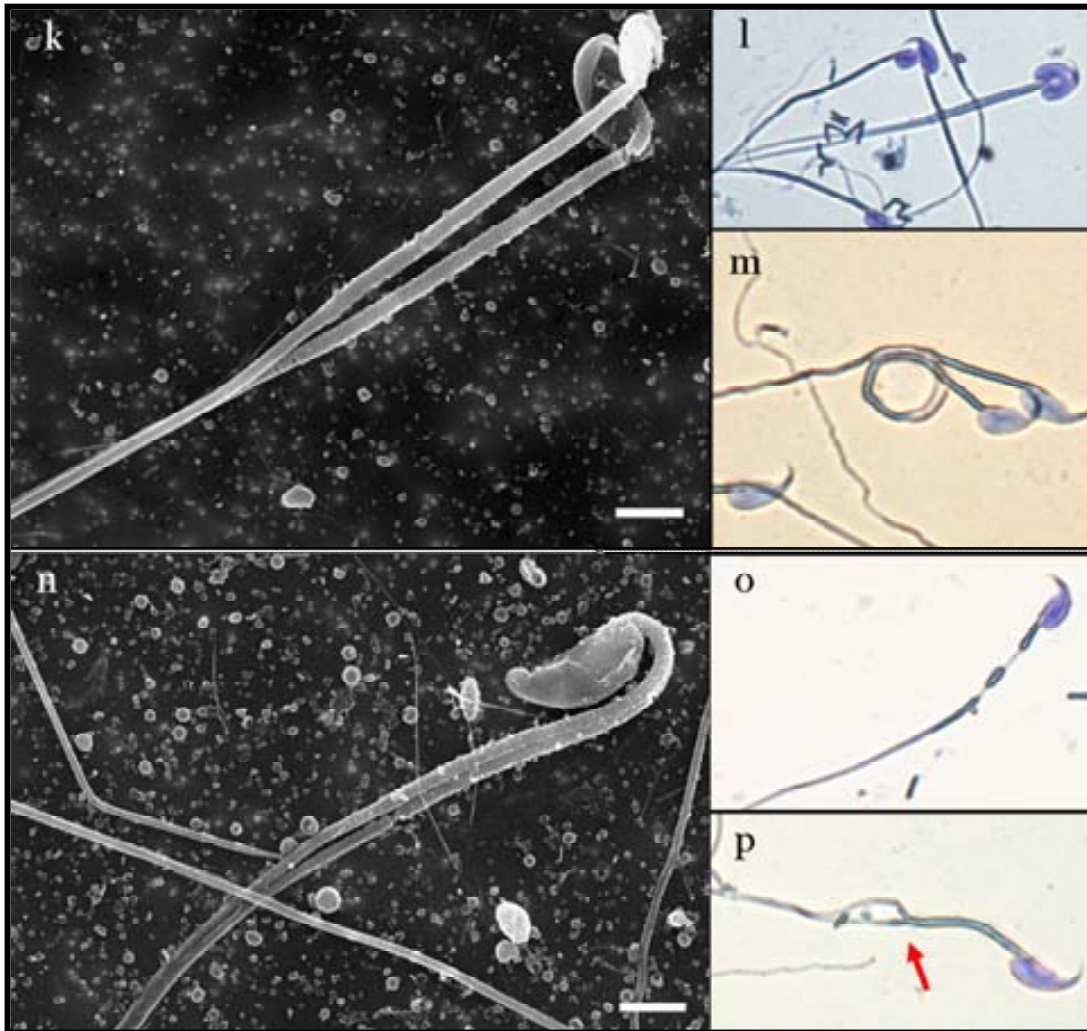


Figura 4.3.9. Alteraciones morfológicas en espermatozoides Rb(30-32). a: cabeza sin alteraciones. b-j: cabezas con irregularidades (b. prolongación de la región postacrosómica; c. desaparición de las crestas ventrales; d-j. adquisición de morfologías ovoides por reducción del proceso apical o por la torsión de la cabeza). k-m: formación de dobles cabezas. n-p: irregularidades en el flagelo (n, p. bifurcaciones en el flagelo; o. heterogeneidad en la pieza media del flagelo).

*Micrografías electrónicas* (barras de escala: a-f= 1 $\mu$ m; g, 2 $\mu$ m; k, n: 3 $\mu$ m). *Micrografías ópticas* (h-j: 100x; l, m, o, p: 400x).



#### 4.4. Discusión

Los resultados obtenidos referentes a la ratio entre espermatidas redondas y espermatocitos en paquiteno, y la cuantificación de apoptosis mediante el ensayo TUNEL indican que el grado de muerte de células germinales en los machos del SRbB es significativamente superior en los animales con fusiones Rb que en los que presentan el cariotipo estándar. Esto sugiere, en principio, que las translocaciones Rb pueden ser responsables de una disminución del potencial reproductivo de los machos, actuando de esta forma como un factor involucrado en la disminución del flujo génico dentro del SRbB. No obstante, si se atiende a la variación de dichos parámetros en función del número diploide y del grado de heterocigosis, puede observarse una gran variabilidad dentro del componente Rb del sistema. Si bien en la mayoría de estudios en zonas híbridas de ratón doméstico se ha apreciado en los machos una correlación positiva entre el grado de muerte de células germinales y el número de fusiones en heterocigosis (Dumas y Britton-Davidian, 2002; Castiglia y Capanna, 2002; Merico y col., 2003, 2008; Manterola y col., 2009), en algunos sistemas Rb, como el de Túnez (Saïd y col., 1993), se ha observado que la composición estructural del cariotipo está escasamente relacionada con el grado de fertilidad. Este resultado ha permitido sugerir que la presencia de un cierto grado de diferenciación genética entre razas parentales puede comportar la aparición de incompatibilidades genéticas en los híbridos (Cattanach y Moseley, 1973; Winking y col., 1988; Coyne y Orr, 2004), ocasionando perturbaciones en la espermatogénesis y, por tanto, desencadenando la activación del proceso apoptótico independientemente de la presencia de fusiones en heterocigosis (Saïd y col., 1993; Oka y col., 2002; Ortíz-Barrientos y col., 2002; White y col., 2012).

En el presente estudio si bien, por un lado, se han obtenido unas estimas de muerte celular germinal en los animales St y H3 semejantes a las indicadas por Sans-Fuentes y col. (2010) para esta misma zona de polimorfismo cromosómico, por el otro, se ha detectado, por término medio, un mayor grado



de muerte celular en los individuos MM y H1 que presentaban un número diploide reducido; para algunas variables indicativas de muerte celular los valores obtenidos para estos ejemplares fueron incluso superiores a los correspondientes a los animales con mayor número de fusiones en heterocigosis. Puesto que el SRbB presenta una elevada heterogeneidad cariotípica y fragmentación poblacional (véase Capítulo 3), no resulta extraño que algunos de los resultados aquí obtenidos no sean coincidentes con los indicados por Sans-Fuentes y col. (2010) ya que muchas de las muestras analizadas en ambos estudios fueron obtenidas en localidades y épocas diferentes. A su vez, cabe tener en cuenta que, según se ha demostrado en la presente tesis (véase Capítulo 3), a lo largo de la última década se han producido variaciones significativas en las frecuencias genotípicas de los híbridos y en el grado de subdivisión genética poblacional. Este escenario puede haber propiciado la aparición de diferencias genéticas entre híbridos, comportando cambios en los patrones de recombinación de los metacéntricos (Rieseberg, 2001; Bidau y col., 2001; Dumas y Britton-Davidian, 2002) y alteraciones de las tasas de muerte germinal registradas con anterioridad. Puesto que muchos genes reguladores de la espermatogénesis se hallan en cromosomas implicados en la formación de algunas de las translocaciones identificadas en la zona de estudio (Baker y col., 1995, 1996; Bitgood y col., 1996; Dix y col., 1996; Keegan y col., 1996; Roest y col., 1996; Xu y col., 1996; Zao y col., 1996; Ruggiu y col., 1997; Cooke y col., 1998, White y col., 2012), es razonable pensar que el grado de muerte celular de cada individuo dependerá de la medida en que los cambios en la recombinación afecten a dichos genes, así como del número de diferencias génicas heredadas de los individuos parentales. Bajo estas circunstancias, el efecto aditivo de las translocaciones podría ser importante (Rieseberg, 2001; Castiglia y Capanna, 2002; Dumas y Britton-Davidian, 2002; Wallace y col., 2002), promoviendo el incremento en la tasa de muerte germinal por acumulación de incompatibilidades genéticas en aquellos animales con mayor número de fusiones.



Los ratones domésticos del SRbB presentan un elevado grado de señalización apoptótica en espermatoцитos en fase de paquiteno y de metafase I, resultado que concuerda con otras observaciones efectuadas en animales Rb (Eaker y col., 2001; Merico y col., 2003, 2008; Manterola y col., 2009). No obstante, valga precisar que, en la zona de estudio, esta pauta fue más acentuada en los individuos con un  $2n=28$  y con todas las fusiones en homocigosis. Según se ha indicado en diversos estudios (Merico y col., 2003, 2008; Manterola y col., 2009), las fases de paquiteno y metafase I actúan como puntos de control en el proceso de maduración espermática, activando la vía apoptótica ante la detección de irregularidades durante los procesos de recombinación genética y segregación meiótica, respectivamente. Aunque es frecuente el vínculo entre el aumento de la tasa apoptótica en estos tipos celulares y la presencia de configuraciones trivalentes (Francavila y col., 2002; Vera y col., 2004; Merico y col., 2008; Manterola y col., 2009), se ha sugerido que la activación del programa de muerte celular podría darse independientemente de la presencia de metacéntricos heterocigotos, habiéndose propuesto como posibles factores implicados: i) la respuesta al déficit de productos génicos involucrados en la recombinación homóloga durante las primeras etapas meióticas (Venables y Cooke, 2000; Eaker y col., 2001; Manterola y col., 2009); ii) la inactivación de genes cruciales para la progresión meiótica presentes en los cromosomas sexuales (Turner y col., 2005; Mahadevaiah y col., 2008; Manterola y col., 2009; Pinton y col., 2009; Vernet y col., 2011); o iii) la presencia de conexiones defectuosas entre metacéntricos y microtúbulos, debida a la expresión errónea de proteínas responsables de la unión de dichas estructuras (Dumas y Britton-Davidian, 2002; Yin y col., 2008; Oka y col., 2010). Tomando en consideración estas observaciones, y en vista de la notable incidencia apoptótica detectada en los ejemplares homocigotos del SRbB, no cabe descartar la posibilidad de la existencia en este sistema de ciertas alteraciones durante las distintas fases meióticas que, aunque no comportarían la aparición de trivalentes, serían el resultado de la acumulación de variaciones genéticas en los híbridos con un mayor número de translocaciones. En lo referente a la duración relativa de los





doce estadios del epitelio seminífero, los animales St mostraron un patrón de sucesión celular similar al hallado en otras cepas de ratón (Clermont y Trott, 1969, Sans-Fuentes y col., 2010), circunstancia indicativa de la normalidad del proceso de producción de gametos. Contrariamente, este proceso presentó una pauta variable dentro del conjunto de animales Rb. En concreto, en los individuos del grupo Rb(28-32) se apreció cierto retraso en el estadio I y un elevado porcentaje de túbulos apoptóticos en esta fase de maduración. Según Oackberg (1956), el estadio I representa un punto crítico en la gametogénesis puesto que en él se inicia la formación de los nódulos de recombinación en los espermatoцитos en paquiteno. De este modo, una prolongación de esta fase asociada a una elevada tasa de muerte germinal podría indicar la existencia de anomalías en el proceso de unión entre cromosomas homólogos. Esta circunstancia sería concordante con la presencia de alteraciones en el proceso de recombinación meiótica en ausencia de múltiples configuraciones trivalentes. Los ejemplares del grupo Rb(28-32) mostraron, asimismo, un retraso significativo en el estadio VIII, si bien el número de túbulos y células apoptóticas detectados en esta fase fue sensiblemente menor. Las observaciones realizadas en el epitelio seminífero, así como en espermatozoides epididimales, revelaron la presencia de irregularidades ultraestructurales en espermátidas redondas en el estadio VIII y un importante número de alteraciones morfológicas en los gametos de los individuos con un número diploide bajo. De hecho, investigaciones preliminares nos han permitido detectar la existencia de multitud de alteraciones morfológicas en el espermatozoide y una disminución de la vitalidad y motilidad de estas células en los ratones del grupo Rb(28-32) (datos inéditos en Corts, 2012), resultados que indican una disminución significativa de la calidad espermática en estos individuos. Estas observaciones sugieren que cierto número de células germinales, potencialmente apoptóticas, no son eliminadas del epitelio seminífero y que, por tanto, prosiguen con su proceso de citodiferenciación, dando lugar a espermatozoides anómalos. Consecuentemente, no se descarta que la actuación de procesos de rescate apoptótico por parte de células adyacentes (Redi y Capanna, 1978; Redi y



Garagna, 1985) o la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, como la CB (Merico y col., 2008) o la CIB1 (Yuan y col., 2006), puedan evitar la inducción de las vías apoptóticas en dichos animales. Futuras investigaciones deberán determinar el papel que juegan estos mecanismos de rescate apoptótico en el proceso de maduración espermática.

Por lo que respecta a los individuos Rb(33-37), la duración de sus estadios de maduración fueron semejantes a los observados en los animales del grupo St. No obstante, se detectó cierta prolongación del estadio IV y unas tasas de muerte celular significativamente superiores al resto de grupos en las etapas II y VII. Estos resultados sugieren que la presencia de metacéntricos en heterocigosis podría modificar el patrón de citodiferenciación de las células germinales, comportando, en consecuencia, anomalías en la espermatogénesis en múltiples estadios del epitelio seminífero. Puesto que la presencia de configuraciones trivalentes puede originar un retraso en la sinapsis de los metacéntricos con sus homólogos telocéntricos (Wallace y col., 2002), la desregulación de la actividad enzimática (Hotta y Chandley, 1982; Redi y col., 1983) o la aparición de diferencias cualitativas en los patrones de síntesis proteica (Forejt, 1982), es posible detectar un amplio rango de alteraciones en la espermatogénesis en los híbridos heterocigotos. No obstante, se ha demostrado (Britton-Davidian y col., 1990, Wallace y col., 1992, Hauffe y Searle, 1998, Wallace y col., 2002) que la magnitud de los efectos ocasionados por las fusiones puede variar en relación a: i) la naturaleza de las mutaciones; ii) el tamaño y la simetría de los metacéntricos y, consecuentemente, el número y posición de los quiasmas en los trivalentes; iii) el grado de exposición de los heterocigotos Rb a la selección natural; y/o iv) la presencia de incompatibilidades genéticas.

El conjunto de resultados expuestos en este capítulo de la tesis demuestra que, si bien la detección de irregularidades durante el proceso espermatogénico varía en relación a la combinación de translocaciones Rb, no se aprecia una asociación clara entre estas alteraciones y el número de fusiones en



---

heterocigosis. Consecuentemente cabe considerar que en el SRbB la acumulación de incompatibilidades genéticas en individuos con numerosas translocaciones constituye, probablemente junto con la disminución en las tasas de recombinación genética, uno de los factores clave en el establecimiento de barreras al flujo génico dentro de esta zona de polimorfismo cromosómico. No obstante, debe tenerse en cuenta que puesto que los análisis se han efectuado a partir de animales salvajes, sometidos a la acción de la selección natural, las alteraciones espermatogénicas observadas no van asociadas estrictamente a la esterilidad de los individuos. De hecho, en ninguno de los casos estudiados se ha estimado más de un 50% de GCD, valor que permite considerar que los machos Rb no presentan una disminución significativa del proceso de generación de gametos.



# Anexo 1





De los 23 individuos indicados en el en el Capítulo 4, dos fueron excluidos de los análisis correspondientes debido a la presencia de parásitos (véase Apéndice 2). En ambos animales se hallaron larvas de cestodos en el tejido hepático (Fig. 1) y uno de ellos presentó una infección de microsporidios en el tejido testicular (Fig. 2 y Fig. 3. a-c). Los porcentajes de muerte celular hallados en ambos ejemplares fueron relevantemente altos (superiores al 80%). También se observaron pocos espermatozoides en el epidídimo (Fig. 3. g), la presencia de espermátidas redondas en forma de media luna (Fig. 3. f) y/o el desarrollo asincrónico de vesículas acrosómicas (Fig. 3. e).



Figura 1. Quiste hidiatídico extraído del tejido hepático de *M. musculus domesticus* y larva de cestodo contenida en el interior del quiste.

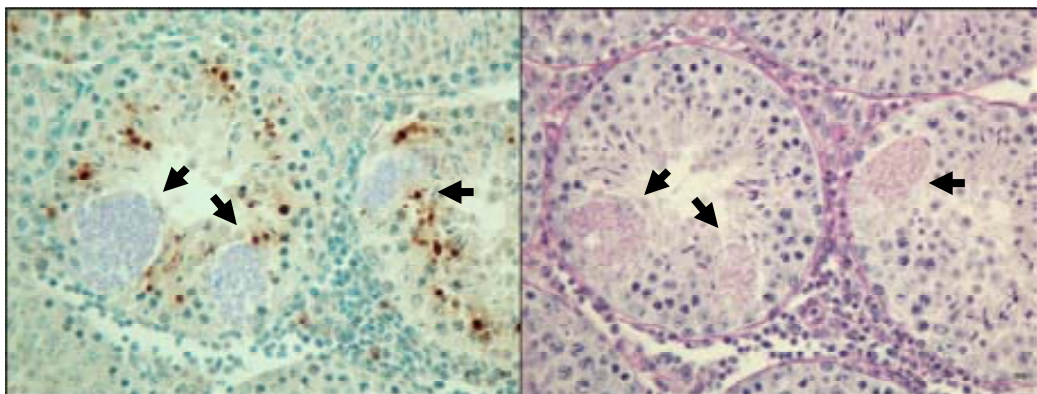


Figura 2. Cápsulas de microsporidios en los túbulos seminíferos de *M. musculus domesticus*. Puede observarse las esporas tras la contracoloración con verde de metilo (izquierda) y tinción P.A.S (derecha) (►). Imágenes capturadas a 400x.

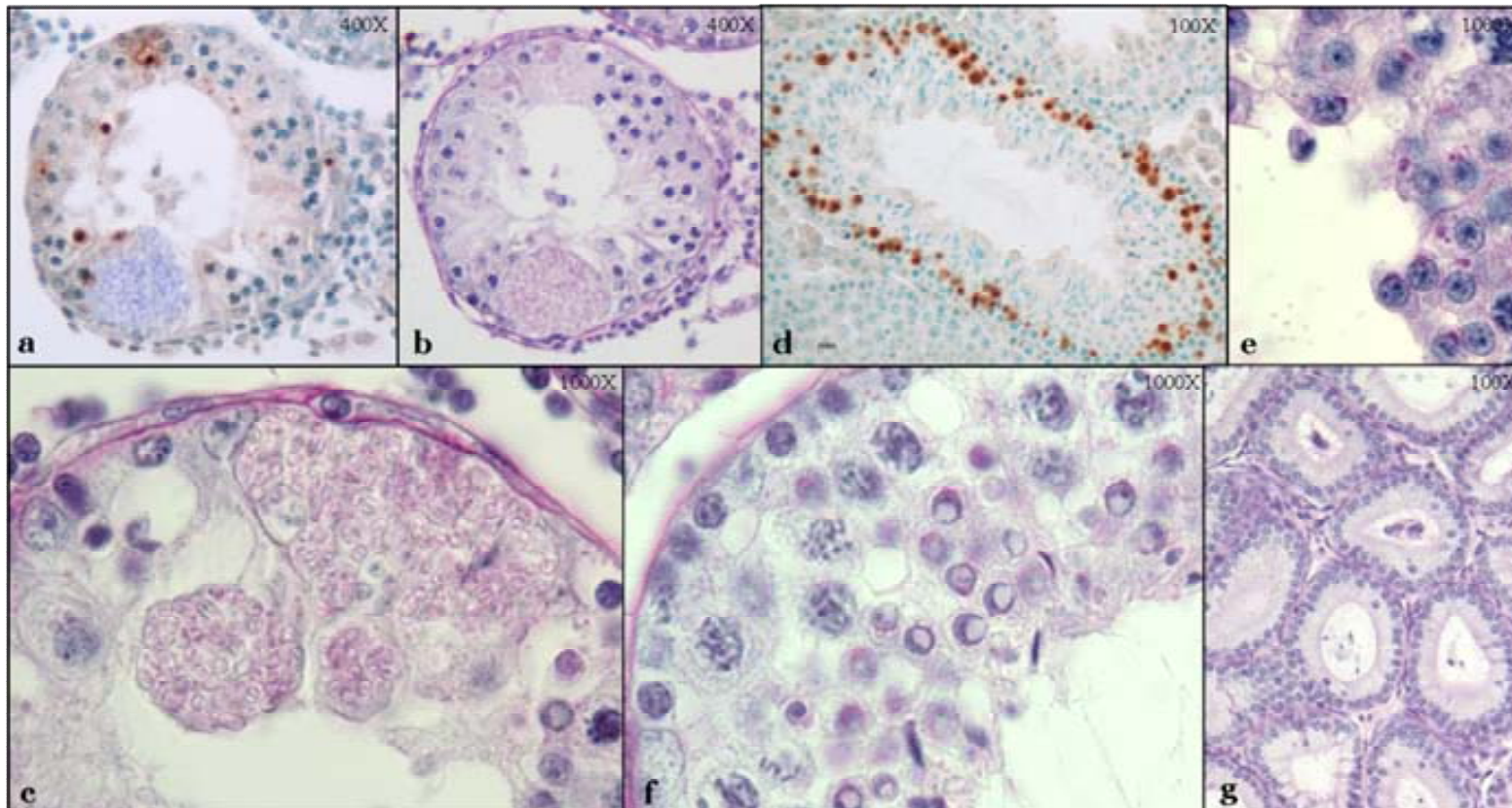


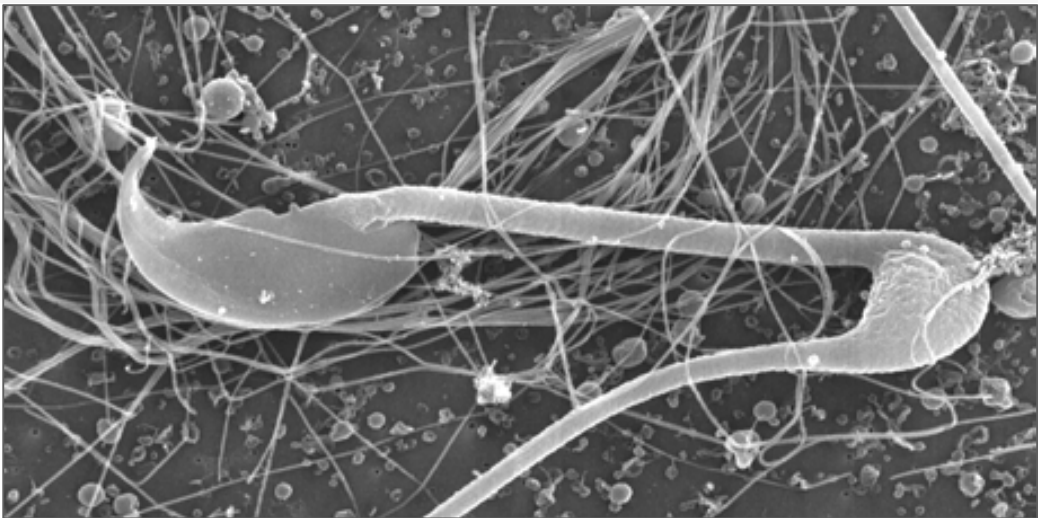
Figura 3. Esporas de microsporidios en túbulos seminíferos (a-c). Señalización TUNEL+ en los túbulos seminíferos (d). Asincronías en el desarrollo de la vesícula acrosómica (e). Irregularidades morfológicas en las espermatidas redondas (f). Ausencia de espermatozoides en el epidídimo (g).



Es habitual que en los trabajos realizados en las zonas híbridas se estimen parámetros relacionados con el grado de fertilidad, mortalidad o estabilidad del desarrollo en los híbridos como medida del grado de aislamiento entre poblaciones (Blows, 1993, Harrison, 1993; Alibert y col., 1997). No obstante, algunas investigaciones recientes señalan que otros factores, como la presencia de parásitos, puede también repercutir sobre la aptitud biológica de los híbridos (Mouliá, 1999; Derothe y col., 1999, 2001; Sak y col., 2011), limitando el flujo génico entre los taxones parentales (Sage y col., 1986; Mouliá y col., 1991, 1993; Derothe y col., 1999, 2001). Concretamente, en zonas de contacto entre *M. musculus domesticus* y *M. musculus musculus* se ha detectado una mayor incidencia de parásitos en los híbridos, debido a la presencia de diferencias genéticas en los procesos de co-adaptación genética de los sistemas de control de la carga parasitaria entre ambas subespecies (Mouliá y col., 1993). Algunos autores sugieren que la recombinación génica de los genomas híbridos puede haber ocasionado la rotura de las asociaciones funcionales existentes entre parásito y huésped, alterando la susceptibilidad de los híbridos a ser infectados y estableciendo, en consecuencia, un cierto grado de determinismo genético en la propensión de los híbridos a ser infectados por ciertos parásitos (Alibert y col., 1997; Sak y col., 2011). No obstante, ninguno de estos aspectos ha sido analizado en los sistemas Rb de *M. musculus domesticus*.



## Capítulo 5.



**Variación morfológica de la  
cabeza del espermatozoide**

---

---





## 5.1. Introducción

En mamíferos, la cabeza del espermatozoide es una estructura compleja y especializada en la que su forma y composición citoesquelética se hallan estrechamente ligadas al sistema de fecundación del óvulo (Roldán y col., 1992; Malo y col., 2006). Esta parte del espermatozoide está constituida por tres elementos principales: el núcleo, portador de material genético; el acrosoma, responsable de la penetración a través de los revestimientos del óvulo; y una vaina citoesquelética circundante al núcleo, que proporciona la estabilidad de las membranas del gameto durante la fertilización.

Si bien la mayoría de euterios presentan espermatozoides con cabezas ovoides, un acrosoma apical y una vaina citoesquelética en la región basal, en ciertos grupos de mamíferos la cabeza del espermatozoide puede adquirir una mayor complejidad (Roldán y col., 1992). Concretamente, en la mayor parte de representantes de la subfamilia Murinae, (incluyendo el ratón doméstico, *M. musculus domesticus*), la cabeza del espermatozoide está notoriamente comprimida y presenta un único proceso apical en forma de gancho (Friend, 1936). El núcleo, que ocupa la mayor parte de la cabeza, penetra parcialmente en dicho proceso, adoptando un aspecto falciforme (Lee y Möri, 2006; Avella y Dean, 2011). La zona acrosómica, que se extiende desde el borde convexo de la cabeza hasta el extremo del proceso apical, está compuesta por la región acrosómica anterior (AA) y el segmento ecuatorial (ES) (Fig. 5.1.1). La primera es rica en enzimas hidrolíticas, liberadas durante la reacción acrosómica (Austin y Bishop, 1958; Bedford, 1998; Breed y col., 2000). El segmento ecuatorial forma un dominio de proteínas citoesqueléticas implicadas en el reconocimiento y unión del espermatozoide al oocito (Bedford, 1998; Lee y Möri, 2006). Entre el núcleo y el acrosoma se encuentra una región citoesquelética heterogénea, la teca perinuclear (Lalli y Clermont, 1981), cuya composición proteica varía a lo largo de la cabeza del espermatozoide y en la que se distinguen las siguientes partes (Fig. 5.1.1): i) el perforatorio (P), estructura citoesquelética situada en el extremo del proceso apical y compuesta



principalmente por proteínas perforatorias FABP9/PERF15 (Austin y Bishop, 1958; Oko y Clermont, 1988; Bedford, 1998; Breed y col., 2000); ii) dos crestas ventrales (VS), extensiones rígidas de composición similar al perforatorio localizadas entre el punto de inserción flagelar y el proceso apical, que están implicadas en la penetración mecánica a través de la zona pelúcida (Oko y Clermont, 1988); y iii) la lámina post-acrosómica (PAS), revestimiento de citoesqueleto que se expande posteriormente al acrosoma (Korley y col., 1997; Breed y col., 2000).

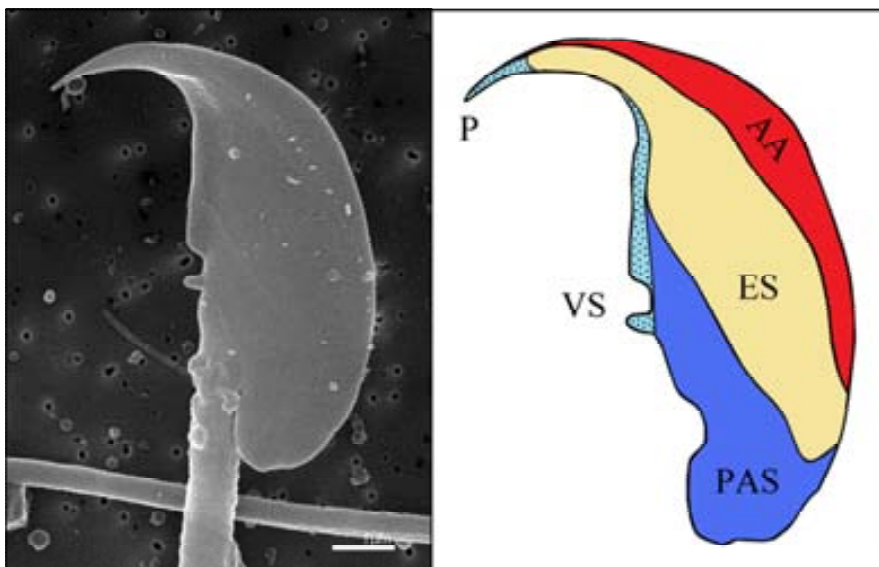


Figura 5.1.1. Micrografía electrónica de barrido y representación esquemática de la cabeza del espermatozoide de ratón doméstico, *M. musculus domesticus*. AA: acrosoma anterior; ES: segmento ecuatorial; PAS: lámina post-acrosómica; VS: crestas ventrales; P: perforatorio. Barra de escala = 1  $\mu$ m.

Diversos estudios han demostrado que la organización, composición y función de las estructuras espermáticas varían substancialmente entre taxones. Gran parte de esta variación puede ser explicada por la intervención de factores sexuales que pueden modelar la morfología espermática con fin de fecundar al óvulo, como el sistema de apareamiento, el éxito en la fertilización o la selección sexual post-copulatoria (Gomendio y Roldán, 1991; Roldán y col., 1992; Breed,



2004, 2005; Malo y col., 2006; Martín-Coello y col., 2008; Ito y col., 2009; Firman y col., 2010). No obstante, estas fuerzas evolutivas de carácter sexual no parecen ser suficientes para explicar toda la variabilidad morfológica espermática, ya que la variación genética existente entre distintos individuos puede contribuir a la evolución de la forma y función de sus espermatozoides (Joseph y Kirkpatrick, 2004; Immler, 2008). Así, por ejemplo, factores selectivos involucrados en el proceso de especiación, como pueden ser las incompatibilidades genéticas (Möri 1961; Turner y col., 2011; White y col., 2012) o las reordenaciones cromosómicas, pueden influir de manera significativa en este sentido.

#### 5.1.1. Objetivos

El ratón doméstico, *M. musculus domesticus*, constituye un modelo ideal para investigar el efecto de las reorganizaciones cromosómicas sobre la morfología espermática debido a que, a diferencia de otros mamíferos, presenta una gran diversidad cariotípica. De este modo, la presencia de divergencias cromosómicas interindividuales podría dar lugar a alteraciones de la forma o el tamaño de los gametos que, a su vez, podrían producir diferencias en el éxito reproductivo de los animales.

Estudios morfológicos y etológicos en ratones de la zona de estudio han revelado que las translocaciones Rb pueden ocasionar una disminución del flujo génico entre poblaciones cariotípicamente diferenciadas (Muñoz-Muñoz y col., 2003, 2006, 2011; Sans-Fuentes y col., 2005, 2009, 2010). Asimismo, en animales con múltiples metacéntricos se ha detectado la presencia de un elevado número de alteraciones morfológicas, tanto en espermátidas redondas en fase de maduración como en espermatozoides epididimales (véase Capítulo 4). Este hecho permite sospechar que dichas reorganizaciones podrían también tener algún efecto sobre el tamaño y/o la forma del espermatozoide. A su vez, esta hipótesis viene apoyada por ciertos resultados, obtenidos en cruzamientos realizados en condiciones de cautividad entre distintos linajes de *M. musculus*,



que demuestran que la morfología espermática puede verse profundamente alterada por cambios en loci asociados a cromosomas específicos (Oka y col., 2007; Turner y col., 2011; White y col., 2012).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se plantea como principal objetivo de este apartado de la tesis evaluar el efecto del número diploide y de la composición estructural del cariotipo en el tamaño y la forma de la cabeza del espermatozoide en ejemplares de *M. musculus domesticus* procedentes de la zona de estudio. A tal efecto, se han llevado a cabo análisis comparativos entre ratones St y Rb mediante la aplicación de la morfometría geométrica (GM) a imágenes obtenidas con microscopía electrónica de barrido (SEM).

## 5.2. Material y métodos

El análisis de variación morfológica en la cabeza del espermatozoide se realizó a partir de muestras de 32 machos maduros procedentes del SRbB (véase Apéndice 3). El epidídimo caudal izquierdo de cada animal fue diseccionado y disgregado en 5 ml de tampón fosfato (PB 0.1 M) a temperatura ambiente. Se filtró 1 ml de la solución espermática a través de una membrana Nucleopore (0.2  $\mu\text{m}$ ) e inmediatamente se fijó en una solución de glutaraldehído al 2.5%, paraformaldehído al 2% y PB 0.1 M a 4°C. Posteriormente las muestras fueron lavadas en PB 0.1 M, fijadas en tetraóxido de osmio al 1%, lavadas de nuevo en PB 0.1 M, deshidratadas en series graduales de etanol y secadas mediante el método del punto crítico. Las membranas se montaron en soportes tipo *stubs*, se recubrieron con un baño de oro y fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido S-570 (Hitachi) con un voltaje de aceleración de 15 kV. Para cada individuo, se seleccionaron al azar un promedio de 20 cabezas de espermatozoides situadas en plano completamente horizontal, con el proceso apical orientado hacia el lado izquierdo y sin evidencia de alteraciones en su estructura (ej., ausencia del proceso apical, torsiones en el punto de inserción del flagelo o con dobles cabezas).



El efecto de las fusiones Rb sobre la cabeza del espermatozoide fue analizado en relación al número diploide ( $2n$ ) y al grado de heterocigosis estructural (Ht). De acuerdo con el primer criterio, las muestras se clasificaron en los siguientes grupos: St, ejemplares con todos los cromosomas telocéntricos ( $2n=40$ ); Rb(38-40), animales con una o dos translocaciones e individuos con todos los cromosomas telocéntricos pero procedentes de localidades en las que se detectaron individuos Rb; Rb(33-37), ejemplares con tres a siete fusiones Rb; y Rb(30-32), ratones con ocho a diez translocaciones. Para el estudio del efecto del Ht, los animales fueron distribuidos en los siguientes grupos: AA, individuos con todos los cromosomas telocéntricos; H1 y H2, ejemplares con una y dos fusiones en heterocigosis, respectivamente; H3, individuos con al menos tres fusiones en heterocigosis; y MM, ratones con todas las fusiones en homocigosis. Valga señalar que los individuos H1-H3 pudieron ser portadores de una a tres fusiones en heterocigosis, bien exclusivamente o bien combinadas con una, dos, tres o cuatro fusiones en estado homocigótico.

Los análisis de morfometría geométrica se llevaron a cabo mediante la serie de programas Tps (Rohlf, 2006) y MorphoJ (Klingenberg, 2011). Se digitalizaron dieciséis *landmarks* y tres *semilandmarks* bidimensionales alrededor de cada cabeza de espermatozoide mediante el programa tpsDig2 (Fig. 5.2.1). Los *semilandmarks* (puntos 16-18), correspondientes al contorno curvo de la región acrosómica, se digitalizaron como puntos equidistantes utilizando la opción *resample* del programa tpsDig2.

Puesto que análisis preliminares revelaron variaciones en la amplitud de la cabeza del espermatozoide entre grupos Rb (véase el apartado de Resultados), con objeto de comprobar que los cambios de forma detectados no fueron debidos al proceso de preparación de las muestras para SEM, se analizó una submuestra de espermatozoides de individuos Rb con cariotipos extremos aplicando técnicas de microscopía óptica convencional (LM). De este modo, siguiendo los criterios establecidos por Braden (1958), se midió la amplitud y la longitud de 20 cabezas de espermatozoide en 10 animales [5 Rb(38-40) y 5 Rb(30-32)] usando el programa tpsDig2. Dicho procedimiento se aplicó



también a una submuestra similar de imágenes obtenidas mediante SEM. Para cada individuo se obtuvo el promedio de cada parámetro. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante el estadístico t de Student. Con objeto de valorar las diferencias entre ambos procedimientos, se correlacionaron las medidas tomadas mediante microscopías óptica y electrónica.

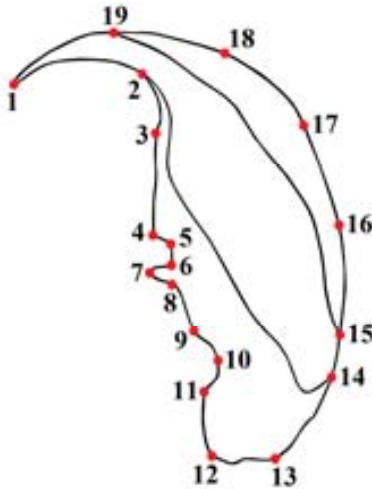


Figura 5.2.1. Esquema de la cabeza del espermatozoide de un individuo St con la localización de los *landmarks* considerados: (1) extremo del proceso apical; (2) punto de confluencia entre el proceso apical y la VS superior; (3) prominencia axial de la VS superior; (4 y 7) extremo superior e inferior de las VS; (5 y 6) separación interna entre las VS; (8-11) borde de inserción de la cabeza del espermatozoide con el flagelo; (12 y 13) extremos de la PAS; (14, 15 y 19) límites basales y apical del segmento ecuatorial. Los puntos 16 al 18 corresponden a los *semilandmarks* digitalizados en el contorno curvo de la región AA.

Las configuraciones de *landmarks* y *semilandmarks* de la muestra completa fueron superpuestas mediante un análisis Procrustes con fin de extraer las variables de forma y tamaño (Rohlf y Slice, 1990). El tamaño, definido como la medida del centroide (CS), equivale a la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado de un conjunto de *landmarks* en relación a su centroide (Bookstein, 1991). La alometría, interpretada como la variación en la forma dependiente del tamaño, se testó para el global de la muestra y para cada grupo cromosómico mediante un análisis multivariante de la covarianza (MANCOVA), tomando el CS como covariable, y mediante una regresión lineal multivariante de las coordenadas procrustes en relación al CS (MorphoJ, versión 1.04b). La significación estadística de las regresiones alométricas se determinó mediante una prueba de permutaciones de 10.000 iteraciones bajo la hipótesis nula de independencia entre forma y tamaño, e intercambiando los valores del CS entre individuos (Good, 1994). Dado que se detectó una dependencia significativa



entre los cambios de forma y tamaño (véase el apartado de Resultados), se utilizaron los residuales de la regresión multivariante para realizar los análisis posteriores (Frost y col., 2003).

Las variaciones de forma de la cabeza del espermatozoide entre grupos cromosómicos se determinaron mediante un análisis de variables canónicas (CVA). El uso de rejillas de deformación permitió visualizar los cambios de forma explicados por los dos primeros ejes canónicos (MorphoJ, versión 1.04b). Un análisis multivariante de la varianza (MANOVA) se aplicó a todos los vectores canónicos (CV) para estimar el efecto del 2n y el Ht sobre la variación de la forma de la cabeza del espermatozoide. Se evaluaron las variaciones en tamaño relativo al 2n y al Ht mediante análisis de la varianza (ANOVA) de uno y dos factores sobre el CS. Se testaron las diferencias de CS entre pares de muestras con una prueba de *Sheffé*. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico STATISTICA, versión 8.0.

### 5.3. Resultados

La comparación de los resultados morfométricos obtenidos mediante LM y SEM reveló la existencia de valores significativamente menores en la longitud y amplitud de la cabeza del espermatozoide en las muestras tratadas para SEM ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5.3.1). No obstante, la precisión de las medidas fue mayor en las imágenes de SEM que en las de LM, apreciándose, en consecuencia, una menor dispersión de las variables al emplear el primer procedimiento (Fig. 5.3.1).

Ambos métodos mostraron una fuerte correlación en el patrón de variación morfológica ( $r = 0.67$  para la amplitud y  $0.65$  para la longitud,  $P < 0.05$ ) (Fig. 5.3.2), resultados que son congruentes con las diferencias de tamaño y amplitud de la cabeza del espermatozoide entre los grupos Rb(38-40) y Rb(30-32) detectadas en los análisis de MG (véase más adelante).

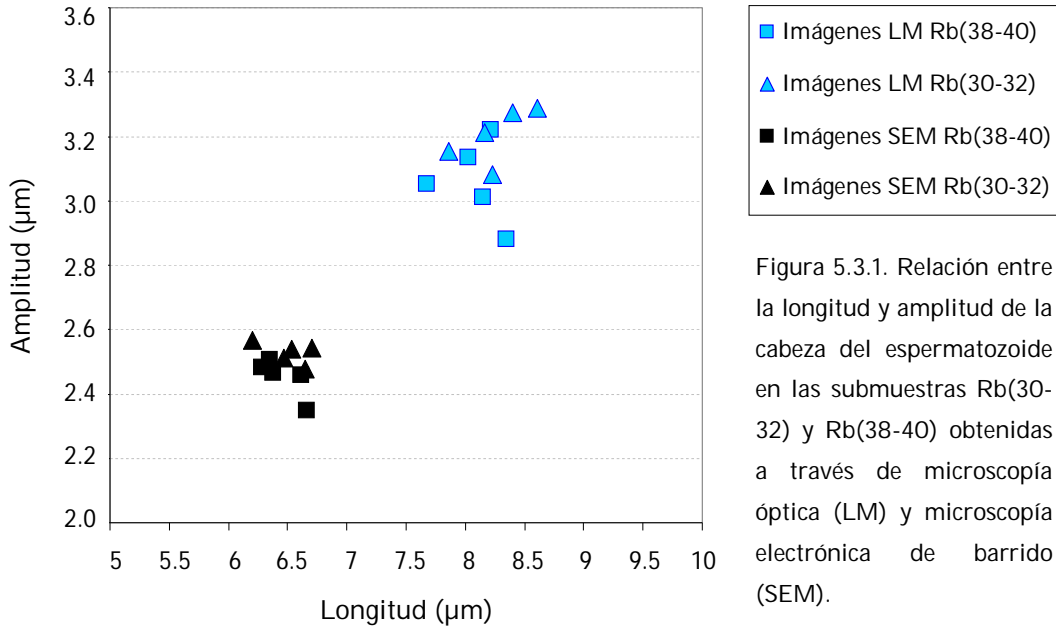


Figura 5.3.1. Relación entre la longitud y amplitud de la cabeza del espermatozoide en las submuestras Rb(30-32) y Rb(38-40) obtenidas a través de microscopía óptica (LM) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

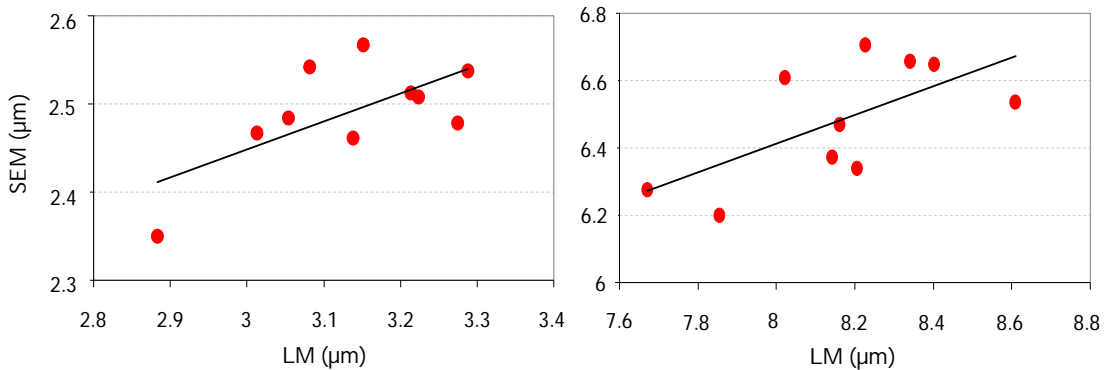


Figura 5.3.2. Regresión lineal de la amplitud (izquierda) y longitud (derecha) de la cabeza del espermatozoide entre los valores obtenidos mediante microscopía óptica (LM) y electrónica de barrido (SEM).

Considerando la totalidad de la muestra, los resultados del MANCOVA, tomando el CS como covariable, reveló una dependencia significativa entre la forma y el tamaño de la cabeza del espermatozoide ( $F=5.1320$ ,  $g.l.=102$ ,  $P<0.001$ ). La regresión multivariante predijo cerca del 10% de la alometría tanto para el  $2n$  como para el Ht (10.07% y 9.79%, respectivamente).





Para los grupos de  $2n$ , el CVA proporcionó tres funciones que clasificaron correctamente el 70.3% de los espermatozoides. El primer (CV1) y segundo (CV2) eje acumularon el 89.88% de la variación total entre grupos (Fig.5.3.3). Los cambios de forma a lo largo del CV1 (69.01% de la variación) estuvieron asociados a la distancia entre las crestas ventrales. Este eje separó notablemente los espermatozoides de los individuos St de los correspondientes al resto de grupos. Asimismo, las rejillas de deformación relativas al CV1 mostraron que la cabeza del espermatozoide de los animales St presentaba las crestas ventrales notoriamente más separadas que en los Rb (Fig. 5.3.4). Las principales variaciones morfológicas explicadas por el CV2 (20.87%) correspondieron a la amplitud de la cabeza del gameto. Este eje permitió separar de manera parcial los espermatozoides de los individuos Rb(38-40) de los del resto de grupos de  $2n$ . Las rejillas de deformación asociadas al CV2 indicaron un notable estrechamiento de la región post-acrosómica en los espermatozoides pertenecientes al grupo Rb(38-40) (Fig. 5.3.4).

- St
- Rb(38-40)
- Rb(33-37)
- Rb(30-32)

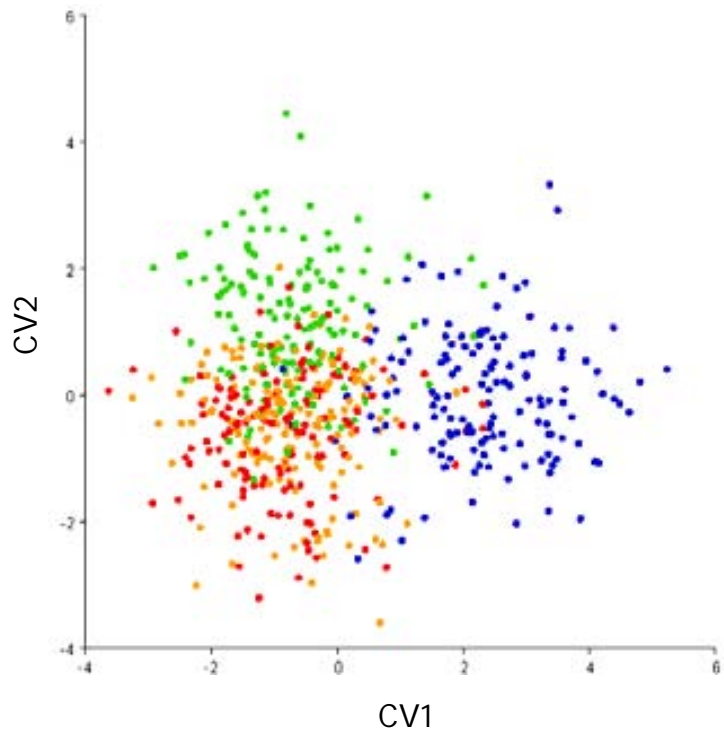


Figura 5.3.3. Distribución de los grupos de  $2n$  a lo largo de los dos primeros ejes canónicos (CV1 y CV2).

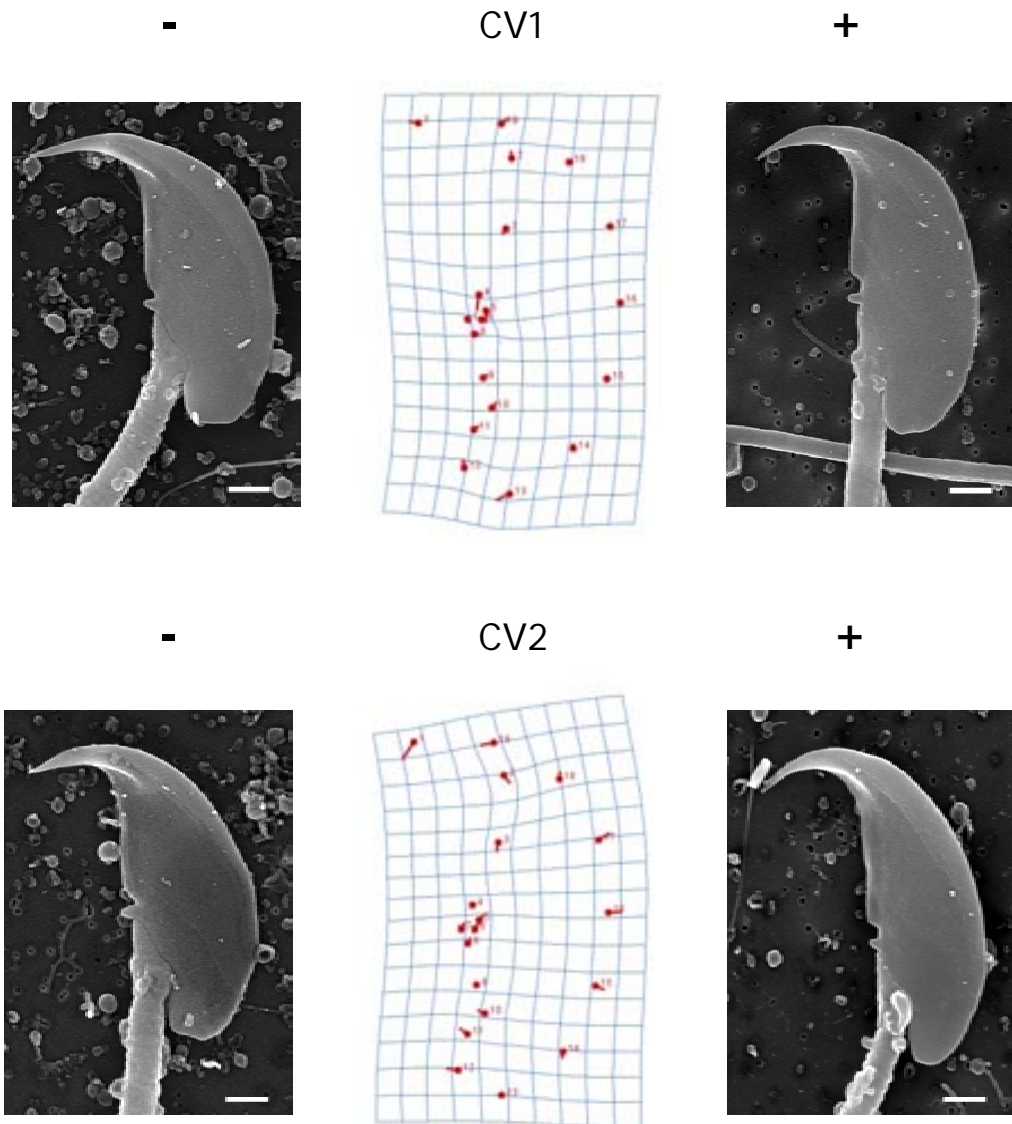


Fig. 5.3.4. Rejillas de deformación de la cabeza del espermatozoide correspondientes al primer (CV1) y segundo (CV2) eje canónico. Se incluye el desplazamiento de cada *landmark* y *semilandmark* a lo largo de cada eje. Se asume el extremo positivo del eje como la configuración morfológica de referencia. Barras de escala = 1  $\mu\text{m}$ .



El CVA en función del Ht proporcionó cuatro funciones discriminantes que separaron correctamente al 67.6% de los individuos. Los dos primeros ejes canónicos explicaron el 77.48% de la variación total (CV1, 54.11%; CV2, 23.37%); los cambios morfológicos en el espacio canónico siguieron una tendencia semejante a la obtenida en los análisis de 2n, si bien en el caso del Ht las diferencias entre grupos fueron menores (Fig. 5.3.5).

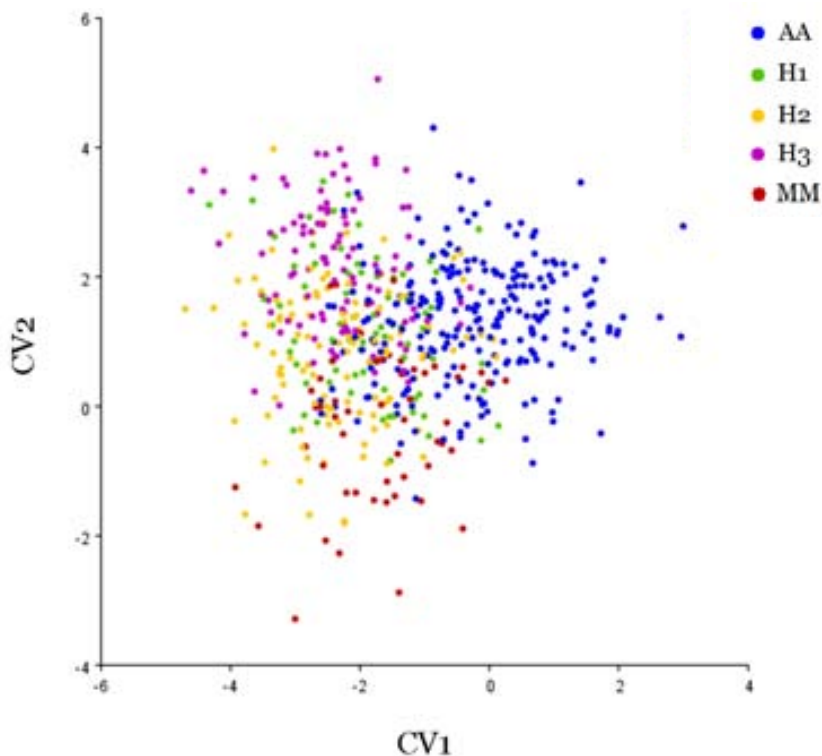


Figura 5.3.5. Distribución de los grupos de Ht a lo largo de los dos primeros ejes canónicos (CV1 y CV2).

El MANOVA aplicado a los CVs indicó la existencia de un efecto significativo del 2n ( $F_{2n}=151.080$ , g.l.=9,  $P<0.001$ ), del Ht ( $F_{Ht}=38.141$ , g.l.=12,  $P<0.001$ ) y de su interacción ( $F_{2n \times Ht}=5.802$ , g.l.=6,  $P<0.001$ ) sobre la forma de la cabeza del espermatozoide. Para cada grupo Rb, los caracteres de forma variaron indistintamente dependiendo del balance entre el número de fusiones Rb y metacéntricos en heterocigosis (Fig. 5.3.6). Los animales St mostraron



puntuaciones medias en el CV1 claramente superiores a los del resto de grupos cromosómicos; por lo que respecta al CV2, los individuos Rb(38-40) presentaron valores medios notablemente inferiores a los de los demás grupos de heterocigotos, mientras que los animales St y homocigotos mostraron valores próximos a los de los grupos de heterocigotos (Fig. 5.3.6).

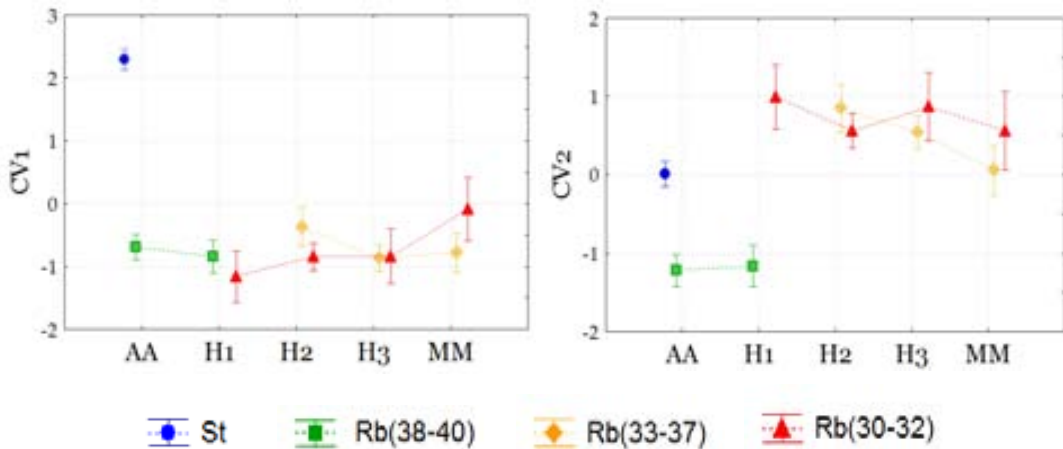


Figura 5.3.6. Variación de los componentes de forma CV1 y CV2 en relación al número diploide ( $2n$ ) y al grado de heterocigosis (Ht).

El ANOVA de dos factores mostró diferencias significativas en el CS entre grupos ( $F_{2n \times Ht} = 10.188$ , g.l.=2,  $P < 0.001$ ). Asimismo, el ANOVA de un factor reveló divergencias significativas en todos los grupos cromosómicos ( $F_{2n} = 12.924$ , g.l.=3,  $P < 0.001$ ;  $F_{Ht} = 8.031$ , g.l.=4,  $P < 0.001$ ). En concordancia con los análisis de forma, la cabeza del espermatozoide mostró patrones de variación en el CS entre los distintos grupos cromosómicos, tanto atendiendo al  $2n$  como al Ht. La cabeza del espermatozoide fue mayor en aquellos animales con los números diploides más bajos [Rb(30-32)] y con una o más fusiones en heterocigosis. No obstante, dentro de este grupo cromosómico, los individuos con todas las fusiones en homocigosis presentaron los valores medios de CS más bajos de toda la muestra (Fig. 5.3.7). Las comparaciones entre pares de muestras (Tabla 5.3.1) indicaron la existencia de diferencias significativas en los



siguientes casos: i) entre los homocigotos y los heterocigotos estructurales pertenecientes al grupo Rb(30-32); ii) entre los Rb(38-40) telocéntricos y los homocigotos de los grupos Rb(30-32) y Rb(33-37), y entre los individuos de este último grupo y aquéllos con tres o más fusiones en heterocigosis; y iii) entre los distintos heterocigotos del grupo Rb(30-32) respecto a los Rb(33-37) homocigotos y Rb(33-37) con tres fusiones en heterocigosis.

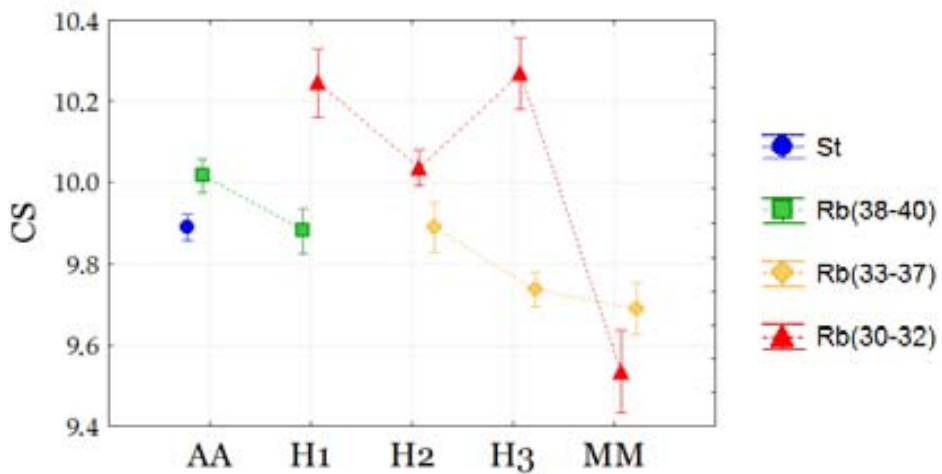


Figura 5.3.7. Variaciones del tamaño de la cabeza del espermatozoide (CS) en relación al número diploide ( $2n$ ) y al grado de heterocigosis (Ht).



Tabla 5.3.1. Resultados de las comparaciones entre pares de muestras (prueba de *Sheffé*) para el CS en función del 2n y el Ht.

	St AA	Rb(38-40) AA	Rb(38-40) H1	Rb(33-37) H2	Rb(33-37) H3	Rb(33-37) MM	Rb(30-32) H1	Rb(30-32) H2	Rb(30-32) H3	Rb(30-32) MM
St AA	–	0.7467	1	1	0.5808	0.5939	0.0797	0.634	0.0661	0.2917
Rb(38-40) AA	–	–	0.9094	0.9693	0.0117*	0.0359*	0.7504	1	0.6806	0.0262*
Rb(38-40) H1	–	–	–	1	0.8954	0.8260	0.1543	0.8437	0.1269	0.4441
Rb(33-37) H2	–	–	–	–	0.9133	0.8424	0.2504	0.9369	0.2086	0.4602
Rb(33-37) H3	–	–	–	–	–	1	0.0010*	0.0079*	0.0009*	0.9483
Rb(33-37) MM	–	–	–	–	–	–	0.0015*	0.0245*	0.0013*	0.9955
Rb(30-32) H1	–	–	–	–	–	–	–	0.8492	1	0.0009*
Rb(30-32) H2	–	–	–	–	–	–	–	–	0.7899	0.0187*
Rb(30-32) H3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.0007*
Rb(30-32) MM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

(\*):  $P < 0.05$



## 5.4. Discusión

La gran resolución de las imágenes de SEM, combinada con la precisión de la MG, constituye una metodología más precisa y detallada para analizar los cambios de forma y tamaño de la cabeza del espermatozoide que los procedimientos basados en LM. Si bien el tratamiento de las muestras para SEM puede conllevar una ligera reducción del tamaño de dicha estructura, probablemente asociada a la contracción de las membranas durante la deshidratación de la muestra, los análisis morfométricos realizados han demostrado la existencia de una fuerte correlación con la variación fenotípica detectada mediante LM. Asimismo, puesto que todas las muestras fueron procesadas siguiendo la misma metodología, no cabe esperar un sesgo en los resultados debido al tratamiento para SEM.

En el caso de la cabeza del espermatozoide, la detección en el presente estudio de un cierto grado de variación morfológica asociada al tamaño resulta destacable, dado que la presencia de alometría en una estructura unicelular no ha sido descrita con anterioridad. Pese a que los mecanismos precisos que comportan la asociación entre la forma y el tamaño de la célula siguen siendo desconocidos, estudios recientes han detectado cierta correlación entre el tamaño celular y el comportamiento de la maquinaria citoesquelética (Needleman, 2009; Savriama y col., 2010). Debido a que el citoesqueleto es el principal responsable de configurar la morfología celular, es razonable pensar que cambios en el comportamiento de dicha maquinaria podrían ser, en parte, responsables de la aparición de variaciones morfológicas asociadas al tamaño.

Los resultados aquí presentados demuestran la existencia de una variación substancial del tamaño y la forma de la cabeza del espermatozoide en *M. musculus domesticus* del SRbB en relación a la configuración cariotípica. Según se ha puesto en evidencia en diversos estudios, las translocaciones Rb comportan la pérdida de secuencias teloméricas y ADN satélite de los cromosomas telocéntricos implicados en las reorganizaciones (Garagna y col., 1995; 2001a); a su vez, ésta últimas afectan a los patrones de recombinación



cromosómica, modificando la cantidad y distribución de los intercambios génicos en los metacéntricos (Burt, 2000; Rieseberg, 2001; Dumas y Britton-Davidian, 2002) y permitiendo cambios en los grupos de ligamento (Davison y Akeson, 1993; Rieseberg, 2001). Consecuentemente, los patrones de expresión y regulación de diversos genes involucrados en la morfogénesis espermática podrían verse alterados ante la presencia de translocaciones Rb (Eaker y col., 2001; Merico y col., 2003, 2008; Manterola y col., 2009), afectando este proceso a la morfología de la cabeza del espermatozoide maduro. En concordancia con estas observaciones, ciertos estudios han relacionado alteraciones en loci particulares y cambios en el fenotipo del espermatozoide. Así, por ejemplo, resultados obtenidos a partir de cruzamientos en el laboratorio entre distintos linajes de *Mus musculus*, han demostrado que la variación morfológica de la cabeza del espermatozoide se halla asociada a loci localizados en los cromosomas Y (Styrna y col., 1991, 2002; Styrna y Krzanowska, 1995), 11 (Oka y col., 2007), 7 y X (White y col., 2012). Asimismo, se ha observado que las alteraciones epistáticas pueden alterar significativamente el fenotipo espermático de manera aditiva; por ejemplo, cruces entre *M. musculus musculus* y *M. musculus domesticus* han revelado que ciertos pares de loci (en los cromosomas 4 y X, 11 y X, y X y X) afectan la morfología de la cabeza del espermatozoide (White y col., 2012). Todos estos resultados sugieren que la relación detectada en el área de estudio entre fusiones Rb y variación fenotípica en la cabeza del espermatozoide presenta una base genética compleja, en la que las relaciones epistáticas deben jugar un papel importante.

Los análisis morfométricos realizados en el presente estudio han permitido apreciar que la mayor variación de forma en la cabeza del espermatozoide entre los grupos St y Rb se focaliza en la región de las crestas ventrales. Concretamente, los ratones con cromosomas metacéntricos mostraron espermatozoides con crestas ventrales más pequeñas y, a su vez, más próximas. Según se ha descrito en otros múridos, como *Apodemus agrarius* (Lee y Möri, 2006), *Aethomys chrysophilus* (Breed y col., 2000) y *Rattus norvegicus* (Okó y





Clermont, 1988), las crestas ventrales en *M. musculus domesticus* consisten en una rígida extensión del citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide compuesta principalmente por proteínas específicas de unión a ácidos grasos FABP9/PERF15 (Oko y Morales, 1994; Korley y col., 1997). Estudios fenotípicos realizados en cepas de laboratorio de ratón doméstico mostraron una estrecha relación entre los niveles de FABP9/PERF15 y el grado de desarrollo de las crestas ventrales; los individuos carentes de dicha proteína (FABP9/PERF15  $-/-$  mice) mostraron una reducción o ausencia de estas estructuras en un número moderado de cabezas espermáticas (Farkhondeh y col., 2009; Selvaraj y col., 2010). Así pues, la presencia de alteraciones en la morfología de las crestas ventrales podría estar relacionada con factores genéticos involucrados en la síntesis de estas proteínas. Dado que el gen implicado en la síntesis de FABP9/PERF15 se halla en el cromosoma 3 (<http://www.ensembl.org>), implicado en la formación de una de las fusiones detectadas en la zona de estudio, no cabe descartar la posibilidad de que la expresión de dicho gen pueda verse alterada por efecto de estas reordenaciones cromosómicas. Las crestas ventrales parecen ser importantes en la asistencia de la penetración mecánica de los espermatozoides a través de la zona pelúcida (Flaherty y col., 1983; Breed 1984; Flaherty, 1987) y en el mantenimiento de la estabilidad de las membranas del gameto durante la penetración (Oko y Clermont, 1988; Oko y col., 1990). Sin embargo, en qué medida la reducción de estas crestas puede afectar al proceso de penetración mecánica a través de la zona pelúcida (Selvaraj y col., 2010) en los ratones de la zona de estudio es un aspecto que queda por explorar.

Además de las diferencias de forma detectadas en la región de las crestas ventrales entre ratones St y Rb, el análisis Procrustes también reveló diferencias en la amplitud de la cabeza del gameto entre grupos cromosómicos. En concreto, mientras las cabezas del espermatozoide de los animales pertenecientes al grupo Rb(38-40) mostraron la región post-acrosómica más estrecha, las cabezas más anchas se detectaron en los individuos con un mayor número de translocaciones [Rb(30-32) y Rb(33-37)]. Los espermatozoides de



los ratones St presentaron, en términos generales, morfologías intermedias. Estos resultados sugieren que las variaciones detectadas en la amplitud de los espermatozoides entre grupos cromosómicos podrían estar relacionadas con alteraciones en el proceso de citodiferenciación gamética producidas por las translocaciones Rb. La elongación espermática es un proceso principalmente controlado por la expresión genética del propio gameto (Joseph y Kirkpatrick, 2004; Johnson, 2007). En este proceso, la síntesis de proteínas involucradas en la compactación nuclear y/o en la configuración de las estructuras microtubulares que permiten la elongación acrosómica y nuclear (como el acroplaxoma o el anillo perinuclear) son esenciales para producir gametos viables (Lally y Clermont, 1981; Toshimori y Ito, 2003). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que las modificaciones en el proceso de diferenciación gamética pueden estar inducidas por las fusiones Rb y que aquéllas pueden ser particularmente importantes cuando aparece un número relativamente elevado de translocaciones. En este marco, sería interesante determinar la posible relación entre la forma del núcleo y la forma de la cabeza del espermatozoide.

En relación al tamaño de la cabeza del espermatozoide, en la muestra estudiada los ratones Rb(30-32) con una a tres fusiones en heterocigosis presentaron los valores medios de CS más elevados. Asimismo, los valores más bajos correspondieron a los homocigotos de los grupos Rb(30-32) y Rb(33-37). Estos resultados sugieren que la presencia de un número relativamente elevado de fusiones en homocigosis puede alterar substancialmente el proceso de elongación espermática. No obstante, otros factores, como la longitud del flagelo, podrían también verse implicados en las diferencias de tamaño apreciado entre grupos cromosómicos. Análisis comparados entre especies de múridos filogenéticamente cercanas mostraron que el incremento del tamaño de alguno de los componentes anatómicos del espermatozoide, como por ejemplo la cabeza, va asociado al aumento de otras estructuras espermáticas, como la pieza media y el flagelo (Gómez-Montoto y col., 2011). Asimismo, la longitud total del espermatozoide está estrechamente relacionada con la

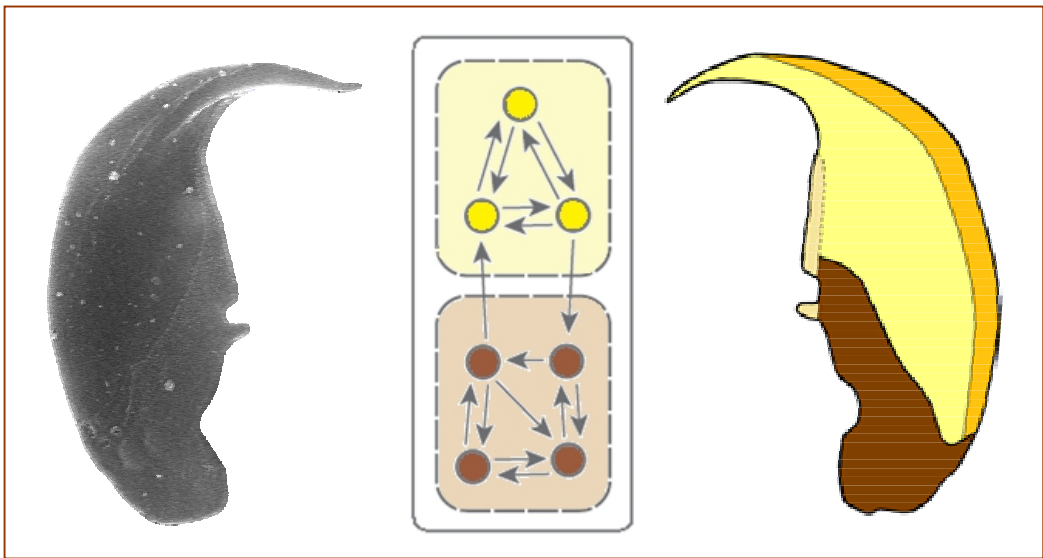


velocidad de natación y, a su vez, con los niveles de competencia espermática (Gomendio y Roldán, 2008; Gómez-Montoto y col., 2011). Resultados preliminares sobre motilidad espermática efectuados partir de espermatozoides extraídos del epidídimo de animales de la zona de estudio (datos inéditos en Corts, 2012) parecen apoyar la existencia de diferencias significativas entre individuos de los grupos Rb(28-30) y St, mostrando los primeros un grado de motilidad significativamente menor. No obstante, sería necesario disponer de muestras más amplias para confirmar estos resultados y poder determinar, en su caso, el efecto de la competencia espermática y su importancia evolutiva dentro de la zona de estudio.

En conclusión, el uso combinado de las técnicas de SEM y MG para el análisis morfológico de la cabeza del espermatozoide de ratones procedentes del SRbB ha permitido demostrar, por primera vez, que el número diploide y la composición estructural del cariotipo juega un papel importante en la variación de la forma y tamaño de dicha estructura. Este procedimiento ha aportado la precisión suficiente para detectar y cuantificar dichas variaciones, que habrían sido posiblemente subestimadas si se hubiesen utilizado métodos de microscopía óptica. Las modificaciones en la forma de la cabeza del espermatozoide en los animales Rb parecen ser concordantes con las alteraciones estructurales detectadas durante la espermatogénesis en los animales con  $2n$  bajos y con varias translocaciones en heterocigosis (Capítulo 4; Sans-Fuentes y col., 2010). No obstante, se requieren futuros estudios morfológicos y funcionales sobre las células espermáticas, junto con cruzamientos en condiciones de cautividad, para determinar en qué medida el éxito reproductivo se ve alterado en estos individuos. Estos resultados podrán ser de interés desde el punto de vista de la especiación cromosómica, puesto que, según se ha comentado en capítulos precedentes, el SRbB constituye una zona de polimorfismo cromosómico particular debido a la ausencia de una raza Rb propia y a la relativamente baja heterocigosis estructural.



## Capítulo 6.



**Modularidad en la cabeza  
del espermatozoide**

---



## 6.1 Introducción

### 6.1.1. Estructuras morfológicas complejas y modularidad

Los organismos están constituidos por múltiples regiones anatómicas especializadas capaces de llevar a cabo diversas funciones de forma autónoma. No obstante, dichas regiones mantienen cierto grado de conexión entre sí, integrándose de manera conjunta dentro de un mismo individuo (Wagner y col., 2007; Klingenberg, 2008). De forma semejante, las estructuras morfológicas complejas pueden también mostrar signos de heterogeneidad, reflejando un cierto grado de coordinación entre los distintos elementos que las constituyen. Este fenómeno, conocido como integración morfológica (Olson y Miller, 1958), implica que ciertas unidades morfogenéticas (denominadas módulos) estrechamente correlacionadas entre sí se comporten con cierto grado de independencia en relación a otras unidades integradas dentro de la misma estructura (Cheverud, 1996; Wagner y col., 2007; Klingenberg, 2008; Goswami y Polly, 2010) (Fig.6.1.1). Las diferencias en el grado de integración entre y dentro de los conjuntos de módulos en una estructura morfológica vendrán determinadas por el grado de modularidad de la misma (Klingenberg, 2008). Así, se estima que una estructura morfológica presenta modularidad cuando se reconocen diferentes direcciones de variación entre las subunidades que la configuran (Wagner y Misof, 1993; Wagner, 1994).

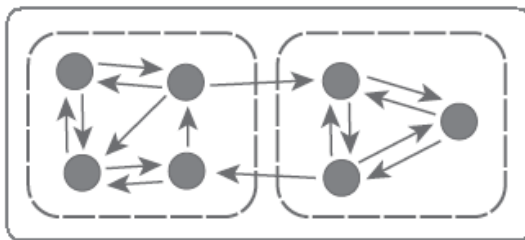


Figura 6.1.1. Esquema de una estructura morfológica (línea continua) constituida por dos módulos (líneas discontinuas). Obsérvese que el grado de integración dentro de cada módulo es superior al hallado entre módulos. Esquema extraído de Klingenberg (2008).

Dado que los módulos de un sistema biológico pueden originarse a partir de distintos procesos que dan lugar a una variación conjunta de determinados rasgos o estructuras morfológicas (Mitteroecker y Bookstein, 2007;



Klingenberg, 2008), es necesario contextualizar la naturaleza de las interacciones apreciadas. En este sentido se han definido cuatro tipos de modularidad (Fig. 6.1.2): ontogénica (o del desarrollo), genética, funcional y evolutiva (Klingenberg, 2008).

- La modularidad ontogénica resulta de las interacciones entre precursores encargados de formar distintas partes de una estructura morfológica durante el desarrollo. Estas interacciones, también conocidas como epigenéticas (Hallgrímsson, 2007), pueden mediar la expresión de cambios genéticos y ambientales, transmitiendo sus efectos a distintos caracteres fenotípicos.

- La modularidad genética implica la covariación genética entre distintos caracteres morfológicos debido principalmente a la presencia de pleiotropías y desequilibrios de ligamiento (Nadeau y col., 2003; Wagner y col., 2007).

- La modularidad funcional hace referencia al grado de asociación que distintos elementos morfológicos mantienen con el fin de llevar a cabo una o más funciones específicas (Enlow y Hans, 1996; Herring, 1993; West-Eberhard, 2003).

- La modularidad evolutiva engloba los efectos de los tipos de modularidad previamente expuestos, estableciendo un patrón de asociación de caracteres morfológicos específico para un linaje evolutivo determinado.

Si bien las relaciones existentes entre estos tipos de modularidad en las estructuras morfológicas es un aspecto todavía por esclarecer (Klingenberg, 2010), se ha observado que la modularidad ontogénica se encuentra estrechamente asociada a la modularidad genética, debido a que los procesos del desarrollo median la expresión genética en los caracteres fenotípicos (Nadeau y col., 2003). Asimismo, la modularidad funcional puede influir notablemente sobre la vías de modularidad del desarrollo, remodelando y redireccionando los patrones de crecimiento tisular (Enlow y Hans, 1996;



Herring, 1993; West-Eberhard, 2003). A nivel de población, la actuación de la selección natural sobre la modularidad funcional y genética, presente en ciertos complejos morfológicos, puede promover la acumulación de cambios, estableciendo con el paso del tiempo un patrón de modularidad evolutivo específico para un clado o linaje determinado (Klingenberg, 2008).

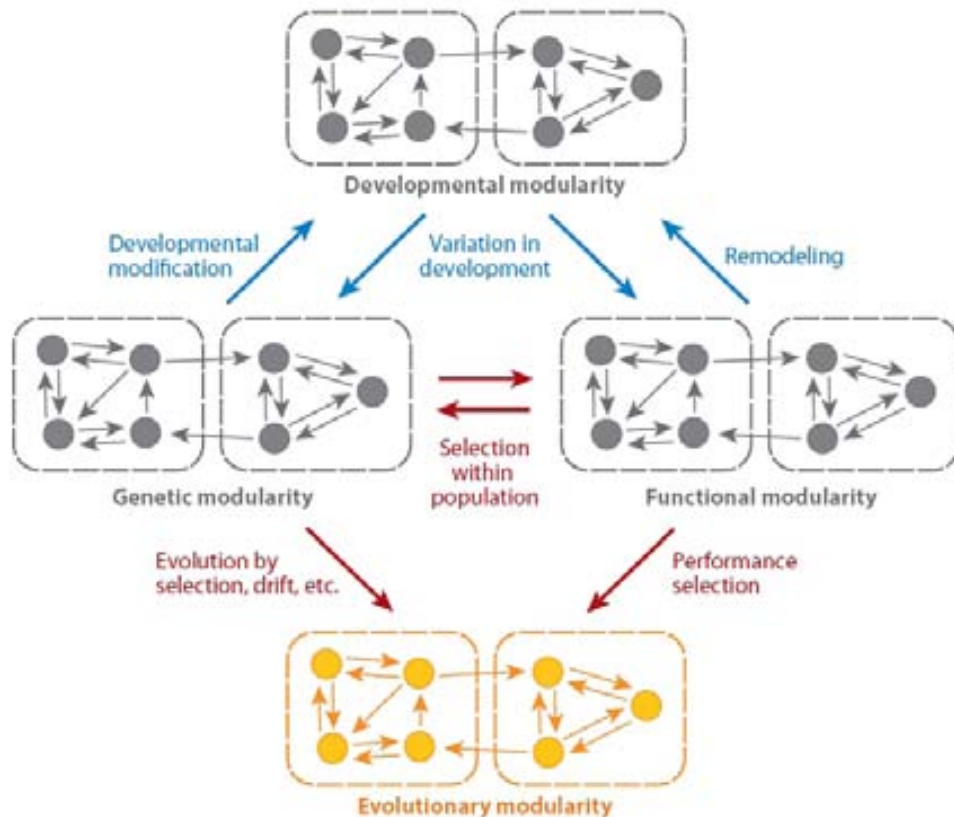


Figura 6.1.2. Esquema de las relaciones existentes entre las distintas variantes de modularidad. Esquema extraído de Klingenberg (2008).

### 6.1.2. Modularidad, evolución y mutaciones genéticas

La modularidad es un prerequisite esencial para la organización fenotípica jerárquica en los organismos superiores, así como para la aparición de adaptaciones complejas. Diversos estudios (Cheverud, 1996; Hansen y Houle, 2004; Klingenberg, 2005) han vinculado los conceptos de integración



morfológica y modularidad al de evolucionabilidad de los sistemas biológicos, dado que la autonomía de los módulos proporciona la flexibilidad evolutiva necesaria para inducir cambios adaptativos de algunas partes de un organismo en relación a otras (Raff, 1996; Wagner, 1996; Wagner y Altenberg, 1996; Kirschner y Gerhart, 1998; Von Dassow y Munro, 1999; Schlosser y Wagner, 2004). Así la evolucionabilidad, que hace referencia a la propensión de los sistemas de desarrollo a producir nueva variación genética (Jones y col., 2007), implica la presencia de mutaciones como mecanismo propulsor de la diversificación necesaria para la evolución de las estructuras morfológicas (Cámara y Pigliucci, 1999, Estes y col., 2005). Si bien las mutaciones son necesarias para mantener la diversidad genética (Bousquet y col., 1992; Polly, 2001, 2003), éstas pueden ocasionar efectos drásticos sobre los grupos de ligamento (Rieseberg, 2001; Renaud y col., 2009), comportando cambios en los patrones de covariación fenotípica en distintas estructuras sometidas a la acción de la selección natural durante generaciones (Cheverud, 1996; Schluter, 2000; Renaud y col., 2009). Por ello, las poblaciones cariotípicamente diferenciadas, como es el caso de los sistemas Rb de *M. musculus domesticus*, constituyen el substrato idóneo para evaluar el efecto que las reorganizaciones cromosómicas pueden ejercer sobre el mapa genotipo-fenotipo de los individuos y, por tanto, sobre el grado de evolucionabilidad de sus estructuras.

### 6.1.3. Modularidad y estructuras unicelulares

El concepto de modularidad engloba multitud de escenarios en los que es posible detectar patrones de conectividad entre distintos elementos ecológicos, morfológicos o moleculares (Wagner y col., 2007). Sin embargo, la mayoría de estudios de modularidad efectuados hasta el momento en organismos biológicos se han focalizado en el estudio de estructuras osteológicas complejas como el cráneo de mamíferos (Cheverud, 1996; Goswami y Polly, 2010) o la mandíbula de ratón (Cheverud, 1996, Muñoz-Muñoz y col., 2011; Burgio y col., 2012), y en análisis de complejos alares en dípteros (Klingenberg y Zaklan,





2000; Klingenberg y col., 2001). A nivel celular, si bien se ha evidenciado la presencia de modularidad funcional y estructural, por ejemplo en complejos moleculares asociados al sistema de transducción de señales bioquímicas, síntesis proteica o la configuración del uso mitótico (Hartwell y col., 1999; Spirin y Mirly, 2003; Wagner y col., 2007), poco se conoce sobre la existencia de modularidad fenotípica (también llamada modularidad variacional) en las estructuras que configuran la morfología de una célula.

#### 6.1.4. Compartimentación en la cabeza del espermatozoide

Según se ha indicado en el Capítulo 5 de la presente memoria, el espermatozoide es uno de los tipos celulares más especializados desde los puntos de vista estructural y funcional. Esta elevada especialización puede apreciarse, por ejemplo, en la región de la cabeza (Fig. 6.1.3; véanse detalles sobre su estructura en el Capítulo 5). Recientemente se ha observado que incluso la membrana plasmática de dicha parte del gameto presenta una gran especialización, tanto funcional como en su composición, siendo posible diferenciar dos dominios principales: la membrana plasmática acrosómica (APM) y la membrana plasmática post-acrosómica (PAPM) (Fig. 6.1.3). La APM, rica en esteroides, interacciona con la matriz extracelular del oocito una vez superado el proceso de capacitación y se fusiona con la membrana acrosómica externa adyacente con objeto de desencadenar la liberación del contenido acrosómico mediante un proceso de exocitosis regulada (Kim y Gerton, 2003). Por lo que respecta a la PAPM, diversos estudios han demostrado que, debido a su carencia de esteroides, este dominio podría presentar una función distinta a la desempeñada por la APM (Visconti y col., 1999; Selvaraj y col., 2006). Así, se ha sugerido que la PAPM debe adquirir un papel importante en las últimas etapas de la fecundación, permitiendo la fusión del espermatozoide a la membrana plasmática del oocito una vez traspasados los revestimientos superficiales de este último (Clark y Koehler, 1990). Entre la APM y la PAPM existe una extensión citoesquelética procedente de la teca



perinuclear, el anillo sub-acrosómico (SAR) (Olson y col., 2003; Selvaraj y col., 2006, 2009). Esta región está constituida por proteínas citoesqueléticas, como la actina o la vimentina, posiblemente involucradas en el proceso de compresión de ciertas estructuras, como la teca perinuclear (PT) (Virtanen y col., 1984; Oko y col., 1990; Breed y col., 2000), y en la asociación de proteínas de unión lipídica, como la FABP9/PERF-15, presentes en las crestas ventrales y el perforatorio (Oko y Morales, 1994; Schmitt y col., 1994). Estudios sobre la dinámica de membranas de los espermatozoides vivos realizados en múridos han demostrado que el SAR funciona como una barrera de difusión especializada, restringiendo la compartimentación de lípidos y otras moléculas endógenas en el dominio APM (Friend, 1982; Lin y Kan, 1996; Visconti y col., 1999; Travis y col., 2001). De hecho, algunos autores han considerado la compartimentación de la APM como un fenómeno relevante en la determinación del potencial fertilizador de los gametos, dado que

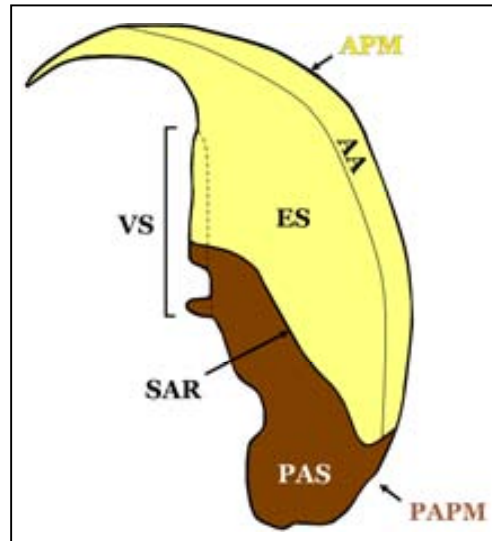


Figura 6.1.3. Esquema de los distintos compartimentos diferenciados en la región acrosómica (amarillo) y post-acrosómica (marrón) de la cabeza del espermatozoide de *M. musculus domesticus*. AA: acrosoma anterior; ES: segmento ecuatorial; PAS: lámina post-acrosómica; VS: crestas ventrales; APM: membrana plasmática acrosómica; PAPM: membrana plasmática post-acrosómica; SAR: anillo sub-acrosómico.

puede ser esencial para prevenir la fusión prematura de la APM con la membrana acrosómica externa y, por tanto, desencadenar una exocitosis acrosómica temprana (Selvaraj y col., 2009). Asimismo, dicha compartimentación podría adquirir un papel esencial en el proceso de capacitación, ya que la APM es el compartimento principal en el que se acumulan y segregan los esteroides y la albúmina necesarios para promover el



mecanismo sensibilizador del espermatozoide (Langlais y col., 1988; Ehrenwald y col., 1990).

#### 6.1.5. Objetivos

Atendiendo a la regionalización funcional y estructural existente en la cabeza del espermatozoide del ratón doméstico, se plantea como principal objetivo de este capítulo determinar, por primera vez, si la regionalización estructural y funcional de los componentes celulares genera modularidad variacional en la forma celular. A tal efecto, se han evaluado mediante el uso de la morfometría geométrica tres hipótesis que dividen la cabeza del espermatozoide en diversos módulos: i) acrosoma y post-acrosoma; ii) acrosoma anterior, segmento ecuatorial y post-acrosoma; y iii) acrosoma, post-acrosoma y crestas ventrales. Estas hipótesis se han probado en ejemplares de *M. musculus domesticus* con cariotipo estándar (St) procedentes del SRbB. Puesto que no cabe descartar la posibilidad de que las translocaciones Rb puedan ocasionar algún efecto sobre el mapa genotipo-fenotipo de la cabeza del espermatozoide y actuar, en consecuencia, como agentes promotores de variación, se ha determinado si estas mutaciones cromosómicas pueden alterar el patrón de covariación fenotípica propio de los gametos de los machos con cariotipo estándar.

## 6.2. Material y métodos

Para realizar el estudio de modularidad se han utilizado las imágenes de las cabezas de espermatozoides empleadas en los análisis correspondientes a los cambios de forma de dicha estructura expuestos en el Capítulo 5 de la presente memoria (véase Apéndice 3). Puesto que a través de dichos análisis se detectó un efecto del tamaño sobre la forma, no cabe descartar la posibilidad de que la alometría pueda influir en los posibles patrones de modularidad (Klingenberg, 2009). Con el objeto de eliminar el posible efecto de la alometría, los análisis de modularidad se han efectuado a partir de los residuales de la regresión



multivariante entre el CS y las coordenadas Procrustes de los dieciséis *landmarks* y tres *semilandmarks* bidimensionales considerados en el Capítulo 5.

Para determinar las regiones de la cabeza del espermatozoide con mayor variación morfológica, se efectuó un análisis de componentes principales (PCA) con la muestra estándar (St) (MorphoJ, Klingenberg, 2011). Posteriormente, se testaron tres hipótesis de modularidad basadas en criterios de estructuración de la membrana plasmática (Hip1), función específica durante la fecundación (Hip2) y composición citoesquelética (Hip3). A tal efecto, la cabeza del espermatozoide se dividió en las siguientes regiones (Fig. 6.2.1): Hip1) región acrosómica (*landmarks* y *semilandmarks*: 1-4, 14-19) y post-acrosómica (*landmarks*: 5-13); Hip2) acrosoma anterior (*landmarks* y *semilandmarks*: 15-19), segmento ecuatorial (*landmarks*: 1-4, 14) y región post-acrosómica (*landmarks*: 5-13); Hip3) acrosoma (*landmarks* y *semilandmarks*: 1, 2, 14-19), región post-acrosómica (*landmarks*: 9-13), y crestas ventrales (*landmarks*: 3-8).

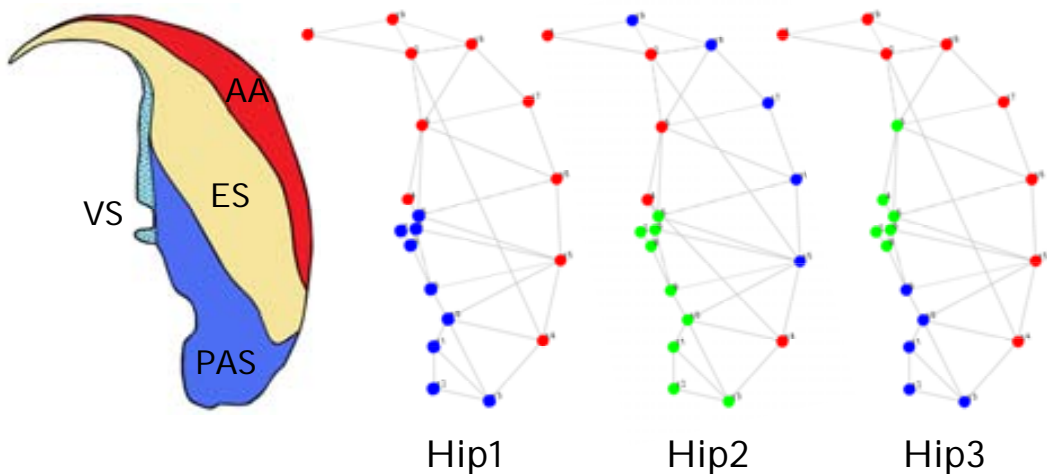


Figura 6.2.1. Diagrama de las tres hipótesis de modularidad consideradas (Hip1-Hip3). AA: acrosoma anterior; ES: segmento ecuatorial; PAS: lámina post-acrosómica; VS: crestas ventrales.



Estas hipótesis se probaron mediante el coeficiente *RV* (Escoufier, 1973), obtenido como medida de covariación entre conjuntos de *landmarks* y *semilandmarks*. Para estimar la significación de dicho coeficiente, se comparó el valor de *RV* de una hipótesis dada con la distribución de valores de dicho coeficiente correspondientes a 10.000 particiones aleatorias en los posibles conjuntos de *landmarks* y *semilandmarks* posibles. La obtención de un valor bajo de *RV* situado en la cola izquierda de la distribución se asumió como una partición significativa de los grupos de *landmarks* y *semilandmarks* seleccionados. Los subconjuntos de *landmarks* y *semilandmarks* espacialmente separados no se consideran como módulos reales debido a la falta de cohesión espacial que les proporciona su individualidad como módulos y porque la integración no puede darse entre unidades espacialmente separadas (Klingenberg, 2009; Martínez-Abadías y col., 2012). Por ello, se comparó el valor de *RV* obtenido en las tres hipótesis planteadas con todas las particiones alternativas presentes en los subconjuntos de *landmarks* y *semilandmarks* espacialmente contiguos.

Para evaluar un posible efecto de las translocaciones Rb sobre el patrón de integración de la cabeza del espermatozoide en los individuos St, se agruparon las muestras según el número diploide ( $2n$ ) y el grado de heterocigosis estructural (Ht) (véase el apartado de Material y métodos del Capítulo 5), comparándose los patrones de covariación entre grupos.

Con objeto de determinar el grado de coordinación fenotípica entre los módulos considerados en cada hipótesis, se llevó a cabo un análisis parcial de mínimos cuadrados en dos bloques (2B-PLS; Rohlf y Corti, 2000; Singh y col., 2012) sobre los animales St y los Rb con  $2n=(30-40)$ . Dicho análisis se repitió para el total de la muestra. Dado que la Hip3 fue la única hipótesis en la que se apreciaron diferencias significativas entre módulos (véase el apartado de Resultados), solamente se realizaron los 2B-PLS con los bloques de *landmarks* y *semilandmarks* considerados en este caso.



### 6.3. Resultados

Empleando la muestra St, se observó que el 10.9% de la variación morfológica observada en la cabeza del espermatozoide se debe a cambios en el tamaño de la célula ( $P < 0.001$ ). Esta variación de forma alométrica afectó a todos los *landmarks* y *semilandmarks* de manera similar, indicando cierto estrechamiento en la cabeza del gameto y divergencias en la longitud del proceso apical.

El PCA indicó que los 5 primeros componentes principales explicaron cerca del 70% de la variación de la forma de la cabeza del espermatozoide St (Tabla 6.3.1). Los cambios asociados al PC1 correspondieron al proceso apical y a la cara convexa de la cabeza del espermatozoide, mientras que la variación fenotípica respecto al PC2 afectó a las crestas ventrales y a la región post-acrosómica (Fig. 6.3.1).

Tabla 6.3.1. Valores propios, porcentajes de varianza y varianza acumulada en los 10 primeros componentes principales del PCA obtenidos a partir de los residuales del análisis de regresión múltiple de las coordenadas Procrustes sobre el logaritmo del CS.

PC	Valor propio	Varianza (%)	Acumulativo (%)
1	0.00133385	26.60	26.61
2	0.00109508	21.84	48.45
3	0.00053187	10.61	59.06
4	0.00037271	7.43	66.49
5	0.00032206	6.42	72.92
6	0.00024174	4.82	77.74
7	0.00020567	4.10	81.84
8	0.00017299	3.45	85.29
9	0.00014449	2.88	88.17
10	0.00013319	2.66	90.83

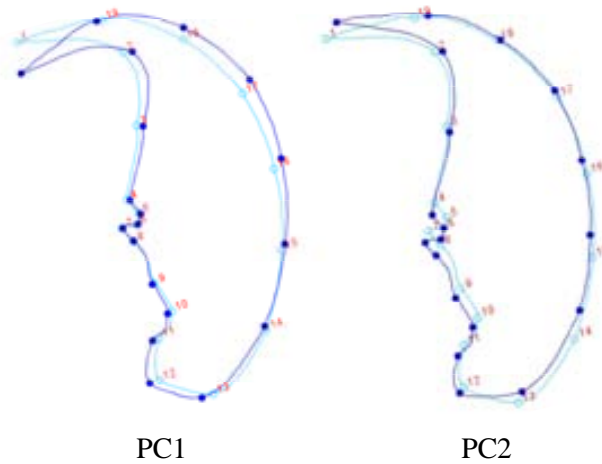


Figura 6.3.1. Diagrama de la variación de la forma de la cabeza del espermatozoide explicada por el PC1 y PC2 en la muestra St. El perfil en azul claro corresponde a la forma de referencia y el azul oscuro a la forma final.

En los individuos St, los coeficientes *RV* mostraron un grado de covariación relativamente bajo entre las distintas regiones de la cabeza del espermatozoide (Fig. 6.3.2). No obstante, al comparar los conjuntos de valores *RV* con las distribuciones permutacionales, tanto con particiones aleatorias como contiguas, la única hipótesis estadísticamente significativa fue la Hip3 (Fig. 6.3.2). Los valores del coeficiente *RV* obtenidos en las muestras relativas al 2n, Ht y total de la muestra presentaron un patrón de modularidad similar al St, siendo la Hip3 la única hipótesis significativa (Tabla 6.3.2).

Los valores del coeficiente *RV* obtenidos en los análisis 2B-PLS indicaron una leve asociación entre subconjuntos de *landmarks* y *semilandmarks* en la Hip3 (Tabla 6.3.3). No obstante, los porcentajes de covariación explicados por los primeros ejes PLS en las comparaciones en dos bloques fueron substancialmente elevados, especialmente entre la región post-acrosómica y las crestas ventrales (Tabla 6.3.3). El análisis detallado entre los espermatozoides procedentes de animales con fusiones Rb y de ejemplares St mostró diferencias en el grado de covariación entre bloques. Concretamente en los espermatozoides de los individuos Rb, se detectó una disminución en los valores de *RV* y los porcentajes de covariación relativos al PLS1 entre la región acrosómica y las crestas ventrales (AC vs VS), así como entre estas últimas y la región post-acrosómica (PA vs VS) (Tabla 6.3.3).

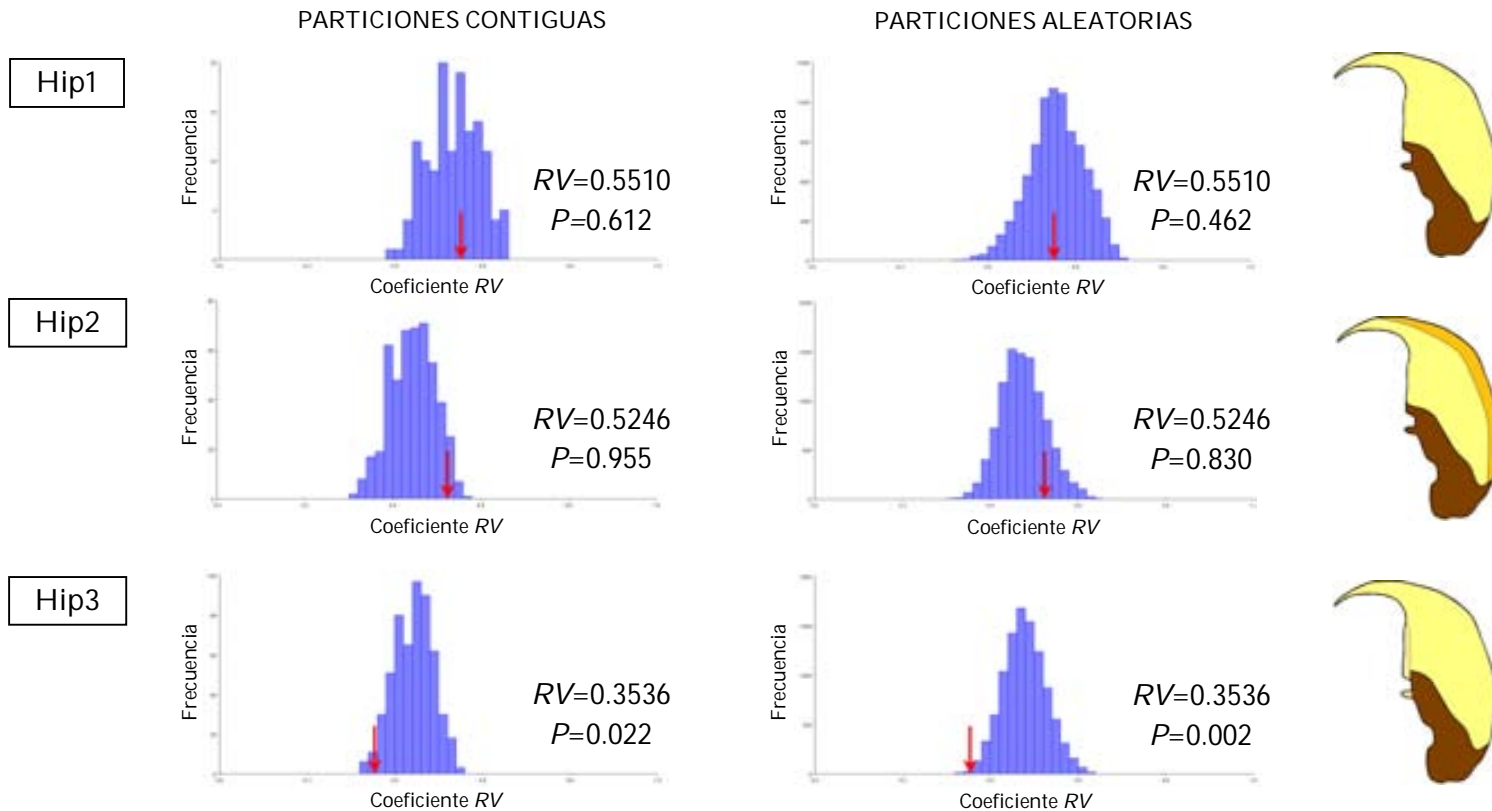


Figura 6.3.2. Distribuciones permutacionales del coeficiente  $RV$  correspondientes a las particiones contiguas y aleatorias para las tres hipótesis de modularidad probadas (Hip1, Hip2, Hip3) en la muestra St. La flecha indica la posición del coeficiente  $RV$  de la partición considerada. Se indica en cada caso el valor del coeficiente  $RV$  y la probabilidad asociada ( $P$ ).



Tabla 6.3.2. Coeficientes *RV* y valores de probabilidad (*P*) obtenidos en las tres hipótesis de modularidad (Hip1, Hip2 y Hip3) consideradas. a) atendiendo al número diploide [St, Estándar; Rb(38-40); Rb(33-37); Rb(30-32)]; b) en relación al grado de heterocigosis (AA; H1; H2; H3; MM).

a)

		Rb(38-40)		Rb(33-37)		Rb(30-32)		Total	
		<i>RV</i>	<i>P</i>	<i>RV</i>	<i>P</i>	<i>RV</i>	<i>P</i>	<i>RV</i>	<i>P</i>
Hip1	C		0.306		0.470		0.261		0.336
	A	0.4395	0.139	0.4847	0.338	0.5067	0.168	0.4497	0.336
Hip2	C		0.916		0.919		0.921		0.921
	A	0.4312	0.716	0.4725	0.784	0.5167	0.761	0.4516	0.765
Hip3	C		0.011		0.020		0.049		0.015
	A	0.2704	<0.001	0.2809	0.001	0.3531	0.006	0.2716	<0.001

b)

		AA		H1		H2		H3		MM	
		<i>RV</i>	<i>P</i>	<i>RV</i>	<i>P</i>	<i>RV</i>	<i>P</i>	<i>RV</i>	<i>P</i>	<i>RV</i>	<i>P</i>
Hip1	C		0.366		0.537		0.411		0.231		0.417
	A	0.4781	0.211	0.6054	0.454	0.4716	0.292	0.4783	0.236	0.5423	0.202
Hip2	C		0.918		0.963		0.890		0.817		0.811
	A	0.4688	0.762	0.5906	0.911	0.4532	0.734	0.4798	0.749	0.5305	0.558
Hip3	C		0.005		0.075		0.042		0.042		0.061
	A	0.2796	<0.001	0.3488	0.002	0.3110	0.009	0.0331	0.010	0.3430	0.003

C: particiones contiguas; A: particiones aleatorias.



Tabla 6.3.3. Resultados de los análisis 2B-PLS en Hip3.

	2B-PLS	<i>RV</i>	<i>P</i>	% Total Cov PLS1	Corr PLS1	<i>P</i>
St	AC vs PA	0.0212	0.041	58.8	0.246	0.138
	AC vs VS	0.0409	0.050	65.6	0.329	0.006
	PA vs VS	0.0491	0.016	90.3	0.258	0.076
Rb	AC vs PA	0.0238	0.007	57.1	0.214	0.002
	AC vs VS	0.0251	0.001	56.7	0.284	<0.001
	PA vs VS	0.0221	0.003	59.1	0.219	0.001
Total	AC vs PA	0.0227	<0.001	58.1	0.205	<0.001
	AC vs VS	0.0180	0.002	57.1	0.205	<0.001
	PA vs VS	0.0493	<0.001	89.7	0.261	<0.001

*RV*: Coeficiente *RV* entre bloques comparados; % Total Cov PLS1: porcentaje del total de covariación explicada por el PLS1; Corr PLS1: correlación entre las puntuaciones 2B-PLS1; *P*: significación asociada al coeficiente *RV* y a la Corr PLS1; AC: módulo acrosómico; PA: módulo post-acrosómico; VS: módulo de las crestas ventrales.

## 6.4. Discusión

El análisis morfológico de la cabeza del espermatozoide mediante la aplicación combinada de la microscopía electrónica y la morfometría geométrica ha permitido poner de manifiesto, por primera vez, la existencia de modularidad variacional a escala celular. Esta modularidad ha sido detectada empleando tanto datos corregidos como no corregidos para la alometría, lo que indica que los cambios de forma asociados al tamaño no juegan un papel relevante en los patrones de integración morfológica de la cabeza del espermatozoide.

Entre todas las hipótesis de modularidad planteadas, solamente la división basada en la composición citoesquelética de la PT (Hip3) fue estadísticamente significativa, resultado que sugiere que la organización modular en la cabeza del espermatozoide está directamente asociada a cambios estructurales del citoesqueleto. Esta circunstancia es concordante con los resultados obtenidos en diversos estudios que señalan que la heterogeneidad en la composición de la



PT juega un papel fundamental en la morfogénesis del gameto y en el mantenimiento de la forma de la cabeza del espermatozoide maduro (Korley y col., 1997; Toshimori y Ito, 2003) ya que se encuentra ligada a la organización funcional de la célula y a la subdivisión del plasmalema (Oko y col., 1990; Selvaraj y col., 2006, 2009). Contrariamente, la división de la cabeza del espermatozoide en relación a sus tres regiones funcionales principales (Hip2) no se traduce en la existencia de un patrón de modularidad significativo. De hecho, los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que el acrosoma anterior y el segmento ecuatorial se comportan como una unidad integrada, mientras que la región post-acrosómica y las crestas ventrales presentan un cierto grado de autonomía.

Los análisis por grupos cromosómicos demostraron la existencia de un patrón de covariación entre módulos semejante al obtenido para el conjunto de la muestra indicando que la presencia de translocaciones Rb no altera de manera significativa el patrón de modularidad St. Este hecho concuerda con algunos estudios de integración morfológica que sugieren que los patrones de covariación fenotípica tienden a ser relativamente estables tanto entre poblaciones (González-José y col., 2004) como entre especies cercanas (Marroig y Cheverud, 2001), dado que cabe esperar que los mecanismos de selección minimicen la aparición de modificaciones morfológicas que disminuyan la eficiencia funcional de las estructuras (Morrow y Gage, 2001; Renaud y col., 2012). No obstante, en el presente estudio, los análisis de PLS sugieren un cierto efecto de las reorganizaciones cromosómicas sobre el grado de covariación entre bloques. Pese a que los valores de *RV* indicaron una leve asociación entre pares de módulos en todos los casos, los PLS correspondientes a la muestra St revelaron que gran parte de la covariación detectada en la cabeza del espermatozoide corresponde a regiones morfológicas concretas; esto puede apreciarse de manera especial en el contraste VS-PA, en el que el primer PLS explica más del 90% de la covariación. Tales resultados sugieren que la coordinación existente entre dichas regiones podría depender de la compartimentación estructural descrita en la membrana plasmática, ya que la



APM se encuentra parcialmente vinculada a la cresta ventral superior y al acrosoma, y que la PAPM está sujeta principalmente a la cresta ventral inferior y a la región post-acrosómica (Selvaraj y col., 2006, 2009). A tal efecto, es probable que dicha compartimentación ejerza un cierto papel en el diseño de la cabeza del espermatozoide, en primer lugar, estableciendo una clara diferenciación entre el dominio acrosómico y el post-acrosómico (Selvaraj y col., 2006, 2009) y, en segundo lugar, vinculando las regiones citoesqueléticas semi-independientes comprendidas en cada uno de dichos dominios. Si bien los análisis efectuados demuestran que la división de la cabeza del espermatozoide en un módulo acrosómico y otro post-acrosómico (Hip1) no es estadísticamente significativa, dicha hipótesis presentó un valor de  $RV$  menor que en la mayoría de particiones alternativas. Este hecho indica cierta contribución de la membrana plasmática en la diferenciación de un dominio acrosómico y otro post-acrosómico en la estructura analizada. Contrariamente, los análisis PLS aplicados a los espermatozoides de los individuos Rb mostraron valores de  $RV$  y porcentajes de covariación relativos al PLS1 homogéneos e inferiores a los St en las tres combinaciones de bloques contrastadas. Estos resultados apuntan a que las translocaciones Rb pueden alterar los patrones de covariación fenotípica de la cabeza del espermatozoide, ocasionando cierta disminución en el grado de interrelación entre módulos. Estudios sobre co-adaptación genómica en híbridos han demostrado que la presencia de fusiones cromosómicas puede inducir cambios en los patrones de covariación morfológica mediante la alteración de los patrones de ligamiento y de las interacciones epistáticas entre genes que participan en el desarrollo de módulos distintos (Alibert y Auffray, 2003; Sans-Fuentes y col., 2009). En concordancia con estas observaciones, la variabilidad fenotípica apreciada en las crestas ventrales y en la región post-acrosómica en los espermatozoides de individuos Rb procedentes de la zona de estudio (véase Capítulo 5) sugieren cierto efecto de las fusiones Rb sobre la expresión y regulación de proteínas esenciales para la morfogénesis de los gametos Rb. Todo ello parece indicar que la variación morfológica asociada a alteraciones en la síntesis de proteínas citoesqueléticas o en la reestructuración



del mapa genotipo-fenotipo son factores que pueden implicar cambios en los patrones de covariación de los compartimentos modulares de la cabeza del espermatozoide de *M. musculus domesticus*. No obstante, el efecto que el número y tipo de reorganizaciones cromosómicas puedan ejercer sobre la compartimentación espermática, así como las repercusiones que dichas modificaciones puedan tener sobre la biología y el potencial reproductivo de los animales Rb, son aspectos todavía por dilucidar.

En conclusión, los resultados expuestos en este capítulo demuestran por vez primera la existencia de modularidad variacional a escala unicelular, apoyando el papel relevante del citoesqueleto y la compartimentación de la membrana plasmática en la morfología de la cabeza del espermatozoide de *M. musculus domesticus*. La presencia de translocaciones Rb no comporta modificaciones relevantes en el patrón general de integración morfológica de la estructura. No obstante, estas mutaciones cromosómicas pueden influir sobre el grado de interrelación entre subunidades, ocasionando cierta disminución en los valores de covariación fenotípica entre pares de módulos. Las implicaciones que, a escala evolutiva, tiene el efecto de la heterogeneidad estructural sobre la organización modular de la cabeza del espermatozoide en sistemas Rb de ratón doméstico constituyen una cuestión de gran interés que deberá ser dilucidada en futuras investigaciones.



# **Discusión general**

---



La fijación y propagación geográfica de las fusiones Rb han sido considerados mecanismos esenciales en los procesos de especiación cromosómica en mamíferos (Holmquist y Dancis, 1979; Nachman y Searle, 1995). Estas mutaciones han sido detectadas frecuentemente en diversas especies de mamíferos, tales como *Thomomys talpoides* (Thaeler, 1974), *Spalax ehrenbergi* (Nevo y Bar-El, 1976), *Geomys bursarius* (Patton y col., 1980), *Sorex araneus* (Searle, 1986) o *Mus musculus* (Bauchau, 1990), circunstancia que ha permitido analizar el efecto de estas reordenaciones cromosómicas sobre las características morfológicas, genéticas y reproductivas de los híbridos resultantes del apareamiento de individuos con distinto cariotipo. Si bien la presencia de translocaciones Rb se ha asociado a la disminución de la fertilidad y/o viabilidad en los híbridos, los mecanismos implicados en estos procesos son todavía poco conocidos. El SRbB de *M. musculus domesticus* constituye un modelo interesante para estudiar estos aspectos puesto que en él se ha detectado una amplia gama de cariotipos ( $2n=29-40$ ), la distribución geográfica de los metacéntricos es clinal y escalonada, y no existe una raza cromosómica propia de la zona. Aunque la información publicada hasta el momento indica que el flujo génico entre las poblaciones Rb y St no se halla interrumpido de forma severa en este sistema (Gündüz y col., 2001; Sans-Fuentes y col., 2010), la ausencia de grandes cambios en la estructura de la zona a lo largo de una década, detectada en la presente investigación, revela la existencia de un cierto grado de aislamiento reproductivo entre ciertas poblaciones con distinto rango cariotípico. Según se ha argumentado en diversos estudios (véase, por ejemplo, Navarro y Barton, 2003), las fusiones Rb pueden actuar como barrera de aislamiento a dos niveles: i) por reducción de la fertilidad en los heterocigotos estructurales debido, principalmente, a la producción de aberraciones meióticas (Wallace y col., 1991, 1992; Wallace y Searle, 1994; Hauffe y Searle, 1998); y ii) por supresión de la recombinación genética en los cromosomas metacéntricos (Rieseberg, 2001; Noor y col., 2001; Navarro y Barton, 2003). Por lo que respecta al primer aspecto, varias investigaciones sobre la fertilidad de los machos de *M. musculus domesticus* han puesto de manifiesto que la presencia



de múltiples configuraciones trivalentes ocasiona apareamientos meióticos defectuosos, comportando un aumento substancial en la tasa de mortalidad de células germinales (Winking y col., 1988; Britton-Davidian y col., 1990; Wallace y col., 1992; Merico y col., 2003, 2008; Manterola y col., 2009). Bajo estas condiciones, la menor producción de gametos en los híbridos heterocigotos puede conferir a estos individuos una notable desventaja reproductiva, circunstancia que, a su vez, puede dar lugar a la aparición de una barrera parcial al flujo génico entre razas cromosómicas (Redi y col., 1985). Según se ha observado en diversos sistemas Rb de ratón doméstico, la presencia de un número relativamente elevado de configuraciones trivalentes simples favorece el aislamiento reproductivo entre razas cromosómicas (Wallace y col., 1992; Saïd y col., 1993; Hauffe y Searle, 1998). Los resultados aquí obtenidos sobre el SRbB indican que, si bien existen ciertas alteraciones meióticas y post-meióticas asociadas a la presencia de trivalentes, las fusiones Rb en heterocigosis no incrementan de manera drástica la muerte germinal en el epitelio seminífero. Este hecho permite sugerir que la selección no actúa de forma severa en contra de los heterocigotos, permitiendo el mantenimiento del flujo génico dentro del sistema Rb. No obstante, cabe precisar que ninguno de los individuos utilizados en los análisis de muerte germinal presentaba más de tres fusiones en heterocigosis.

El segundo proceso que puede actuar como barrera al flujo génico entre poblaciones St y Rb es la supresión de la recombinación en cromosomas metacéntricos. La pérdida de heterocromatina centromérica en los autosomas durante la formación de los metacéntricos (Yamamoto y Miklos, 1978; Choo, 1998; Dumas y Britton-Davidian, 2002) y la reorganización espacial anómala de los cromosomas durante la profase I (John, 1990; Roeder, 1990; Zickler y Kleckner, 1999) pueden ocasionar irregularidades en el patrón de segregación entre cromosomas homólogos. Estas alteraciones provocan la disminución de las tasas de recombinación en aquellas configuraciones que presentan cromosomas metacéntricos y modifican los grupos de ligamiento de los loci próximos al centrómero (Burt, 2000; Rieseberg, 2001; Dumas y Britton-





Davidian, 2002; Manterola y col., 2009). En el SRbB la notable señalización apoptótica observada en espermátocitos en fase de paquiteno y el retraso del estadio I en los individuos con  $2n$  bajos son indicativos de irregularidades en el proceso de intercambio genético. Estas observaciones concuerdan con resultados preliminares sobre recombinación en animales de este mismo sistema (Capilla y Ruiz-Herrera, *in verbis*), que indican la existencia de un número significativamente menor de nódulos de recombinación en los cromosomas metacéntricos y una cierta tendencia a la redistribución espacial de las regiones de intercambio genético hacia los extremos terminales de los cromosomas. Estos resultados permiten sugerir que la variación en el patrón de recombinación en regiones genómicas ligadas a caracteres de fertilidad podría ocasionar alteraciones en la producción de células germinales y la fijación de diferencias genéticas en loci específicos (Winking y col., 1988; Coyne y Orr, 2004; Turner y col., 2011; White y col., 2012). Puesto que los genes implicados en el proceso de regulación y citodiferenciación gamética en el ratón doméstico son numerosos (Matzuk y Lamb, 2002), la variación en las tasas de recombinación asociada a las translocaciones Rb (Rieseberg, 2001; Castiglia y Capanna, 2002; Dumas y Britton-Davidian, 2002; Wallace y col., 2002) podría propiciar la aparición de relaciones epistáticas negativas entre estos genes en los individuos con múltiples fusiones Rb (Rieseberg y col., 2001). Esta hipótesis sería concordante con la notable incidencia apoptótica y la presencia de alteraciones morfológicas, tanto en espermátidas como en espermatozoides maduros, apreciada en los individuos del SRbB portadores de un mayor número de translocaciones. No obstante, la detección de cierta variación interindividual en el total de muestras analizadas sugiere que la magnitud de las alteraciones ocurridas a lo largo del proceso gametogénico depende del tipo de alelos fijados en los metacéntricos (Winking, 1986; Winking y col., 1988; Coyne y Orr, 2004) y de las relaciones epistáticas entre éstos (Turner y col., 2011; White y col., 2012).

La presencia de irregularidades durante la espermatogénesis en un individuo puede limitar notablemente la calidad y cantidad de esperma eyaculado,



comportando, en consecuencia, un menor éxito reproductivo frente a otros competidores. Diversas características de los espermatozoides, tales como el tamaño (Simmons y col., 2003; Gage y col., 2004; Gómez-Montoto y col., 2011), la morfología (Lessard y col., 2007; Firman y col., 2010), la viabilidad (Hunter y Birkhead, 2002), la motilidad o la velocidad (Gage y col., 2004; Gómez-Montoto y col., 2011) de los espermatozoides resultan esenciales en este sentido (Roldán y col., 1992). El análisis de espermatozoides epididimales ha revelado la existencia de diversas anomalías morfológicas en los espermatozoides de individuos Rb, tanto en la región de la cabeza (desaparición del proceso apical y/o de las crestas ventrales, flexión de la cabeza, prolongación excesiva de la región post-acrosómica, etc.) como en el flagelo (presencia de dobles colas, bifurcaciones y pliegues en la región proximal, etc.). Asimismo, se han apreciado diferencias significativas en la forma, tamaño y grado de covariación fenotípica en la cabeza del espermatozoide entre los individuos con cariotipo St y los portadores de translocaciones Rb. Si bien se ha sugerido que parte de la variación morfológica detectada en los espermatozoides es debida a la existencia de gametos seniles o inmaduros en el eyaculado (Humphreys, 1972), Cohen (1973b) asoció esta variabilidad a la producción de errores durante la espermatogénesis. Estudios posteriores, realizados en híbridos obtenidos del cruce entre distintas subespecies de *M. musculus*, indican que diversos tipos de anomalías espermáticas (como, por ejemplo, el pliegue proximal del flagelo, la ausencia de cabeza o flagelo o la presencia de cabezas amorfas) presentan QTL asociados al extremo terminal del cromosoma X que, a su vez, se asocian a QTLs autosómicos en los cromosomas 2, 5, 9 y 10 (Oka y col., 2007; Turner y col., 2011; White y col., 2012). Asimismo, la presencia de variaciones en la longitud del proceso apical o la amplitud de la cabeza del espermatozoide se atribuye a loci situados en los cromosomas Y (Styrna y col., 1991, 2002; Styrna y Krzanowska, 1995), 11 (Oka y col., 2007), 4, 7 y X (White y col., 2012). Teniendo en cuenta que en los espermatozoides de los animales Rb de la zona de estudio se han apreciado alteraciones morfológicas similares a las descritas en estos trabajos y que la mayoría de autosomas están implicados en la formación de



metacéntricos, es posible que un cambio en la reestructuración del mapa genotipo-fenotipo vaya asociado a la aparición de anomalías gaméticas. Si bien los resultados aquí obtenidos podrían ser indicativos una cierta desventaja reproductiva de los machos Rb en relación a los St, la notable estabilidad de la estructura del SRbB a lo largo del periodo considerado, así como la información aportada por los diversos estudios morfológicos efectuados sobre este sistema (Muñoz-Muñoz y col., 2003; Muñoz-Muñoz y col., 2006; Muñoz-Muñoz y col., 2009; Sans-Fuentes y col., 2009; Muñoz-Muñoz y col., 2011), indican que la variación del potencial reproductivo de dichos individuos no es lo suficientemente importante como para impedir de manera significativa el flujo génico dentro de este sistema Rb.

Generalmente se ha argumentado que las barreras prezigóticas son más efectivas evitando el flujo génico que las barreras postzigóticas debido a que las primeras actúan antes en el proceso de aislamiento reproductivo (Coyne y Orr, 2004; Schemske, 2010). No obstante, algunos autores (Turner y col., 2011) sugieren que las barreras prezigóticas podrían ser insuficientes para mantener el aislamiento en los estadios tempranos de especiación cuando se observa un emparejamiento no selectivo entre subespecies y persistencia de la zona híbrida. Este hecho apunta a que posiblemente en el SRbB estén actuando de manera simultánea barreras de aislamiento pre y postzigótico. Puesto que estudios previos han detectado un cierto efecto desestabilizador de las translocaciones Rb en el desarrollo de estructuras osteológicas complejas, como el cráneo o la mandíbula (Muñoz-Muñoz y col., 2006; Sans-Fuentes y col., 2009), es posible que ciertas barreras postzigóticas puedan ser importantes en la interrupción al flujo génico dentro de este sistema Rb (Sage y col., 1986; Moulia y col., 1991, 1993; Derothe y col., 2001; Britton-Davidian y col., 2005).

### Perspectivas futuras

Las investigaciones efectuadas en el marco de la presente tesis doctoral han aportado la primera información sobre la dinámica espacio-temporal de la zona



de polimorfismo robertsoniano 'Barcelona' de *M. musculus domesticus* e incrementado el nivel de conocimientos sobre el potencial reproductivo de los machos de este sistema Rb. Los resultados obtenidos han permitido además poner de manifiesto toda una serie de nuevas cuestiones que deberán ser dilucidadas en futuros estudios. La detección de animales con cariotipo estándar en el centro de la zona de polimorfismo sugiere la existencia de procesos de introgresión genética en el sistema, hipótesis que deberá ser comprobada a través de análisis moleculares. Asimismo, el análisis de QTLs asociados a la fertilidad de los machos y la realización de estudios inmunológicos que permitan evaluar el grado de expresión de moléculas involucradas en procesos apoptóticos podrían esclarecer algunas de las cuestiones que han surgido con el desarrollo de la presente tesis. Si bien las translocaciones Rb alteran la forma de la cabeza del espermatozoide en los animales de la zona de estudio, parece probable que estas mutaciones puedan tener también un efecto sobre la morfología de otras partes de este gameto. En este sentido, estudios de carácter comparados sobre la morfología del flagelo, la pieza media o el núcleo del espermatozoide podrían proporcionar valiosa información sobre el efecto que las fusiones Rb pueden ejercer sobre el potencial fertilizador en el ratón doméstico.

Los resultados expuestos en esta memoria sobre la variación de forma y tamaño de la cabeza del espermatozoide y la existencia de modularidad variacional a este nivel induce a realizar estudios semejantes en otros sistemas Rb de *M. musculus domesticus* en los que existan híbridos entre razas cromosómicas y en los que se registre un mayor grado de heterocigosis estructural. Los resultados obtenidos en estos estudios permitirían evaluar en qué medida las fusiones Rb pueden alterar los patrones morfológicos y de modularidad aquí expuestos. Por último valga señalar que ya en un ámbito más general, la aplicación de la morfometría geométrica a imágenes de SEM, puesta a punto por primera vez en esta tesis, constituye también una propuesta interesante para realizar comparaciones sobre la morfología espermática a escala interespecífica, útiles para la obtención de conclusiones de distinto orden.



# **Conclusiones**

---



1. El análisis de la dinámica espacial y temporal de la zona de polimorfismo robertsoniano 'Barcelona' de *Mus musculus domesticus* indica que el centro geográfico del polimorfismo no ha cambiado entre los periodos 1996-2000 y 2008-2010 y corrobora la ausencia de una raza cromosómica propia de esta zona.
  
2. El aumento del número diploide medio por localidad y del grado de heterocigosis global en el centro de la zona de polimorfismo, así como la homogeneización en el grado de subdivisión poblacional registrado entre los dos periodos estudiados, sugieren que la introgresión de animales hacia el centro del sistema robertsoniano podría estar alterando las frecuencias de metacéntricos esperadas.
  
3. Si bien se ha producido el desplazamiento de los centros de algunas clinas entre los dos periodos considerados, el patrón de distribución escalonado del sistema se ha mantenido estable. De este modo, aunque factores de origen antrópico pueden haber provocado algún desequilibrio puntual en la estructura de la zona, las barreras al flujo génico no han sufrido cambios significativos.
  
4. No se ha detectado un descenso drástico de la fertilidad en los animales con una, dos o tres fusiones robertsonianas en heterocigosis. Pese a ello, la escasez de individuos con más de cinco translocaciones en heterocigosis indica que la selección podría actuar en contra de este tipo de individuos.
  
5. Los ejemplares con un número diploide reducido presentan un mayor número de anomalías en la espermatogénesis, resultado que apunta a las translocaciones robertsonianas como un factor importante en el establecimiento de barreras al flujo génico dentro de la zona de estudio.



6. La elevada incidencia apoptótica en espermatoцитos en fase de paquiteno y el retraso en el estadio I del epitelio seminífero en individuos robertsonianos indica la presencia de irregularidades durante la recombinación meiótica en los cromosomas metacéntricos. Puesto que estas alteraciones se asocian a cambios en los patrones de ligamiento genético en los animales portadores de fusiones robertsonianas, la presencia de estas mutaciones podría acelerar el proceso de divergencia genética dentro del sistema.

7. Las translocaciones robertsonianas provocan cambios en la forma y el tamaño de la cabeza del espermatozoide en los individuos de la zona de estudio. Las causas de estas modificaciones podrían ser debidas a variaciones en la compleja base genética de esta estructura.

8. De las distintas hipótesis de modularidad contrastadas en la cabeza del espermatozoide en *M. musculus domesticus*, cabe aceptar que esta estructura se divide en tres módulos variacionales (acrosoma, post-acrosoma y crestas ventrales), que se ajustan a las principales regiones citoesqueléticas diferenciadas en la teca perinuclear.

9. Si bien las fusiones robertsonianas no afectan al patrón de modularidad de la cabeza del espermatozoide, la presencia de reordenaciones cromosómicas tiene un cierto efecto sobre los coeficientes de covariación entre módulos. Este resultado sugiere que las fusiones pueden reestructurar el mapa genotipo-fenotipo de la cabeza del espermatozoide comportando cambios en el grado de coordinación entre módulos.



# **Bibliografía**

---

---





- Adolph S y Klein J. 1981. Robertsonian variation in *Mus musculus* from central Europe, Spain, and Scotland. *J. Hered.* 72: 219-221.
- Alibert P y Auffray JC. 2003. Genomic coadaptation, outbreeding depression, and, developmental stability. En: *Developmental stability. Causes and consequences* (M Polak ed.), pp. 116-134. Oxford University Press, New York.
- Alibert P, Fel-Clair F, Manolakou K, Britton-Davidian J y Auffray JC. 1997. Developmental stability, fitness, and trait size in laboratory hybrids between European subspecies of the house mouse. *Evolution* 51: 1284-95.
- Auffray JC, Marshall JT, Thaler L y Bonhomme F. 1990. Focus nomenclature of European species of *Mus*. *Mouse Genet.* 88: 7-8.
- Austin CR y Bishop MWH. 1958. Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proc. Roy. Soc. B.* 149: 234-240.
- Avella MA y Dean J. 2011. Fertilization with acrosome-reacted mouse sperm: implications for the site of exocytosis. *PNAS* 50: 19843-19844.
- Baker RJ y Birkham W. 1986. Speciation by monobranched centric fusions. *PNAS* 83: 8245-8248.
- Baker SM, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, Elliot EA, Yu J, Ashley T, Arnheim N, Flavell RA y Liskay RM. 1995. Male-mice defective in the DNA mismatch repair gene *pms2* exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* 82: 309-319.
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T y Liskay RM. 1996. Involvement of mouse *mlh1* in DNA mismatch repair and meiotic crossing-over. *Nat. Genet.* 13: 336-342.



- Ballenger L. 1999. "*Mus musculus*" (On-line). Animal diversity web: [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus\\_musculus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus_musculus.html)
- Barton NH. 1979. Gene flow past a cline. *Heredity* 43: 333-339.
- Barton NH y Hewitt GM. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16: 113-148.
- Barton NH y Gale KS. 1993. Genetic analysis of hybrid zones. En: *Hybrid zones and the evolutionary process* (RG Harrison ed.), pp. 13-45. Oxford University Press, New York.
- Bauchau V. 1990. Phylogenetic analysis of the distribution of chromosomal races of *Mus musculus domesticus* (Rutty) in Europe. *Biol. J. Lin. Soc.* 41: 171-192.
- Bauchau V, Smest S, Viroux MC, Nootens D y Caritat L. 1990. Robertsonian translocations in free-living populations of the house mouse in Belgium. *Biol. J. Lin. Soc.* 41: 193-201.
- Bedford JM. 1998. Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol. Reprod.* 59: 1275-1287.
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L y Bonhomme F. 1996-1998. *GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire du Génome et Populations, CNRS UPR 9060. Université de Montpellier II: Montpellier, France.
- Bidau CJ, Giménez MD, Palmer CL y Searle JB. 2001. The effects of Robertsonian fusions on chiasma frequency and distribution in the house mouse (*Mus musculus domesticus*) from a hybrid zone in northern Scotland. *Heredity* 87: 305-13.



- Bitgood MJ, Shen LY y McMahon AP. 1996. Sertoli-cell signalling by desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* 6: 298-304.
- Blows MW. 1993. The genetics of central and marginal populations of *Drosophila serrata*. II. Hybrid breakdown in fitness components as a correlated response to selection for desiccation resistance. *Evolution* 47: 1271-85.
- Boise LH, González-García M y Postema CE. 1993. Bcl-X and Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 597-608.
- Boise LH, Gottschalk AR, Quintns J y Thompson CB. 1995. Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 200: 107-112.
- Bookstein FL. 1991. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press, UK.
- Boursot P, Auffray JC, Britton-Davidian J y Bonhomme F. 1993. The evolution of house mice. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 119-152.
- Bousquet J, Strauss SH y Li P. 1992. Complete congruence between morphological and R & L-based molecular phylogenies in birches and related species (Betulaceae). *Mol. Biol. Evol.* 9: 1076-1088.
- Braden AWH. 1958. Strain differences in the morphology of the gametes of the mouse. *Austral. J. Biol. Sci.* 12: 65-71.
- Breed WG. 1984. Variation in sperm morphology in the Australian rodent genus, *Pseudomys* (Muridae). *Cell. Tissue Res.* 229: 661-625.



- Breed WG, Idriss D y Oko RJ. 2000. Protein composition of the ventral processes on the sperm head of Australian Hydromyine rodents. *Biol. Reprod.* 63: 629-634.
- Breed WG. 2004. The spermatozoon of eurasian murine rodents: its morphological diversity & evolution. *J. Morphol.* 261: 52-69.
- Breed WG. 2005. Evolution of the spermatozoon in Murid rodents. *J. Morphol.* 265: 271-290.
- Britton-Davidian J, Nadeau JH, Croset H y Thaler L. 1989. Genic differentiation and origin of Robertsonian populations of the house mouse (*Mus musculus domesticus*, Rutty). *Genet. Res.* 53: 29-44.
- Britton-Davidian J, Sonja H, Catalan J y Cattaneo-Berrebei G. 1990. Robertsonian heterozygosity in wild mice: fertility and transmission rates in Rb(16.17) translocation heterozygotes. *Genetica* 80: 171-174.
- Britton-Davidian J, Catalan J, Ramalinho MD, Ganem G, Auffray JC, Capela R, Biscoito M, Searle JB y Mathias MD. 2000. Environmental genetics-rapid chromosomal evolution in island mice. *Nature* 403: 158.
- Britton-Davidian J, Catalan J, Ramalinho MD, Auffray JC, Claudia NA, Gazave E, Searle JB y Mathias MD. 2005. Chromosomal phylogeny of Robertsonian races of the house mouse on the island of Madeira: testing between alternative mutational processes. *Genet. Res.* 86: 171-183.
- Brooker P. 1982. Robertsonian translocations in *Mus musculus* from NE Scotland and Orkney. *Heredity* 48: 305-309.
- Buggs RJA. 2007. Empirical study of hybrid zone movement. *Heredity* 99: 301-312.



- Bull CM y Burzacott D. 2001. Temporal and spatial dynamics of a parapatric boundary between two Australian reptile ticks. *Mol. Ecol.* 10: 639-648.
- Burgio G, Baylac M, Heyer E y Montagutelli X. 2012. Exploration of the genetic organization of morphological modularity on the mouse mandible using a set of interspecific recombinant congenic strains between C57BL/6 and mice of the *Mus spretus* species. *G3 J.* DOI: 10.1534/g3.112.003285.
- Burt A. 2000. Sex, recombination, and the efficacy of selection—was Weismann right? *Evolution* 54: 337-351.
- Cabrero J, Shapiro LH y Camacho JPM. 1999. Male sterility in interspecific meadow katydid hybrids. *Hereditas* 131: 79-82.
- Calvino-Fernández M y Parra-Cid T. 2010. *H. pylori* and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 102: 41-50.
- Cámara MD y Pigliucci M. 1999. Mutational contributions to genetic variance-covariance matrices: an experimental approach using induced mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution* 53: 1692-703.
- Capanna E, Civitelli MV y Cristaldi M. 1974. Una popolazione appenninica di *Mus musculus* L. caratterizzata da un cariotipo a 22 cromosomi. *Atti della Accademia Nazionale Dei Lincei. Rendiconti della Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali Serie VIII*: 981-984.
- Capanna E, Gropp A, Winking H, Noack G y Civitelli MV. 1976. Robertsonian metacentrics in the house mouse. *Chromosoma* 58: 341-353.
- Capanna E, Civitelli MV y Cristaldi M. 1977. Chromosomal rearrangement, reproductive isolation and speciation in mammals. The case of *Mus musculus*. *Bol. Zool.* 44: 213-246.



- Capanna E. 1982. Robertsonian numerical variation and animal speciation: *Mus musculus*, an emblematic model. En: *Mechanisms of Speciation* (C Barrigozi ed.), pp. 155-177. Alan R. Liss, New York.
- Capanna E y Redi CA. 1995. Whole-arm reciprocal translocation (WART) between Robertsonian chromosomes: finding of a Robertsonian heterozygous mouse with karyotype derived through WARTs. *Chromosome Res.* 3: 59-65.
- Castiglia R y Capanna E. 1999. Contact zones between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 1. Temporal analysis of a hybrid zone between the CD chromosomal race (2n=22) and populations with the standard karyotype. *Heredity* 83: 341-359.
- Castiglia R y Capanna E. 2000. Contact zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 2. Fertility and segregation in laboratory-reared and wild mice heterozygous for multiple Robertsonian rearrangements. *Heredity* 85: 147-156.
- Castiglia R y Capanna E. 2002. Chiasma repatterning across a chromosomal hybrid zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. *Genetica* 114: 35-40.
- Castiglia R, Gornung E y Corti M. 2002. Cytogenetic analyses of chromosomal rearrangements in *Mus minutoides/musculoides* from north west Zambia through zapping of the telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> and banding techniques. *Chromosome Res.* 10: 399-406.
- Cattanach BM y Moseley H. 1973. Nondisjunction and reduced fertility caused by the tobacco mouse metacentric chromosomes. *Cytog. Cell Genet.* 12: 264-287.



- Chatti N, Ganem G, Benzekri K, Catalan J, Britton-Davidian J y Saïd K. 1999. Microgeographical distribution of two chromosomal races of house mice in Tunisia: pattern and origin of habitat partitioning. *Proc. R. Soc. B.* 266: 1561-1569.
- Cheverud JM. 1996. Developmental integration and the evolution of pleiotropy. *Amer. Zool.* 36: 44-50.
- Choo KHA. 1998. Why is the centromere so cold? *Genome Res.* 8: 81-82.
- Christakos S y Liu Y. 2004. Biological actions and mechanism of action of calbindin in the process of apoptosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89-90: 401-404.
- Clark JM y Koehler JK. 1990. Observations of hamster sperm-egg fusion in freeze-fracture replicas including the use of filipin as a sterol marker. *Mol. Reprod. Dev.* 27: 351-365.
- Clermont Y y Trott M. 1969. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radio autography. *Fertil. Steril.* 20: 805-817.
- Coan PM, Burton GJ y Ferguson-Smith AC. 2005. Imprinted genes in the placenta: a review. *Placenta* 26: S10-S20.
- Cohen JJ. 1993a. Apoptosis. *Immunol. Today* 14: 126-130.
- Cohen JJ. 1993b. Cross-overs, sperm redundancy and their close association. *Heredity* 31: 408-413.
- Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. 1972. Standard karyotype of the mouse, *Mus musculus*. *Heredity* 63: 69-72.



- Cooke HJ, Hargreave T y Elliott DJ. 1998. Understanding the genes involved in spermatogenesis: a progress report. *Fertil. Steril.* 69: 989-995.
- Corti M, Capanna E y Estabrook E. 1986. Microevolutionary sequences in house mouse chromosomal speciation. *Syst. Zool.* 35: 163-175.
- Corti M, Ciabatti CM y Capanna E. 1990. Parapatric hybridation in the chromosomal speciation of the house mouse. *Biol. J. Lin. Soc.* 41: 203-214.
- Corts G. 2012. *Anàlisi de les característiques espermàtiques de dues poblacions de Mus musculus domesticus a la zona híbrida de Barcelona*. Treball de pràctiques en empresa de la Llicenciatura de Biologia. Departament de Biologia cel·lular. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Coyne JA y Orr HA. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Cucchi T, Vigne JD y Auffray JC. 2005. First occurrence of the house mouse (*Mus musculus domesticus*, Schwarz & Schwarz, 1943) in the western Mediterranean: a zooarchaeological revision of subfossil occurrences. *Biol. J. Lin. Soc.* 84: 429-445.
- Davison MT y Akeson EC. 1993. Recombination suppression by heterozygous Robertsonian chromosomes in the mouse. *Genetics* 133: 649-667.
- Derothe JM, Loubes C, Perriat-Sanguinet M, Orth A y Moulia C. 1999. Experimental trypanosomiasis of natural hybrids between house mouse subspecies. *Int. J. Parasit.* 29: 1011-1016.
- Derothe JM, Le-Brun N, Loubes C, Perriat-Sanguinet M y Moulia C. 2001. Susceptibility of natural hybrids between house mouse subspecies to *Sarcocystis muris*. *Int. J. Parasit.* 31: 15-19.
- Dhein J, Walczak H, Bäuml C, Debatin KM y Krammer PH. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/fas/CD95. *Nature* 373: 438-441.





- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH y Eddy EM. 1996. Targeted gene disruption of HSP70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *PNAS* 93: 3264-3268.
- Dorken ME y Pannell JR. 2007. The maintenance of hybrid zones along a disturbance gradient. *Heredity* 99: 89-101.
- Dumas D y Britton-Davidian J. 2002. Chromosomal rearrangements and evolution of recombination: comparison of chiasma distribution patterns in standard and Robertsonian populations of the house mouse. *Genetics* 162: 1355-1366.
- Eaker S, Pyle A, Cobb J y Handel MA. 2001. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J. Cell Sci.* 114: 2953-2965.
- Ehrenwald E, Foote RH y Parks JE. 1990. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol. Reprod. Dev.* 25: 195-204.
- Elinos-Báez CM, Maldonado V y Meléndez-Zajgla J. 2001. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac. Med. Mex.* 5: 493-499.
- Ellis RE, Yuan J y Horvitz HR. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 663-689.
- Endler JA. 1977. *Geographic variation, speciation and clines*. Princeton University Press, Princeton.
- Enlow DH y Hans MG. 1996. *Essentials of Facial Growth*. W.B. Saunders, Philadelphia.



- Escoufier Y. 1973. Le traitement des variables vectorielles. *Biometrics* 29: 751-760.
- Estes S, Ajie BC, Lynch M y Phillips PC. 2005. Spontaneous mutational correlations for life-history, morphological, and behavioral characters in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 170: 645-653.
- Everett CA, Searle JB y Wallace BM. 1996. A study of meiotic pairing, nondisjunction and germ cell death in laboratory mice carrying Robertsonian translocations. *Genet. Res.* 67: 239-247.
- Fadock VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL y Henson PM. 1992. Exposure of phosphatidylserin on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148: 2207-2216.
- Fagundes V y Yonenaga-Yassuda Y. 1998. Evolutionary conservation of the whole homologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): Maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. *Chromosome Res.* 6: 643-648.
- Faria R y Navarro A. 2010. Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol. Evol.* 25: 660-669.
- Farkhondeh P, Tahereh K, Mahmood JT, Mojgan B, Jamileh G y Fatemeh SN. 2009. A novel human lipid binding protein coding gene: PERF15, sequence and cloning. *J. Reprod. Infert.* 10: 199-205.
- Fel-Clair F, Lenormand T, Catalan J, Grobert J, Orth A, Boursot P, Viroux MC y Britton-Davidian J. 1996. Genomic incompatibilities in the hybrid zone between house mice in Denmark: evidence from steep and non-coincident chromosomal clines for Robertsonian fusions. *Genet. Res.* 67: 123-134.



- Finato AO, Varella-Garcia M, Tajara EH, Taddei VA y Morielle-Versute E. 2000. Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Molossidae, Chiroptera). *Chromosomal Res.* 8: 563-569.
- Firman, RC y Simmons LW. 2009. Sperm competition and the evolution of the sperm hook in house mice. *J. Evolution. Biol.* 22: 2505-2511.
- Firman RC, Cheam LY y Simmons LW. 2010. Sperm competition does not influence sperm hook morphology in selection lines of house mice. *J. Evolution. Biol.* 24: 856-862.
- Flaherty SP. 1987. Further ultrastructural observations on the sperm head of the plains mouse, *Pseudomys australis* (Rodentia: Muridae). *Anat. Res.* 217: 240-249.
- Flaherty SP, Breed WG y Sarafis V. 1983. Localisation of actin in the sperm head of the plains mouse, *Pseudomys australis*. *J. Exp. Zool.* 225: 497-500.
- Forejt J. 1982. X-Y involvement in male sterility caused by autosome translocations- A hypothesis. En: *Genetic control of gamete production and function* (M Fraccaro y B Rubin eds.), pp. 131-151. New York Academic Press, New York.
- Fraguedakis-Tsolis S, Hauffe HC y Searle JB. 1997. Genetic distinctiveness of a village population of house mice: relevant to speciation and chromosomal evolution. *Proc. Roy. Soc. B.* 264: 355-360.
- Francavilla S, D'Abrazio P, Cordeschi G, Pelliccione F, Necozone S, Ulisse S, Properzi G y Francavilla F. 2002. Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* 8: 213-20.



- Franchini P, Castiglia R y Capanna E. 2007. Reproductive isolation between chromosomal races of the house mouse *Mus musculus domesticus* in a parapatric contact area revealed by an analysis of multiple unlinked loci. *J. Evolution. Biol.* 21: 502-513.
- Franchini P, Colangelo P, Solano E, Capanna E, Verheyen E y Castiglia R. 2010. Reduced gene flow at pericentromeric loci in a hybrid zone involving chromosomal races of the house mouse, *Mus musculus domesticus*. *Evolution* 64: 2020-2032.
- Friend GF. 1936. The sperms of British Muridae. *Quart. J. Micr. Sci.* 78: 419-443.
- Friend DS. 1982. Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell. *J. Cell. Biol.* 93: 243-249.
- Frost SR, Marcus LF, Bookstein FL, Reddy DP y Delson E. 2003. Cranial allometry, phylogeography, and systematics of large-bodied papionins (Primates: Cercopithecinae) inferred from geometric morphometric analysis of landmark data. *Anat. Record A.* 275: 1048-1072.
- Gage MJG, McFarlane CP y Yeates S. 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Curr. Biol.* 14: 44-47.
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L y Kroemer G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 14: 1237-1266.
- Garagna S, Zuccotti M, Searle JB, Redi CA y Wilkinson PJ. 1989. Spermatogenesis in heterozygotes for Robertsonian chromosomal rearrangements from natural populations of the common shrew, *Sorex araneus*. *J. Reprod. Fertil.* 87: 431-438.



- Garagna S, Broccoli D, Redi CA, Searle JB, Cooke J y Capanna E. 1995. Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. *Chromosoma* 103: 685-692.
- Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Capanna E y Redi CA. 2001a. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *PNAS* 98: 171-175.
- Garagna S, Zuccotti M, Thornhill A, Fernandez-Donoso R, Berrios S, Capanna E y Redi CA. 2001b. Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J. Cell Sci.* 114: 4429-4434.
- Garagna S, Zuccotti M, Capanna E y Redi CA. 2002. High resolution organization of mouse telomeric and pericentromeric DNA. *Cytogenet. Genome Res.* 96: 125-129.
- Gazave E, Catalan J, Ramalhinho MG, Mathias ML, Nunes C, Dumas D, Britton-Davidian J y Auffray JC. 2003. The non-random occurrence of Robertsonian fusion in the house mouse. *Genet. Res.* 81: 33-42.
- Golley FB, Petruszewicz K y Ryskowski L. 1975. *Small mammals: their productivity and population dynamics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gomendio M y Roldán ERS. 1991. Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proc. Roy. Soc. B.* 243: 181-185.
- Gomendio M y Roldán ERS. 2008. Implications in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int. J. Develop. Biol.* 52: 439-447.
- Gómez-Montoto L, Varea-Sánchez M, Tourmente M, Martín-Coello J, Luque-Larena JJ, Gomendio M y Roldán ERS. 2011. Sperm competition



differentially affects swimming velocity and size of spermatozoa from closely related Muroid rodents: head first. *Reproduction* 142: 819-830.

González-José R, Van der Molen S, González-Pérez E y Hernández M. 2004. Patterns of phenotypic covariation and correlation in modern humans as viewed from morphological integration. *Am. J. Physical Anthropol.* 123: 69-77.

Good P. 1994. *Permutation tests: a practical guide to resampling methods for testing hypotheses*. Springer-Verlag, New York.

Gosálbez J. 1987. *Insectívors i rossegadors de Catalunya. Metodologia d'estudi i catàleg faunístic*. Ketres ed., Barcelona.

Goswami A y Polly PD. 2010. The Influence of modularity on cranial morphological disparity in carnivora and primates (Mammalia). *PLoS ONE* 5: e9517.

Gropp A, Tettenborn U y Lehmann EV. 1969. Chromosomenuntersuchungen bei der Tabackmaus (*M. poschiavinus*) und bei Tabakmaus-Hybriden. *Experientia* 25: 875-876.

Gropp A, Winking H, Zech L y Müller H. 1972. Robertsonian chromosomal variation and identification of metacentric chromosomes in feral mice. *Chromosoma* 39: 265-288.

Gündüz I, Tez C y Searle JB. 2000. House mice with metacentric chromosomes in the Middle East. *Hereditas* 133: 175-177.

Gündüz I, López-Fuster MJ, Ventura J y Searle JB. 2001. Clinal analysis of a chromosomal hybrid zone in the house mouse. *Genet. Res.* 77: 41-51.

Gündüz I, Pollock C, Gimenez M, Förster D, White T, Sans-Fuentes M, Hauffe H, Ventura J, López-Fuster MJ y Searle JB. 2010. Staggered chromosomal



hybrid zones in the house mouse: relevance to reticulate evolution and speciation. *Genes* 1: 193-209.

Hallgrímsson B, Lieberman DE, Liu W, Ford-Hutchinson AF y Jirik FR. 2007. Epigenetic interactions and the structure of phenotypic variation in the cranium. *Evolution. Dev.* 9: 76-91.

Hansen TF y Houle D. 2004. Evolvability, stabilizing selection, and the problem of stasis. En: *Phenotypic integration* (M Pigliucci y K Preston eds.), pp. 130-150. Oxford University Press, New York.

Harrison RG. 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford surveys in Evolution. Biol.* 7: 69-128.

Harrison RG. 1993. Hybrids and hybrid zones: historical perspective. En: *Hybrid zones and the evolutionary process* (RG Harrison ed.), pp. 1-12. Oxford University Press, New York.

Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S y Murray AW. 1999. From molecular to modular cell biology. *Nature* 402: C47-C52.

Hauffe HC y Searle JB. 1993. Extreme karyotypic variation in a *Mus musculus domesticus* hybrid zone: The tobacco mouse story revisited. *Evolution* 47: 1374-1395.

Hauffe HC y Piálek J. 1997. Evolution of the chromosomal races of *Mus musculus domesticus* in the Rhaetian Alps: the roles of whole-arm reciprocal translocations and zonal raiation. *Biol. J. Lin. Soc.* 62: 255-278.

Hauffe HC y Searle JB. 1998. Chromosomal heterozygosity and fertility in house mice (*Mus musculus domesticus*) from northern Italy. *Genetics* 150: 1143-1154.



- Hausser J, Fedyk S, Fredga K, Searle JB, Volobouev V, Wójcik JM y Zima J. 1994. Definition and nomenclature of the chromosome races of *Sorex araneus*. *Folia Zool.* 43: 1-9.
- Heninger NL, Staub C, Blanchard TL, Johnson L, Varner DD y Forrest DW. 2004. Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. *Theriogenology* 62: 283-297.
- Herring SW. 1993. Formation of the vertebrate face: epigenetic and functional influences. *Am. Zool.* 33: 472-83.
- Holmquist GP y Dancis B. 1979. Telomere replication, kinetochore organizers, and satellite DNA evolution. *PNAS* 76: 4566-4570.
- Hotta Y y Chandley AC. 1982. Activities of X-linked enzymes in spermatocytes of mice rendered sterile by chromosomal alterations. *Gamete Res.* 6: 65-72.
- Hübner R y Koulischer L. 1990. Cytogenetic studies on wild house mice from Belgium. *Genetica* 80: 93-100.
- Hübner R, Koulischer L y Lichtenberger M. 1985. A Robertsonian translocation in wild mice from Belgium. *Mouse News Letter* 72: 116-117.
- Humphreys PN. 1972. Brief observations on the semen and spermatozoa of certain passerine and non-passerine birds. *J. Reprod. Fert.* 29: 327-336.
- Hunter FM y Birkhead TR. 2002. Sperm viability and sperm competition in insects. *Curr. Biol.* 12: 121-123.
- Immler S. 2008. Sperm competition and sperm cooperation: the potential role of diploid and haploid expression. *Reproduction* 135: 275-283.
- Ito C, Akutsu H, Yao R, Kyono K, Suzuki-Toyota F, Toyama Y, Maekawa M, Noda T y Toshimori K. 2009. Oocyte activation ability correlates with head





flatness and presence of perinuclear theca substance in human and mouse sperm. *Hum. Reprod.* 24: 2588-2595.

Jones AG, Arnold SJ y Bürger R. 2007. The mutation matrix and the evolution of evolvability. *Evolution* 61: 727-45.

John B. 1990. *Meiosis*. Cambridge University Press, Cambridge.

Johnson MH. 2007. *Essential reproduction*. Blackwell Publishing, University of Cambridge, UK.

Joseph SB y Kirkpatrick M. 2004. Haploid selection in animals. *Trends Ecol. Evol.* 19: 592-597.

Kasai F, Takahashi E, Koyama K, Terao K, Suto Y, Tokunaga K, Nakamura Y y Hirai M. 2000. Comparative FISH zapping of the ancestral fusion point of human chromosome 2. *Chromosomal Res.* 8: 727-735.

Keegan KS, Holtzman DA, Plug AW, Christenson ER, Brainerd EE, Flagg G, Bentley NJ, Taylor EM, Meyn MS, Moss SB, Carr AM, Ashley T y Hoekstra MF. 1996. The ATR and ATM protein-kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes Dev.* 10: 2423-2437.

Kerr JF, Wyllie AH y Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *B. J. Cancer* 26: 239-257.

Kim R. 2004. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Am. Cancer Soc.* 103: 1551-1560.

Kim KS y Gerton GL. 2003. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Develop. Biol.* 264: 141-152.



- Kimura M. 1985. Evolution of an altruistic trait through group selection as studied by the diffusion equation method. *IMA J. Math. Appl. Med. Bioi.* 1: 1-15.
- King M. 1993. *Species evolution: the role of chromosome change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kirschner M y Gerhart J. 1998. Evolvability. *PNAS* 95: 8420-8427.
- Klingenberg CP. 2005. Developmental constraints, modules, and evolvability. En: *Variation: a central concept in biology* (B Hallgrímsson y BK Hall eds.), pp. 219-247. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Klingenberg CP. 2008. Morphological integration and developmental modularity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 39: 115-32.
- Klingenberg CP. 2009. Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: tools for evaluating a priori hypotheses. *Evol. Dev.* 11: 405-421.
- Klingenberg CP. 2010. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nat. Rev. Genet.* 11: 623-635.
- Klingenberg CP. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Res.* 11: 353-357.
- Klingenberg CP y Zaklan SD. 2000. Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution* 54: 1273-1285.
- Klingenberg CP, Badyaev AV, Sowry SM y Beckwith NJ. 2001. Inferring developmental modularity from morphological integration: analysis of individual variation and asymmetry in *Bumblebee* Kings. *Am. Nat.* 157: 11-23.



- Korley R, Pouresmaeili F y Oko R. 1997. Analysis of the protein composition of the mouse sperm perinuclear theca and characterization of its major protein constituent. *Biol. Reprod.* 57: 1426-1432.
- Lalli M y Clermont Y. 1981. Structural changes of the head components of the rat spermatid during late spermiogenesis. *Am. J. Anat.* 160: 419-434.
- Lande R. 1985. The fixation of chromosomal rearrangements in a subdivided population with local extinction and recolonisation. *Heredity* 54: 323-32.
- Langlais J, Kan FWK, Granger L, Raymond L, Bleau G y Roberts KD. 1988. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamete. Res.* 20: 185-201.
- Leaché AD y Cole CJ. 2007. Hybridization between multiple fence lizard lineages in an ecotone: locally discordant variation in mitochondrial DNA, chromosomes, and morphology. *Mol. Ecol.* 16: 1035-1054.
- Lee JH y Möri T. 2006. Ultrastructural observations on the sperm of two *Apodemus* species, *Apodemus agrarius coreae* and *Apodemus speciosus peninsulae*, in Korea. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 51: 125-133.
- Lenormand T. 2005. CFit-6: Cline Fitting Application software ver. 0.6. CEFE UMR, Montpellier. <http://www.CEFE.cnrs.fr/ecogev/siteGB/CFitpage.htm>.
- Lessard C, Lothrop H, Schimenti JC y Handel MA. 2007. Mutagenesis-generated mouse models of human infertility with abnormal sperm. *Hum. Reprod.* 22: 159-166.
- Lin Y y Kan FW. 1996. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol. Reprod.* 55: 1133-1146.



- Lizama C, Alfaro I, Reyes JC y Moreno RD. 2007. Up-regulation of CD95 (Apo-1/Fas) is associated with spermatocyte apoptosis during the first round of spermatogenesis in the rat. *Apoptosis* 12: 449-512.
- Mahadevaiah SK, Burchis D, Rooij DG, Bestor TH, Turner JMA y Burgoyne PS. 2008. Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J. Cell Biol.* 182: 263-276.
- Malo AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ y Roldán ERS. 2006. Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.* 2: 246-249.
- Mallet J. 1985. Hybrid zones of *Heliconius* butterflies in Panama and the evolution of warning colour. *Heredity* 56: 191-202.
- Mandahl N. 1992. Methods in solid tumour cytogenetics. En: *Human Cytogenetics. A Practical Approach*, Vol. II (DE Rooney y BH Czepulkovski eds.), pp. 155-187. IRL Press, Oxford.
- Manterola M, Page J, Vasco C, Berríos S, Parra MT, Viera A, Rufas JS, Zuccotti M, Garagna S y Fernández-Donoso R. 2009. A high incidence of meiotic silencing of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple Robertsonian translocations. *PLoS Genet* 5: e1000625.
- Marroig G y Cheverud JM. 2001. A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology, and ontogeny during cranial evolution of new world monkeys. *Evolution* 55: 2576-2600.
- Martin SJ. 1993. Apoptosis: suicide, execution or murder? *Trends Cell Biol.* 3: 141-144.



- Martín-Coello J, Benavent-Corai J, Roldán ERS y Gomendio M. 2008. Sperm competition promotes asymmetries in reproductive barriers between closely related species. *Evolution* 63: 613-23.
- Martínez-Abadías N, Mitteroecker P, Parsons TE, Esparza M, Sjøvold T, Rolian C, Richtsmeier JT y Hallgrímsson B. 2012. The developmental basis of quantitative craneofacial variation in human and mice. *Evol. Biol.* 39: 554-567.
- Matzuk MM y Lamb DJ. 2002. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat. Cell Biol.* 4: S41-49.
- McLaren A. 1984. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. En: *38th Symposium of the Society for Experimental Biology. Controlling Events in Meiosis* (CW Evans y HG Dickinson eds.), pp. 7-23. Cambridge Company of Biologists, Cambridge.
- McLaren A y Southee D. 1997. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev. Biol.* 187: 107-113.
- Merico V, Pigozzi MI, Esposito A, Merani MS y Garagna S. 2003. Meiotic recombination and spermatogenic impairment in *Mus musculus domesticus* carrying multiple simple Robertsonian translocations. *Cytogenet. Genome Res.* 103: 321-329.
- Merico V, Díaz de Barbosa G, Vasco C, Ponce R, Rodríguez V, Garagna S y Tolosa de Talamoni N. 2008 A mitochondrial mechanism is involved in apoptosis of Robertsonian mouse male germ cells. *Reprod. Res.* 135: 797-804.
- Mitteroecker P y Bookstein F. 2007. The conceptual and statistical relationship between modularity and morphological integration. *Syst. Biol.* 56: 818-836.



- Möri A. 1961. The difference in sperm-morphology in different strains of mice. *Tohoku J. Agric. Res.* 12: 107-118.
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T y Yasuhiko Y. 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 37: 34287-34294.
- Morrow EH y Gage MJG. 2001. Sperm competition experiments between lines of crickets producing different sperm lengths. *Proc. R. Soc. B.* 268: 2281-2286.
- Moullia C, Aussel JP, Bonhomme F, Boursot P, Nielsen JT y Renaud F. 1991. Wormy mice in a hybrid zone, a genetic control of susceptibility to parasite infection. *J. Evolution. Biol.* 4: 679-87.
- Moullia C, Le Brun N, Dallas J, Orth A y Renaud F. 1993. Experimental evidence of genetic determinism in high susceptibility to intestinal pinworm infection in mice: a hybrid zone model. *Parasitology* 106: 387-93.
- Moullia C. 1999. Parasitism of plant and animal hybrids-are facts and fates the same? *Ecology* 80: 392-406.
- Muñoz-Muñoz F, Sans-Fuentes MA, López-Fuster MJ y Ventura J. 2003. Non-metric morphological divergence in the western house mouse, *Mus musculus domesticus*, from the Barcelona chromosomal hybrid zone. *Biol. J. Lin. Soc.* 80: 313-322.
- Muñoz-Muñoz F, Sans-Fuentes MA, López-Fuster MJ y Ventura J. 2006. Variation in fluctuating asymmetry levels across a Robertsonian polymorphic zone of the house mouse. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 44: 236-250.
- Muñoz-Muñoz F. 2008. *Estudio de la variación morfológica en una zona de polimorfismo robertsoniano de ratón doméstico, Mus musculus domesticus*



---

(Schwarz y Schwarz, 1943). Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

Muñoz-Muñoz F, Sans-Fuentes MA, López-Fuster MJ y Ventura J. 2011. Evolutionary modularity of the mouse mandible: dissecting the effect of chromosomal reorganizations and isolation by distance in a Robertsonian system of *Mus musculus domesticus*. *J. Evolution. Biol.* 24: 1763-1776.

Nachman MW y Searle JB. 1995. Why is the mouse karyotype so variable? *Trends Ecol. Evol.* 10: 397-402.

Nachman MW, Boyer SN, Searle JB y Aquadro CF. 1994. Mitochondrial DNA variation and the evolution of Robertsonian chromosomal races of house mice. *Mus domesticus*. *Genet. Res.* 136: 1105-1120.

Nadeau JH, Burrage LC, Restivo J, Pao Y-H, Churchill GA y Hoit BD. 2003. Pleiotropy, homeostasis, and functional networks based on assays of cardiovascular traits in genetically randomized populations. *Genome Res.* 13: 2082-2091.

Navarro A y Barton NH. 2003. Chromosomal speciation and molecular divergence. Accelerate evolution in rearranged chromosomes. *Science* 300: 321-324.

Needleman DJ. 2009. Cellular Allometry: the spindle in development and inheritance. *Curr. Biol.* 18: R846.

Nevo E y Bar-EI H. 1976. Hybridization and speciation in fossorial mole rats. *Evolution* 30: 831-840.

Noor MAF, Grams KL, Betucci LA y Reiland J. 2001. Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *PNAS* 98: 12084-12088.



- Nunes AC, Britton-Davidian J, Catalan J, Ramalhinho MG, Capela R, Mathias ML y Ganem G. 2005. Influence of physical environmental characteristics and anthropogenic factors on the position and structure of contact zone between two chromosomal races of the house mouse on the island of Madeira (North Atlantic, Portugal). *J. Biogeography* 32: 2123-2134.
- Nunes AC, Catalan J, Lopez J, Ramalhinho MG, Mathias ML y Britton-Davidian J. 2011. Fertility assessment in hybrids between monobrachially homologous Rb races of the house mouse from the island of Madeira: implications for modes of chromosomal evolution. *Heredity* 106: 348-356.
- Oakberg EF. 1956. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* 99: 391-409.
- Oka M, Tagoku K, Russell TL, Nakano Y, Hamazaki T, Meyer EM, Yokota T y Terada N. 2002. CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell. Apr.* 13: 1274-81.
- Oka A, Aoto T, Totsuka Y, Takahashi R, Ueda M, Mita A, Sakurai-Yamatani N, Yamamoto H, Kuriki S, Takagi N, Moriwaki K y Shiroishi T. 2007. Disruption of genetic interaction between two autosomal regions and the X chromosome causes reproductive isolation between mouse strains derived from different subspecies. *Genetics* 175: 185-197.
- Oka A, Mita A, Takada Y, Koseki H y Shiroishi T. 2010. Reproductive isolation in hybrid mice due to spermatogenesis defects at three meiotic stages. *Genetics* 186: 339-351.
- Oko R y Clermont Y. 1988. Isolation, structure and protein composition of the perforatorium of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 39: 673-687.





- Oko R y Morales CR. 1994. A novel testicular protein, with sequence similarities to a family of lipid binding proteins, is a major component of the rat sperm perinuclear theca. *Dev. Biol.* 166: 235-245.
- Oko R, Moussakova L y Clermont Y. 1990. Regional differences in composition of the perforatorium and outer periacrosomal layer of the rat spermatozoon as revealed by immunocytochemistry. *Am. J. Anat.* 188: 64-73.
- Olson EC y Miller RL. 1958. *Morphological integration*. University of Chicago Press, Chicago.
- Olson GE, Winfrey VP y Nagdas SK. 2003. Structural modification of the hamster sperm acrosome during posttesticular development in the epididymis. *Microsc. Res. Tech.* 61: 46-55.
- Ortíz-Barrientos D, Reiland J, Hey J y Noor MAF. 2002. Recombination and the divergence of hybridizing species. *Genetica* 116: 167-178.
- Pan J, Eckardt S, Leu NA, Buffone MG, Zhou J, Gerton GL, McLaughlin KJ y Wang PJ. 2009. Inactivation of Nxf2 causes defects in male meiosis and age-dependent depletion of spermatogonia. *Dev. Biol.* 330: 167-174.
- Patton JL, Baker RJ y Genoways HH. 1980. Apparent chromosomal heterosis in a fossorial mammal. *Am. Naturalist* 116: 143-146.
- Pellegrino KC, Rodríguez MT y Yonenaga-Yassuda Y. 1999. Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas* 131: 15-21.
- Piálek J, Hauffe HC, Rodríguez-Clark KM y Searle JB. 2001. Racialization and speciation in house mice from the Alps: the role of chromosomes. *Mol. Ecol.* 10: 613-625.



- Piálek J, Hauffe HC y Searle JB. 2005. Chromosomal variation in the house mouse. *Biol. J. Lin. Soc.* 84: 535-563.
- Pinton A, Raymond-Letron I, Berland HM, Bonnet N, Calgaro A, Garnier-Bonnet A, Yerle M y Ducos A. 2008. Meiotic studies in an azoospermic boar carrying a Y:14 translocation. *Cytogenet. Genome Res.* 120: 106-111.
- Pinton A, Calgaro A, Bonnet N, Ferchaud S, Billoux S, Dudez AM, Mary N, Massip K, Bonnet-Garnier A, Yerle M y Ducos A. 2009. Influence of sex on the meiotic segregation of a t(13.17) Robertsonian translocation: a case study in the pig. *Hum. Reprod.* 24: 2034-2043.
- Polly PD. 2001. On morphological clocks and paleophylogeography: Towards a timescale for *Sorex* hybrid zones. *Genetica* 112-113: 339-357.
- Polly PD. 2003. Paleophylogeography of *Sorex araneus*: molar shape as morphological marker for fossil shrews. *Mammalia* 68: 233-243.
- Print CG y Loveland KL. 2000. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Biol. Essays* 22: 423-430.
- Raff RA. 1996. *The shape of life: genes, development, and the evolution of animal form*. University of Chicago Press, Chicago.
- Rath PC y Aggarwal BB. 1999. TNF-induced signalling in apoptosis. *J. Clin. Immunol.* 19: 350-364.
- Raymond M y Rousset F. 1995. GENEPOP software: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Redi CA y Capanna E. 1978. DNA content variation in mouse spermatozoa arising from irregular meiotic segregation. *Boll. Zool.* 45: 315-332.



- Redi CA y Garagna S. 1985. The effects of some Robertsonian chromosome combinations on the seminiferous epithelium of the mouse. *Embryol. Exp. Morph.* 85: 1-19.
- Redi CA, Hilscher B y Winking H. 1983. Stage-dependent enzymatic activities in spermatogenesis of mice with the standard karyotype and of chromosomal variants with impaired fertility. *Andrologia* 15: 322.
- Redi CA, Garagna S, Hilscher B y Winking H. 1985. The effects of some Robertsonian chromosome combinations on the seminiferous epithelium of the Mouse. *J. Embryol. Exp. Morph.* 85: 1-19.
- Redi CA, Garagna S y Zuccotti M. 1990. Robertsonian chromosome formation and fixation: the genomic scenario. *Biol. J. Lin. Soc.* 41: 235-255.
- Reed JC. 2000. Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157: 1415-1430.
- Renaud S, Pantalacci S, Quéré JP, Laudet V y Auffray JC. 2009. Developmental constraints revealed by co-variation within and among molar rows in two murine rodents. *Evol. Develop.* 11: 590-602.
- Renaud S, Alibert P y Auffray JC. 2012. Modularity as a source of new morphological variation in the mandible of hybrid mice. *BMC Evol. Biol.* 12: 141.
- Rieseberg LH. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16: 351-358.
- Riginos C y Nachman MW. 1999. The origin of a Robertsonian chromosomal translocations in house mice inferred from linked microsatellite markers. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1763-1773.
- Robertson WRB. 1916. Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of Tettigidae and Acrididae, V-shaped chromosomes



- and their significance in Acrididae, Locustidae and Gryllidae: chromosomes and variation. *J. Morphol.* 27: 179-331.
- Robinson TJ. 1978. Preliminary report of Robertsonian translocation in an isolated feral *Mus musculus* population. *Mam. Chromosome Newslett.* 19: 84-85.
- Roeder GS. 1990. Chromosome synapsis and genetic recombination: their roles in meiotic chromosome segregation. *Trends. Genet.* 6: 385-389.
- Roest HP, Vanklaveren J, Dewit J, Vangurp CG, Kolen MH, Vermey M, Van Roijen JH, Hoogerbrugge JW, Vreeburg JT, Baarends WM, Bootsma D, Grootegoed JA y Hoeijmakers JH. 1996. Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA-repair enzyme in mice causes male-sterility associated with chromatin modification. *Cell* 86: 799-810.
- Rohlf FJ. 2006. *Tps software*. Department of ecology and evolution, University of New York at Stony Brook, New York. <http://www.life.bio.sunysb.edu/morph>.
- Rohlf JM y Slice DE. 1990. Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* 39: 40-59.
- Rohlf FJ y Corti M. 2000. The use of two-block partial least-squares to study covariation in shape. *Syst. Biol.* 49: 740-753.
- Roldán ERS, Gomendio M y Vitullo D. 1992. The Evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: female selection and sperm competition. *Biol. Rev.* 67: 551-593.
- Roosen-Runge EC. 1977. The process of spermatogenesis in animals. *Biol. Rev.* 37: 343-376.



- Rousset F y Raymond M. 1995. Testing heterozygotes excess and deficiency. *Genetics* 140: 1413-1419.
- Ruggiu R, Speed R, Taggart M, MacKay SJ, Kilanowski F, Saunders PTK, Dorin J y Cooke HJ. 1997. The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmatic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389: 73-75.
- Ruiz-Herrera A, García F, Azzalin C, Giulotto E, Egozcue J, Ponsà M y García M. 2002. Distribution of intrachromosomal telomeric sequences (ITS) on *Macaca fascicularis* (Primates) chromosomes and their implication for chromosome evolution. *Hum. Genet.* 110: 578-586.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim, AP y Clegg ED. 1990. The classification and timing of spermatogenesis. En: *Histological and histopathological evaluation of the testis* (LD Russell, RA Ettlín, AP Sinha-Hikim, y ED Clegg eds.), pp. 119-161. Cache River Press, Florida.
- Sage RD, Heyneman D, Lim KC y Wilson AC. 1986. Wormy mice in a hybrid zone. *Nature* 324: 60-63.
- Sage RD, Atchley WR y Capanna E. 1993. House mice as models in systematic biology. *Syst. Biol.* 42: 523-561.
- Saïd K y Britton-Davidian J. 1991. Genetic differentiation and habitat partition of Robertsonian house mouse populations (*Mus musculus domesticus*) of Tunisia. *J. Evolution. Biol.* 4: 409-427.
- Saïd K, Jacquart T, Montgelard C, Sonjaya H, Helal AN y Britton-Davidian J. 1986. Robertsonian house mouse populations in Tunisia. A karyological and biochemical study. *Genetica* 68: 191-196.
- Saïd K, Saad A, Auffray JC y Britton-Davidian J. 1993. Fertility estimates in the Tunisian allacrocentric and Robertsonian populations of the house mouse and their chromosomal hybrids. *Heredity* 71: 532-538.



- Saïd K, Auffrey JC, Boursot P y Britton-Davidian J. 1999. Is chromosomal speciation occurring in house mice in Tunisia? *Biol. J. Lin. Soc.* 68: 387-399.
- Sak B, Kvác M, Kucerová Z, Kvetonová D y Sakova K. 2011. Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals - A longitudinal study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5: e1162.
- Sans-Fuentes MA. 2004. *Estudio biológico de Mus domesticus Ratty, 1772 en una zona de polimorfismo Robertsoniano*. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona, Barcelona.
- Sans-Fuentes MA, López-Fuster MJ, Ventura J, Díaz-Noguera A y Cambras T. 2005. Effect of Robertsonian translocations on circadian rhythm of motor activity in house mouse. *Behav. Genet.* 35: 603-613.
- Sans-Fuentes MA, Muñoz-Muñoz F, Ventura J y López-Fuster MJ. 2007. Rb(7.17), a rare Robertsonian fusion in wild populations of the house mouse. *Genet. Res.* 89: 207-213.
- Sans-Fuentes MA, Ventura J, López-Fuster MJ y Corti M. 2009. Morphological variation in house mice from the Robertsonian polymorphism area of Barcelona. *Biol. J. Lin. Soc.* 97: 555-570.
- Sans-Fuentes MA, García-Valero J, Ventura J y López-Fuster MJ. 2010. Spermatogenesis in house mouse in a Robertsonian polymorphism zone. *Reproduction* 140: 560-581.
- Savriama Y, Neustupa J y Klingenberg CP. 2010. Geometric morphometrics of symmetry and allometry in *Micrasterias rotata* (Zygnemophyceae, Viridiplantae). *Beih. Nova Hedw.* 136: 43-54.
- Schemske DW. 2010. Adaptation and the origin of species. *Am. Natur.* 176: S4-S25.



- Schlosser G y Wagner GP. 2004. Introduction: the modularity concept in developmental and evolutionary biology. En: *Modularity in development and evolution* (G Schlosser y GP Wagner eds.), pp. 1-11. The University of Chicago Press, Chicago.
- Schluter D. 2000. *The Ecology of Adaptive Radiations*. Oxford University Press, New York.
- Schmitt MC, Jamison RS, Orgebin-Crist MC y Ong DE. 1994. A novel, testis-specific member of the cellular lipophilic transport protein superfamily, deduced from a complementary deoxyribonucleic acid clone. *Biol. Reprod.* 51: 239-245.
- Schwarz E y Schwarz HK. 1943. The wild and commensal stocks of the house mouse, *Mus musculus*, Linnaeus. *J. Mammal.* 24: 59-72.
- Searle JB. 1986. Meiotic studies of Robertsonian heterozygotes from natural populations of the common shrew, *Sorex araneus*. *Cytog. Cell Genetics* 41: 154-162.
- Searle JB. 1991. A hybrid zone comprising staggered chromosomal clines in the house mouse (*Mus musculus domesticus*). *Proc. Royal Soc. Lond. B.* 246: 47-52.
- Searle JB. 1993. Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. En: *Hybrid Zones and Evolutionary Process* (RG Harrison ed.), pp. 309-353. Oxford University Press, New York.
- Searle JB, Navarro YN y Ganem G. 1993. Further studies of a staggered hybrid zone in *Mus musculus domesticus* (the house mouse). *Heredity* 71: 523-531.
- Selvaraj V, Asano A, Buttke DE, McElwee JL, Nelson JL, Wolff CA, Merdiushev T, Fornes MW, Cohen AW, Lisanti MP, Rothblat GH, Kopf GS y Travis AJ.



2006. Segregation of micron-scale membrane sub-domains in live murine sperm. *J. Cell. Physiol.* 206: 636-646.
- Selvaraj V, Asano A, Buttke DE, Sengupta P, Weiss RS y Travis AJ. 2009. Mechanisms underlying the micron-scale segregation of sterols and GM1 in live mammalian sperm. *J. Cell. Physiol.* 218: 522-536.
- Selvaraj V, Asano A, Page JL, Nelson JL, Kothapalli KSD, Foster JA, Brenna JT, Weiss RS y Travis AJ. 2010. Mice lacking FABP9/PERF15 develop sperm head abnormalities but are fertile. *Dev. Biol.* 348: 177-189.
- Silvestri F, Ribatti D, Nico B, Silvestri N, Romito A y Dammacco F. 1995. Apoptosis or programmed cell death: regulatory and pathophysiological mechanisms. *Ann. Ital. Med. Int.* 10: 7-13.
- Simmons LW, Wernham J, García-González F y Kamien D. 2003. Variation in paternity in the field cricket *Teleogryllus oceanicus*: no detectable influence of sperm numbers or sperm length. *Behav. Ecol.* 14: 539-545.
- Singh N, Harvati K, Hublin JJ y Klingenberg CP. 2012. Morphological evolution through integration: a quantitative study of cranial integration in *Homo*, *Pan*, *Gorilla* and *Pongo*. *J. Hum. Evol.* 62: 155-164.
- Slijepcevic P. 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107: 136-140.
- Sokal RR y Rohlf FJ. 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. WH Freeman and Co., New York.
- Soriguer RC y López M. 1986. Estudio demográfico de dos poblaciones de ratones caseros (*Mus musculus*, Linnaeus). *Alytes* 4: 19-28.
- Spirin V y Mirly LA. 2003. Protein complexes and functional modules in molecular networks. *PNAS* 100: 12123-12128.





- Spirito F, Modesti A, Perticone P, Cristaldi M, Federici R y Rizzoni M. 1980. Mechanisms of fixation and accumulation of centric fusions in natural populations of *Mus musculus* Linnaeus. I. Karyological analysis of hybrid zone between two populations in the central Apennines. *Evolution* 34: 453-466.
- Styrna J y Krzanowska H. 1995. Sperm select penetration test reveals differences in sperm quality in strains with different Y chromosome genotype in mice. *Arch. Androl.* 35: 111-118.
- Styrna J, Klag J y Moriwaki K. 1991. Influence of partial deletion of the Y chromosome on mouse sperm phenotype. *J. Reprod. Fertil.* 92: 187-195.
- Styrna J, Bilińska B y Krzanowska H. 2002. The effect of a partial Y chromosome deletion in B10.BR-Ydel mice on testis morphology, sperm quality and efficiency of fertilization. *Reprod. Fertil. Dev.* 14: 101-108.
- Szymura JM y Barton NH. 1986. Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *B. variegata*, near Cracow in southern Poland. *Evolution* 40: 1141-1159.
- Thaeler CS. 1974. Four contacts between ranges of different chromosomes forms of *Thomomys talpoides* complex (Rodentia: Geomyidae). *System. Zool.* 23: 343-354.
- Tichy H y Vucak. 1987. Chromosomal polymorphism in the house mouse (*Mus domesticus*) of Greece and Yugoslavia. *Chromosoma* 95: 31-36.
- Toshimori K y Ito C. 2003. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch. Histol. Cytol.* 66: 383-396.



- Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng CX y Burgoyne PS. 2005. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat. Genet.* 37: 41-47.
- Turner LM, Schwahn DJ y Harr B. 2011. Reduced male fertility is common but highly variable in form and severity in a natural house mouse hybrid zone. *Evolution* 66: 443-458.
- Travis AJ, Merdiushev T, Vargas LA, Jones BH, Purdon MA, Nipper RW, Galatioto J, Moss SB, Hunnicutt GR, Kopf GS. 2001. Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Dev. Biol.* 240: 599-610.
- Venables JP y Cooke HJ. 2000. Lessons from knockout and transgenic mice for infertility in men. *J. Endocrinol. Invest.* 23: 584-591.
- Vera Y, Díaz-Romero M, Rodríguez S, Lue Y, Wang C, Swerdloff R y Sinha Hikim AP. 2004. Mitochondria-dependent pathway is involved in heat induced male germ cell death: lessons from mutant mice. *Biol. Reprod.* 70: 1534-1540.
- Vernet N, Mahadevaiah SK, Ojarikre OA, Longepied G, Prosser HM, Bradley A, Mitchell MJ y Burgoyne PS. 2011. The Y-Encoded gene Zfy2 acts to remove cells with unpaired chromosomes at the first meiotic metaphase in male mice. *Curr. Biol.* 21: 787-793.
- Viera A, Ortiz MI, Pinna-Senn E, Dalmaso G, Bella JL y Lisanti JA. 2004. Chromosomal localization of telomeric sequences in three species of *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae). *Cytol. Genet. Res.* 107: 99-102.
- Virtanen I, Badley RA, Paasivuo R y Lehto VP. 1984. Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J. Cell. Biol.* 99: 1083-1091.



- Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA y Kopf GS. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.* 214: 429-443.
- Von Dassow G y Munro E. 1999. Modularity in animal development and evolution: elements of a conceptual framework for evo-devo. *J. Exp. Zool.* 285: 307-325.
- Wagner GP. 1994. Homology and the mechanisms of development. En: *The hierarchical basis of comparative biology homology* (BK Hall ed.), pp. 273-299. San Diego Academic Press, San Diego.
- Wagner GP. 1996. Homologues, natural kinds, and the evolution of modularity. *Am. Zool.* 36: 36-43.
- Wagner GP y Misof BY. 1993. How can a character be developmentally constrained despite variation in developmental pathways? *J. Evolution. Biol.* 6: 449-455.
- Wagner GP y Altenberg L. 1996. Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution* 50: 967-976.
- Wagner GP, Pavlicev M y Cheverud JM. 2007. The road to modularity. *Nat. Rev. Genet.* 8: 921-931.
- Wałkowska W, Adameczyk K y Chelkowska H. 1989. Characteristics of migrants in a free-living population of the house mouse. *Acta Theriol.* 21: 305-313.
- Wallace BM y Searle JB. 1994. Oogenesis in homozygotes and heterozygotes for Robertsonian chromosomal rearrangements from natural populations of the common shrew, *Sorex araneus*. *J. Reprod. Fertil.* 100: 231-237.



- Wallace BM, Searle JB y Garagna S. 1991. Oogenesis in common shrews homozygous and heterozygous for Robertsonian rearrangements. *Mém. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 19: 23-31.
- Wallace BM, Searle JB y Everett CA. 1992. Male meiosis and gametogenesis in wild house mouse (*Mus musculus domesticus*) from a chromosomal hybrid zone. A comparison between 'simple' Robertsonian heterozygotes and homozygotes. *Cytog. Cell Genetics* 6: 211-220.
- Wallace BM, Searle JB y Everett CA. 2002. The effect of multiple simple Robertsonian heterozygosity on chromosome pairing and fertility of wild-stock house mice (*Mus musculus domesticus*). *Cytol. Genet. Res.* 96: 276-286.
- Weir BS. 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Weir BS y Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- West-Eberhard MJ. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford Univ. Press, New York.
- White MJD. 1978. Chain processes in chromosomal speciation. *Syst. Zool.* 27: 285-298.
- White MA, Stubbings M, Dumont BL y Payseur BA. 2012. Genetics and evolution of hybrid male sterility in house mice. *Genetics* 191: 917-934.
- Winking H. 1986. Some aspects of Robertsonian karyotype in European wild mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 127: 68-74.
- Winking H, Dulic B y Bulfield G. 1988. Robertsonian karyotype variation in the European house mouse, *Mus musculus*. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 53: 148-161.



- Wyllie AH, Morris RG, Smith AL y Dunlop D. 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142: 67-77.
- Xu Y, Ashley T, Brainerd EE, Bronson RT, Meyn MS y Baltimore D. 1996. Targeted disruption of ATM leads to growth-retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Devel.* 10: 2411-2422.
- Yamamoto M y Miklos LG. 1978. Genetic studies on heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and their implications for the functions of satellite DNA. *Chromosoma* 66: 71-98.
- Yang E, Zha J y Jockel J. 1995. Bad a heterodimeric partner for Bcl-2X1 and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285-91.
- Yannic G, Basset P y Hausser J. 2009. Chromosomal rearrangements and gene flow over time in an inter-specific hybrid zone of the *Sorex araneus* group. *Heredity* 102: 616-625.
- Yin S, Sun XF, Schatten H y Sun QY. 2008. Molecular insights into mechanisms regulating faithful chromosome separation in female meiosis. *Cell Cycle* 7: 2997-3005.
- Yuan W, Leisner TM, McFadden AW, Clark S, Hiller S, Maeda N, O'Brien DA y Parise LV. 2006. CIB1 is essential for mouse spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 26: 8507-8514.
- Zakian VA. 1997. Life and cancer without telomerase. *Cell* 91: 1-3.
- Zao GQ, Deng K, Labosky PA, Liaw L y Hogan BLM. 1996. The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev.* 10: 1657-1669.



---

Zickler D y Kleckner N. 1999. Meiotic chromosomes: integration structure and function. *Ann. Rev. Genet.* 32: 619-697.

Zimmermann KC y Green DR. 2001. How cells die apoptosis pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 99-103.



# Apéndices

---



**Apéndice 1.** Características cariotípicas de los ejemplares analizados en el Capítulo 3. N, número de individuos; 2n, número diploide; M, metacéntrico en homocigosis; H, metacéntrico en heterocigosis; A, condición cromosómica telocéntrica.

Localidad	N	2n	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
a. Garraf	1	29	H	M	M	M	A	M	M
	1	29	M	M	H	H	H	M	M
	1	30	M	M	H	H	H	H	M
	1	31	H	M	H	H	A	M	M
	1	32	H	H	H	H	A	M	M
	1	32	M	M	H	A	A	M	H
	1	32	H	M	H	H	A	M	H
	1	32	H	M	A	H	A	M	M
	1	32	H	H	M	H	A	H	M
	1	33	H	M	A	A	A	M	M
	1	36	A	H	H	A	A	H	H
	1	38	A	H	A	A	A	A	H
	1	40	A	A	A	A	A	A	A
b. Sant Pau d'Ordal	1	34	A	H	H	M	A	H	H
c. La Granada	1	29	M	M	M	M	A	H	M
	1	30	M	M	M	A	A	M	M
	1	31	H	M	H	M	A	M	H
	1	31	H	M	M	H	A	M	H
	1	31	H	H	M	H	A	M	M
	1	31	A	M	M	H	A	M	M
	1	31	H	M	M	A	A	M	M
	1	32	H	M	M	H	A	H	H
	1	32	H	H	M	A	A	M	M
	3	32	H	M	H	H	A	H	M
	1	32	M	M	H	A	A	M	H
	1	32	A	M	H	H	A	M	M
	1	33	A	H	M	H	A	M	H
1	34	A	H	M	H	A	H	H	
d. Corbera de Llobregat	1	36	A	A	A	A	A	M	M
	1	36	A	M	A	A	A	H	H
	1	36	A	M	H	A	A	H	A
	1	37	A	H	H	A	A	H	A
	1	37	A	M	A	A	A	H	A
	1	37	A	A	A	A	A	H	M
	1	38	A	M	A	A	A	A	A
	1	39	A	H	A	A	A	A	A





Localidad	N	2n	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
e. Gavà	1	29	M	M	M	H	A	M	M
	4	30	A	M	M	M	A	M	M
	3	30	H	M	M	H	A	M	M
	1	30	H	M	H	M	A	M	M
	1	30	H	H	M	M	A	M	M
	1	31	H	H	H	M	A	M	M
	1	31	A	M	M	H	A	M	M
	1	36	A	H	H	A	A	H	H
	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	f. Vilanova i la Geltrú	1	31	H	M	M	A	A	M
2		33	A	M	M	A	A	H	M
1		33	A	H	M	A	A	M	M
1		34	A	M	M	A	A	H	H
1		38	H	A	A	A	A	H	A
g. Viladecans	2	30	H	M	M	H	A	M	M
	1	30	H	H	M	M	A	M	M
	1	31	A	M	M	M	A	H	M
	1	32	M	H	M	H	A	H	H
	2	32	A	M	H	M	A	M	H
	1	34	H	H	H	A	A	M	H
	1	34	A	H	H	H	A	M	H
h. Sant Martí Sarroca	1	31	A	M	M	A	H	M	M
	1	32	A	M	M	A	A	M	M
	2	32	A	M	M	A	A	M	M
	1	32	A	M	H	A	H	M	M
	2	34	A	M	H	A	A	M	H
	1	34	A	M	A	A	A	M	M
	1	34	A	M	H	A	A	H	M
i. El Prat de Llobregat	1	29	H	M	M	M	A	M	M
	2	30	H	M	M	H	A	M	M
	1	30	A	M	M	M	A	M	M
	1	31	H	M	M	H	A	M	H
	1	31	A	M	M	H	A	M	M
	3	31	A	M	M	M	A	H	M
	1	31	H	M	M	A	A	M	M
	2	31	A	H	M	M	A	M	M
	1	31	H	H	M	M	A	H	M
	3	32	A	H	M	H	A	M	M
	1	32	A	A	M	M	A	M	M
	1	32	A	H	M	M	A	H	M
	1	33	A	M	H	H	A	M	H



Localidad	N	2n	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
i. El Prat de Llobregat (Cont.)	1	33	A	H	M	H	A	M	H
	1	33	A	H	M	H	A	H	M
	2	33	A	H	H	H	A	M	M
	1	33	A	M	M	H	A	H	H
	1	34	A	H	M	H	A	A	M
	1	34	A	H	H	H	A	M	H
	1	34	H	H	H	A	A	H	M
j. Cubelles	1	32	A	H	M	H	A	M	M
	1	33	H	H	H	H	A	M	H
	1	33	A	H	M	A	A	M	M
	1	33	A	M	M	H	A	M	A
	1	34	A	H	H	A	A	M	M
	1	34	A	M	M	A	A	A	M
	1	34	A	H	M	A	A	M	H
	1	35	A	H	H	H	A	H	H
	1	35	A	A	M	A	A	M	H
	1	36	A	A	H	A	A	H	M
	1	36	A	H	A	H	A	H	H
	1	36	A	H	H	A	A	H	H
	1	38	A	A	A	A	A	H	H
	1	39	A	A	H	A	A	A	A
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
k. Sant Sadurní Anoia	1	35	A	H	A	A	A	M	M
	1	35	A	M	A	A	A	H	M
	1	35	A	M	A	A	A	M	H
	1	36	A	H	A	A	A	H	M
	1	36	A	M	A	A	A	H	H
	1	37	A	M	A	A	A	A	H
	1	37	A	H	A	A	A	M	A
	2	37	A	H	A	A	A	H	H
	1	37	A	M	A	A	A	H	A
	1	38	A	M	A	A	A	A	A
	2	38	A	H	A	A	A	H	A
	2	38	A	H	A	A	A	A	H
	1	38	A	A	A	A	A	A	M
	2	39	A	H	A	A	A	A	A
	1	39	A	A	A	A	A	A	H
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	l. Calafell	1	37	A	H	A	H	A	H
1		37	H	H	A	A	A	A	H
1		37	H	A	A	A	A	A	M



Localidad	N	2n	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
i. Calafell (Cont.)	1	37	A	M	A	A	A	A	H
	1	37	A	H	A	A	A	A	M
	1	37	A	H	A	H	A	A	H
	1	37	H	H	A	A	A	A	H
	1	37	A	H	A	A	A	A	M
	1	38	A	H	A	A	A	H	A
	4	38	A	A	A	A	A	H	H
	1	38	A	H	A	A	A	A	H
	1	38	A	A	A	H	A	A	H
	1	38	A	H	A	A	A	A	H
	3	39	A	A	A	A	A	A	A
m. El Papiol	1	36	A	A	M	A	A	M	A
	2	37	A	A	H	A	A	M	A
	2	38	A	H	A	A	A	A	H
	2	38	A	A	A	A	A	M	A
	1	39	A	A	A	A	A	H	A
n. Bellvei	1	35	A	A	M	A	A	H	M
	1	35	A	H	A	H	A	M	H
	1	36	A	H	A	A	A	H	M
	1	37	A	M	A	A	A	A	H
	1	37	A	A	M	H	A	A	A
	1	37	A	A	A	H	A	H	H
o. Bellaterra	7	40	A	A	A	A	A	A	A
p. Vacarisses	7	40	A	A	A	A	A	A	A
q. Badalona	11	40	A	A	A	A	A	A	A
	2	39	-	-	-	-	-	-	-
r. Sta. Perpètua de la Mogoda	10	40	A	A	A	A	A	A	A
s. Les Pobles	11	40	A	A	A	A	A	A	A
	2	39	A	A	H	A	A	A	A
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
t. Castellar del Vallès	8	40	A	A	A	A	A	A	A
u. Jorba	1	39	A	H	A	A	A	A	A
	2	40	A	A	A	A	A	A	A
v. Castellfollit del Boix	14	40	A	A	A	A	A	A	A



Localidad	N	2n	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
w. Caldes de Montbuí	2	40	A	A	A	A	A	A	A
x. Santa Coloma de Queralt	2	36	A	M	H	A	A	A	H
	1	36	A	M	M	A	A	A	A
	1	37	A	H	H	A	A	A	H
	1	37	A	H	M	A	A	A	A
	2	38	A	H	A	A	A	A	H
y. Fals	3	40	A	A	A	A	A	A	A
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
z. Nulles	7	40	A	A	A	A	A	A	A
aa. Ametlla de Segarra	1	38	A	M	A	A	A	A	A
	3	39	A	H	A	A	A	A	A
	5	40	A	A	A	A	A	A	A
ab. Olost	16	40	A	A	A	A	A	A	A
	1	-	-	-	-	-	-	-	-
ac. Arbeca	6	40	A	A	A	A	A	A	A



**Apéndice 2.** Características cromosómicas de los individuos analizados en el Capítulo 4. *N*, número de individuos; *2n*, número diploide; M, metacéntrico en homocigosis; H, metacéntrico en heterocigosis; A, condición cromosómica telocéntrica. (\*) Ejemplares no incluidos en el estudio debido a la presencia de parásitos (véase Anexo 1). (\*\*) Ejemplares examinados en el apartado de alteraciones morfológicas en espermatozoides epididimales.

Localidad	<i>N</i>	<i>2n</i>	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
Castellfollit del Boix	6	40	A	A	A	A	A	A	A
Cubelles	1	34	A	H	H	A	A	M	M
	1	34	A	H	M	A	A	M	H
	1	35	A	H	H	A	A	M	H
	1	37	A	H	A	A	A	H	H
	1*	35	A	A	M	H	A	H	H
El Prat de Llobregat	1	33	A	H	H	H	A	M	M
Gavà	1	28	M	M	M	M	A	M	M
	1	28	M	M	M	M	A	M	M
	1	28	M	M	M	M	A	M	M
	1	29	M	M	M	H	A	M	M
	1	29	M	M	M	H	A	M	M
	1	30	H	M	M	H	A	M	M
	1	30	H	M	M	H	A	M	M
	1	31	H	M	M	H	A	H	M
	1*	30	M	M	M	H	A	H	M
	1**	32	A	M	M	H	A	H	M
	1**	30	H	M	M	M	A	H	M
Garraf	1**	29	M	M	H	H	H	M	M
Santa Perpètua de la Mogoda	2	40	A	A	A	A	A	A	A
Sant Martí Sarroca	2**	30	H	M	M	H	A	M	M



**Apéndice 3.** Características cromosómicas de los individuos analizados en los Capítulos 5 y 6. N, número de individuos; 2n, número diploide; M, metacéntrico en homocigosis; H, metacéntrico en heterocigosis; A, condición cromosómica telocéntrica.

Localidad	N	2n	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
Ametlla de Segarra	1	39	A	H	A	A	A	A	A
	1	39	A	H	A	A	A	A	A
Arbeca	2	40	A	A	A	A	A	A	A
Badalona	5	40	A	A	A	A	A	A	A
	1	39	A	A	A	A	A	A	H
Cubelles	1	37	A	H	A	A	A	H	H
	1	34	A	H	H	A	A	M	M
	1	34	A	H	M	A	A	M	H
El Prat de Llobregat	1	33	A	H	H	H	A	M	M
	1	35	A	H	M	A	A	H	H
	1	34	A	A	M	A	A	M	M
	1	32	A	M	H	H	A	M	M
	1	31	A	M	M	M	A	H	M
Gavà	1	30	M	M	M	H	A	H	M
	1	32	A	M	M	H	A	H	M
	1	30	H	M	M	H	A	M	M
	1	33	A	M	H	H	A	H	M
Sant Martí Sarroca	1	34	A	M	A	A	A	M	M
	1	32	A	M	M	A	A	M	M
	1	32	A	M	H	A	H	M	M
Santa Perpètua de la Mogoda	6	40	A	A	A	A	A	A	A
Viladecans	1	31	M	M	H	H	A	M	H



#### **Apéndice 4.**

Medarde N, López-Fuster MJ, Muñoz-Muñoz F y Ventura J. 2012. Spatio-temporal variation in the structure of a chromosomal polymorphism zone in the house mouse. *Heredity* 109: 78-89.

## ORIGINAL ARTICLE

# Spatio-temporal variation in the structure of a chromosomal polymorphism zone in the house mouse

N Medarde<sup>1</sup>, MJ López-Fuster<sup>2</sup>, F Muñoz-Muñoz<sup>1</sup> and J Ventura<sup>1</sup>

Several long-term temporal analyses of the structure of Robertsonian (Rb) hybrid zones in the western house mouse, *Mus musculus domesticus*, have been performed. Nevertheless, the detection of gradual or very rapid variations in a zone may be overlooked when the time elapsed between periods of study is too long. The Barcelona chromosomal polymorphism zone of the house mouse covers about 5000 km<sup>2</sup> around the city of Barcelona and is surrounded by 40 chromosome telocentric populations. Seven different metacentrics and mice with diploid numbers between 27 and 40 chromosomes and several fusions in heterozygous state (from one to seven) have been reported. We compare the present (period 2008–2010) and past (period 1996–2000) structure of this zone before examining its dynamics in more detail. Results indicate that there is not a Rb race in this area, which is consistent with the proposal that this zone was probably originated *in situ*, under a primary intergradation scenario. The lack of individuals with more than five metacentrics in heterozygous state in the current period suggests that selection acted against such mice. By contrast, this situation did not occur for mice with fewer than five fusions in heterozygous condition. Changes in human activity may affect the dynamics of gene flow between subpopulations, thus altering the chromosomal composition of certain sites. Although these local variations may have modified the clinal trend for certain metacentrics, the general staggered structure of the zone has not varied significantly in a decade. *Heredity* (2012) **109**, 78–89; doi:10.1038/hdy.2012.16; published online 25 April 2012

**Keywords:** chromosomal polymorphism zone; gene flow; *Mus musculus domesticus*; spatio-temporal analysis; Robertsonian (Rb) fusion

## INTRODUCTION

Chromosomal hybrid zones are regions in which differentiated chromosomal populations come into contact, reproduce and give rise to descendants with mixed karyotypes (Barton and Hewitt, 1985). These zones are of particular interest because they constitute natural scenarios in which to investigate the mechanisms involved in chromosomal speciation. Classical evolutionary models consider hybrid sterility as the main factor involved in these processes, as individuals that are heterozygous for chromosomal rearrangements are partially or totally infertile, due either to segregation problems or to their recombinant products that generate unbalanced gametes. However, a different point of view has been suggested by recent theoretical models, which assume that the reduction of recombination between chromosomes, that are carriers of different rearrangements, is the decisive factor in speciation (see, for example, review in Faria and Navarro, 2010).

The western house mouse, *Mus musculus domesticus*, is a good model to study these evolutionary mechanisms in mammals because of the structural predisposition of its chromosomes to originate Robertsonian (Rb) translocations, centromeric fusions of pairs of acrocentric or telocentric chromosomes to form metacentrics (Gropp and Winking, 1981). Although the species has a standard (St) karyotype of 40 telocentric chromosomes, individuals with 22 to 39 chromosomes have been detected in several natural populations

(see, for example, Piálek *et al.*, 2005). After the arrival of *M. musculus domesticus* in eastern Europe, about 3000 years ago (Cucchi *et al.*, 2005), numerous chromosomal races (contiguous populations that share the same chromosomal composition in the homozygous state; Hausser *et al.*, 1994), or metacentric populations (geographical groupings characterized by the same set of fusions in a fixed or nearly fixed state; Piálek *et al.*, 2005) were described in areas ranging from the Orkney islands (Scotland) to the north of Africa and the Middle East (Adolph and Klein, 1981; Gazave *et al.*, 2003; Piálek *et al.*, 2005; Gündüz *et al.*, 2010).

Contact zones between two races are an interesting scenario for studying evolutionary dynamics in chromosomal rearrangements in a hybrid zone. Although some authors suggest that, theoretically, these zones are ephemeral and unstable (Harrison, 1990), numerous hybrid areas persist spatially and temporally in dynamic equilibrium as tension zones between selection against hybrids and migration (Endler, 1977; Barton and Hewitt, 1985; Barton and Gale, 1993). Thus, spatio-temporal analyses are essential to detect possible time-scale movements that could alter evolutionary outcomes inside the contact zone (Buggs, 2007) and to provide insight into spatial structure and dispersal patterns, low hybrid fitness and selection against those hybrids (Barton and Gale, 1993).

When there is contact between two chromosomal races, differing in only a few metacentrics, gene flow can occur without restrictions

<sup>1</sup>Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain and <sup>2</sup>Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Correspondence: N Medarde or Dr J Ventura, Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Departament de Biologia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Biociències, Campus UAB, Bellaterra, Barcelona E-08193, Spain.

E-mail: NuriaEstel.Medarde@uab.cat or jacint.ventura.queija@uab.cat

Received 25 March 2011; revised 20 December 2011; accepted 16 January 2012; published online 25 April 2012



(Wallace *et al.*, 2002). By contrast, the accumulation of numerous Rb translocations is related to hybrid hypofertility or sterility as a result of alterations in meiotic processes (Wallace *et al.*, 1992; Castiglia and Capanna, 2000). Therefore, high heterozygosity for rearrangements is expected to reduce the fitness of hybrid mice, thus limiting the gene flow between races (Hauffe and Searle, 1998; Nunes *et al.*, 2011).

A Rb polymorphism zone of the western house mouse is found in the vicinity of Barcelona (NE Spain). It spreads over 5000 km<sup>2</sup> and is surrounded by standard populations (Gündüz *et al.*, 2001; Sans-Fuentes *et al.*, 2007). Diploid numbers ( $2n$ ) range between 27 and 39 chromosomes, with the lowest  $2n$  values observed at sites located about 30 km west of the city of Barcelona. This area was first described by Adolph and Klein (1981), and studied more extensively by Gündüz *et al.* (2001) and Sans-Fuentes *et al.* (2007). Seven different metacentrics, Rb(3.8), (4.14), (5.15), (6.10), (7.17), (9.11) and (12.13), with a staggered clinal pattern have been reported. However, no parental Rb race, as defined by Hausser *et al.* (1994), has been found. Therefore, Sans-Fuentes, (2004) proposed that this Rb area should be considered as a polymorphism zone rather than a typical chromosomal hybrid zone. Hence, we can observe an exceptional evolutionary scenario in which Rb individuals not belonging to a chromosomal race, make contact and disperse throughout a region bounded by St mice. This unusual metacentric pattern has not been reported in other Rb contact zones, and our knowledge of the area of Barcelona is relatively limited. Morphological (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2003, 2006, 2011; Sans-Fuentes *et al.*, 2009), ethological (Sans-Fuentes *et al.*, 2005) and reproductive (Sans-Fuentes *et al.*, 2010) studies have revealed differences between St and Rb animals in the area. Nonetheless, dynamics and temporary changes of structure have not been described.

Several long-term spatio-temporal studies of Rb hybrid zones have been reported (Hauffe and Searle, 1993; Castiglia and Capanna, 1999; Faria and Navarro, 2010). However, the detection of gradual variations or rapid changes in a zone may be overlooked when the time

scale is too long. Hence, we carry out mid-term analysis focused on the detection of possible structural variations of the polymorphism area of Barcelona over the past 13 years. This period, in a temperate Mediterranean region, corresponds to nearly 50 generations of mice because of their reproductive characteristics (Castiglia and Capanna, 1999). Thus, we assume that this is time enough to reveal detailed variations, which will allow us to obtain a more accurate vision of the dynamics of the polymorphism area at longer time scales.

Taking all this into account, our research has the following aims: (i) to report information on the past and present structure of the zone regarding the chromosomal composition by site; (ii) to determine local variations, if any, in the chromosomal characteristics and gene diversity over one decade; and (iii) to compare the past and present geographic distribution of each metacentric.

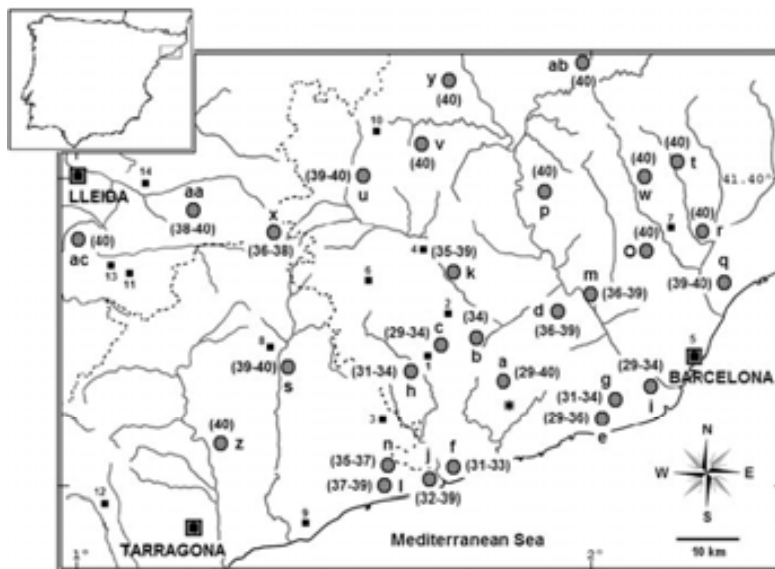
## MATERIALS AND METHODS

### New data

A total of 304 wild mice were live-trapped between 2008 and 2010 in commensal habitats from 29 villages in the Rb polymorphism zone of Barcelona (Figure 1). Karyotypes were determined from bone marrow plates (Ford, 1966) and stained using Wright Staining for G bands (Mandahl, 1992). Chromosomes were identified under optic microscope according to the Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice (1972).

Mean and range of diploid number per site, and metacentric frequencies per site and fusion were calculated. We tested for deviations from Hardy–Weinberg equilibrium using Fisher’s method for each locus in each population (Raymond and Rousset, 1995).

The heterozygosity per site was determined by the mean number of heterozygous chromosomes per individual ( $H$  index), the mean number of alleles in heterozygosity per locus ( $A/I$ ) at each site, and the percentage of mice with one to five metacentrics in heterozygous state throughout the polymorphism zone. The population characteristics of chromosomal heterozygosity per fusion and among all fusions were estimated by Wright’s  $F$ -statistics ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  and  $F_{IT}$ ) by the method described in Weir and Cockerham (1984). Endogamy coefficient ( $F_{IS}$ ) ranges from  $-1$  to  $1$  and is a measure of deviation



**Figure 1** Localities studied from the polymorphism zone of Barcelona (see details in Table 1). Range of diploid numbers ( $2n$ ) found for each site are shown in parenthesis. Sites sampled in 2008–2010 period and those from 1996–2000 survey, used for temporal comparisons, are labelled with a letter. Numbered labels indicate farms sampled in 1996–2000 period, which are deserted in 2008–2010. Asterisk indicates the polymorphism centre of the area.

between genotypic and panmictic frequencies, in terms of excess or deficiency of heterozygotes caused by the overcrossing between related individuals. The standardized variance of allele frequency ( $F_{ST}$ ) ranges from 0 to 1 and evaluates the effect of the genetic subdivision in terms of heterozygous reduction in a population. Total consanguinity coefficient ( $F_{IT}$ ) ranges from -1 to 1 and is associated with the inbreeding degree of individuals related to the whole population. A null distribution of  $F_{ST}$  was generated from 5000 permutations. The observed value was considered significant when it exceeded the 95th percentile of the simulated distribution.

Mean value and s.e. of these parameters were estimated by the Jackknife method (Weir, 1990). A global score ( $U$ ) test among populations for each fusion was performed to quantify the departure of heterozygote deficiency related to the H-W expectations (Rousset and Raymond, 1995).

GENEPOP software version 4.0 (Raymond and Rousset, 1995) was used to obtain metacentric frequencies, H-W equilibrium and global score ( $U$ ) tests. Wright's  $F$ -statistics (estimated values, significance by permutations and jackknifing) were computed with the GENETIX software version 3.3 (Belkhir *et al.*, 1996–1998).

### Temporal analyses

Data reported by Gündüz *et al.* (2001) and Sans-Fuentes (2004), corresponding to the structure of the Rb polymorphism zone of Barcelona during the period 1996–2000, were pooled in order to compare: (i) the chromosomal characteristics by site (frequencies, diploid numbers and heterozygosity); (ii) the population subdivision among fusions ( $F$ -statistics); and (iii) the clinal pattern for each fusion.

Sites with Rb mice were selected for both temporal samples to contrast: first, the mean and range of diploid numbers, the  $H$  index, the proportion of individuals with one to five metacentrics in heterozygous condition and the mean  $A/I$  for each site; and second, the  $F$ -statistics ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$ ,  $F_{IT}$ ) for each metacentric. In order to test temporal differences in the frequency per fusion and site, a gene variation exact test ( $G$  test) was computed for the same polymorphic sites sampled for both periods (Garraf, Gavà, Vilanova i la Geltrú, Viladecans, La Granada, Sant Martí Sarroca, Sant Sadurn d'Anoia, Calafell, Bellaterra, Les Pobles and Santa Coloma de Queralt) by means of GENEPOP software version 4.0 (Raymond and Rousset, 1995).

As mice from villages lying to the north of Barcelona presented St or close to St karyotype, only the sites from the west of the distribution area were used to perform the clinal comparisons between 1996–2000 and 2008–2010 periods (following the criterion described in Gündüz *et al.*, 2001). The centre of the polymorphism area was calculated as the mean point between localities with the highest level of polymorphism (Garraf, Viladecans, La Granada, El Prat de Llobregat, Gavà and Sant Martí Sarroca). A logistic function ( $f(x) = \frac{e^{s(x-c)}}{1 + e^{s(x-c)}}$ ) was calculated to fit the metacentric clines, where  $x$  is the geographic distance from the polymorphism centre, and  $s$  and  $c$  the maximum slope and the centre of the cline, respectively. The width ( $w$ ) was calculated as the absolute value of 4 divided by the maximum slope ( $s$ ) according to Endler (1977). The software package C-Fit 6 (devised by T Lenormand) was used to obtain the parameters  $c$  and  $s$  and to compute those corresponding maximum likelihood values for each pair of clines using the metropolis algorithm (Szymura and Barton, 1986). To examine differences between clines, it was assumed that twice the difference in  $\log_e$  likelihood values between constrained and unconstrained model (on cline centre for coincidence and on cline slope for concordance) follows a  $\chi^2$  distribution with  $df$  equal to the difference of the parameters estimated (Fel-Clair *et al.*, 1996). We used Bonferroni corrections to account for concordance and coincidence multiple testing (described in Sokal and Rohlf, 1995). Individuals with incomplete karyotype information and sites with <4 individuals were excluded from all the computed analyses.

## RESULTS

### New data

The chromosomal characteristics of mice from the polymorphism zone of Barcelona corresponding to the period 2008–2010 are summarized in Table 1 and Figure 1. The seven Rb metacentrics described to date [Rb(3.8), (4.14), (5.15), (6.10), (7.17), (9.11) and (12.13)] were detected throughout the area studied. Diploid numbers

ranged from 29 to 40 chromosomes and no individual with the seven metacentrics in the homozygous state ( $2n = 26$  chromosomes) was found. A total of 106 different karyotypes were observed. The lowest mean diploid numbers were detected in animals from La Granada ( $2n = 31.56$ ), Gavà ( $2n = 30.50$ ), Viladecans ( $2n = 31.66$ ) and El Prat de Llobregat ( $2n = 31.79$ ). The range of  $2n$  was broad at sites located near the centre of the polymorphism area (Garraf:  $2n = 29$ –40; Gavà:  $2n = 29$ –36; Vilanova i la Geltrú:  $2n = 31$ –38). Rb(4.14) and (12.13) were the most widely distributed throughout the zone with a frequency of 0.52 and 0.51, respectively. Rb(9.11) and (5.15) also showed relatively high frequencies (0.49 and 0.41), whereas Rb(6.10), (3.8) and, particularly, Rb(7.17) had a more restricted distribution (frequencies: 0.20, 0.12 and 0.01, respectively). Rb(7.17) was detected at low frequencies and only in Garraf (0.08) and Sant Martí Sarroca (0.11). No significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were found ( $P > 0.05$  for all sites and fusions). This result was supported by the  $F_{IS}$  estimator, close to 0 for all Rbs (Table 2).

Results demonstrated that mice with high structural heterozygosity were commonly present throughout the area studied. Only 20 out of the 205 individuals with metacentrics were homozygous for all fusions, whereas the rest were heterozygous for at least one fusion. The mean number of heterozygous metacentrics per individual ( $H$ ; Table 1) and the mean number of alleles per locus ( $A/I$ ; Table 3) showed that mice with the highest number of metacentrics in heterozygosity were located close to the polymorphism centre (Garraf:  $H = 2.61$ ,  $A/I = 2.00$ ; La Granada:  $H = 2.56$ ,  $A/I = 1.86$ ; Viladecans:  $H = 2.55$ ,  $A/I = 1.86$ ; El Prat de Llobregat:  $H = 2.03$ ,  $A/I = 1.86$ , and Cubelles:  $H = 2.28$ ,  $A/I = 1.86$ ). Heterozygous mice for one (28.64%), two (30.81%), three (24.86%) or four (18.91%) fusions were common within the area, while those carrying five fusions in heterozygous state were scarce (1.85%). No individuals heterozygous for more than five metacentrics were found.

Values of  $F$ -statistics are shown in Table 2. For overall Rbs,  $F_{ST}$  and  $F_{IT}$  statistics were significant (all  $P < 0.05$ ) indicating a moderate deficit of heterozygotes among subpopulations and within the whole Rb population. Nevertheless, the  $U$  test for heterozygote deficiency did not show significant departures from equilibrium assumptions ( $P > 0.05$  for all sites and each fusion).

Despite the absence of a Rb race, chromosomal clines were defined from the region with the highest metacentric frequencies towards the periphery with St animals. The cline fitted for each fusion is shown in Figure 2. Rb(7.17) was not considered because of its limited geographic distribution. Polymorphic sites with the highest metacentric frequencies were mainly located along 25 km from the polymorphism centre. Further from the centre these frequencies diminished and, consequently, diploid numbers increased. Mice trapped at a distance of 30 km from the centre carried a moderate number of fusions, and those trapped more than 35 km away generally had standard karyotypes. Concordance likelihood tests did not reveal significant differences in distribution pattern among metacentrics, whereas Rb(3.8) and Rb(6.10) clines were significantly non-coincident ( $P < 0.01$ ), showing the centres of distribution displaced (Table 4).

### Temporal analyses

In order to perform comparisons by site, chromosomal characteristics and gene diversity statistics corresponding to the earlier period (1996–2000) were calculated (Tables 1, 2 and 3). Chromosomal variations occurred in several of the sites resampled. An increase in the mean and ranges of  $2n$  in almost all localities was found in the period 2008–2010. Comparisons of metacentric frequencies between

**Table 1 Sites and chromosomal characteristics of mice from the polymorphism area of Barcelona corresponding to the periods 2008–2010 and 1996–2000 (see also Figure 1)**

Site <sup>a</sup>	km	N <sup>b</sup>	Mean 2n	Range 2n	H <sup>c</sup>	Frequencies of metacentric chromosomes						
						3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
<i>2008–2010 period</i>												
a. Garraf	3.5	13	32.76	29–40	2.61	0.51	0.73	0.42	0.35	0.08	0.74	0.78
b. Sant Pau d'Ordal	8.4	1	34.00	34	4	0	0.50	0.50	1	0	0.50	0.50
c. La Granada	12.4	16	31.56	29–34	2.56	0.46	0.87	0.81	0.44	0	0.81	0.81
d. Corbera de Llobregat	12.8	8	37.00	36–39	1.25	0	0.62	0.13	0	0	0.44	0.31
e. Gavà	13.1	13(1)	30.50	29–36	1.46	0.31	0.88	0.88	0.73	0	0.96	0.96
f. Vilanova i la Geltrú	14.2	6	33.66	31–38	1.33	0.16	0.75	0.83	0	0	0.67	0.75
g. Viladecans	14.3	9	31.66	30–34	2.55	0.33	0.72	0.78	0.72	0	0.89	0.72
h. Sant Martí Sarroca	16.4	9	32.77	31–34	1	0	1	0.67	0	0.11	0.94	0.89
i. El Prat de Llobregat	19.5	27	31.79	29–34	2.03	0.13	0.70	0.91	0.65	0	0.81	0.91
j. Cubelles	19.6	14(3)	34.85	32–39	2.28	0.04	0.42	0.64	0.18	0	0.68	0.61
k. Sant Sadurní d'Anoia	19.9	19(2)	37.21	35–39	1.42	0	0.61	0	0	0	0.37	0.42
l. Calafell	20.0	19	37.76	37–39	1.84	0.07	0.28	0	0.08	0	0.16	0.53
m. El Papiol	20.1	8	37.62	36–39	0.87	0	0.13	0.25	0	0	0.69	0.06
n. Bellvei	24.4	6	36.16	35–37	1.83	0	0.501	0.16	0.25	0	0.42	0.58
o. Bellaterra	28.1	7	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
p. Vacarisses	31.6	7	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
q. Badalona	36.0	11(2)	39.84	39–40	0.15	0	0	0	0	0	0	0
r. Sta. Perpètua de la Mogoda	36.8	10	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
s. Les Pobles	37.4	13(2)	39.83	39–40	0.15	0	0	0.08	0	0	0	0
t. Castellar del Vallès	37.7	8	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
u. Jorba	39.4	3	39.66	39–40	0.33	0	0.16	0	0	0	0	0
v. Castellfollit del Boix	39.9	14	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
w. Caldes de Montbui	42.8	2	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
x. Santa Coloma de Queralt	45.1	7	36.86	36–38	1.71	0	0.71	0.50	0	0	0	0.36
y. Fals	48.2	3(2)	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
z. Nulles	49.6	7	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
aa. Ametlla de Segarra	57.7	9	39.44	38–40	0.33	0	0.27	0	0	0	0	0
ab. Olost	75.7	16(1)	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
ac. Arbeca	81.1	6	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>1996–2000 period</i>												
a. Garraf	3.5	34	30.22	28–35	1.82	0.69	0.86	0.77	0.72	0.07	0.97	0.79
1. Avinyonet del Penedès	7.4	4	31.20	30–33	0.25	0	1	0.88	0.50	0	1	1
b. Sant Pau d'Ordal	8.7	55	30.15	28–34	1.22	0.44	0.95	1	0.69	0	0.90	0.93
2. Lavern	10.0	24	32.12	31–33	1.46	0	0.79	0.81	0.37	0	1	0.95
c. La Granada	12.4	67	30.79	27–35	1.79	0.44	0.98	0.89	0.32	0.14	0.84	0.89
e. Gavà	13.1	9	30.22	29–32	1.33	0.55	1	1	0.38	0	1	0.94
f. Vilanova i la Geltrú	14.2	36	31.89	30–34	1.33	0.24	0.90	0.82	0.12	0.04	0.93	0.94
g. Viladecans	14.3	4	30.20	29–31	0.75	0.12	1	0.75	1	0	1	1
h. Sant Martí Sarroca	16.4	4	32.50	32–33	0.50	0	1	1	0	0	0.75	1
k. Sant Sadurní d'Anoia	19.9	7	34.70	33–37	1.57	0	0.71	0.64	0.07	0	0.57	0.50
l. Calafell	20.0	20	36	35–37	1.30	0	0.75	0.15	0	0.02	0.17	0.90
3. Llorenç del Penedès	24.6	5	36.60	36–38	2.20	0	0.50	0.50	0	0	0.30	0.40
4. Vallbona d'Anoia	25.1	6	39.33	37–40	0.20	0	0	0	0	0	0	0.10
5. Barcelona	27.8	13	34.07	32–36	1.46	0.15	0.31	0.53	0	0	1	0.96
o. Bellaterra	28.1	31	39	38–40	0.32	0	0.06	0.08	0	0	0	0.03
6. La Llacuna	31.1	5	35.80	35–37	1.50	0	0.25	0.25	0	0	0.25	1
7. Sabadell	33.2	9	38.55	38–39	0.56	0	0	0	0	0	0	0.72
s. Les Pobles	37.4	23	33.12	37–40	1.17	0.02	0.22	0.26	0	0	0	0.17
8. Les Ordes	38.3	1	38	38	0	0	1	0	0	0	0	0
9. La Riera	44.3	11	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
x. Santa Coloma de Queralt	45.1	7	38.30	37–40	1.14	0	0.57	0.07	0	0	0	0.14
10. Calaf	49.6	8	39.50	38–40	0.17	0	0.08	0	0	0	0	0
11. Fullella	70.4	22	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
12. Les Borges del Camp	71.2	5	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
13. L'Espuga Calba	73.0	9	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0
14. Anglesola	73.6	5	39.60	39–40	0.40	0	0.20	0	0	0	0	0

<sup>a</sup>Sites are ordered according to distance (km) of each site (a–ac, 1–14) from the centre of polymorphism area. Sites numbered from 1 to 14 correspond to farms departed or which no mice were trapped during 2008–2010 period.

<sup>b</sup>N refers to numbers of mice for which the full karyotype (diploid number and metacentrics identification) has been determined. Numbers in parentheses refer to additional animals for which karyotype was not completely identified.

<sup>c</sup>H is the mean number of fusions in heterozygous state per individual.

**Table 2**  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  and  $F_{IT}$ , estimated according to Weir and Cockerham (1984), and Mean  $F$ -statistics and s.e., obtained by jackknifing bootstrap, for each and for overall loci in 2008–2010 and 1996–2000 periods

Rb	$F_{IS}$	Mean $F_{IS}$	s.e.	$F_{ST}$	Mean $F_{ST}$	s.e.	$F_{IT}$	Mean $F_{IT}$	s.e.
<i>2008–2010</i>									
3.8	-0.0544	-0.0562	0.0227	0.2345*	0.2369	0.0638	0.1929*	0.1942	0.0716
4.14	0.0078	-0.0009	0.0755	0.2789*	0.2783	0.0968	0.2845*	0.2787	0.1162
5.15	0.0749	0.0697	0.0759	0.5372*	0.5506	0.1023	0.5719*	0.5809	0.0961
6.1	-0.1186	-0.1249	0.0519	0.4063*	0.4095	0.0746	0.3358*	0.3375	0.1013
7.17	-0.0594	-0.0594	0.0288	0.0523	0.0472	0.0287	0.0040	-0.0103	0.008
9.11	0.0770	0.0788	0.0787	0.4377*	0.4369	0.0959	0.4810*	0.4795	0.0891
12.13	-0.0315	-0.0361	0.1096	0.3909*	0.3919	0.1143	0.3717*	0.3712	0.1388
All	-0.0034	-0.0025	0.0283	0.3925*	0.3946	0.0438	0.3904*	0.3936	0.0539
<i>1996–2000</i>									
3.8	0.0104	0.0121	0.0512	0.2999*	0.2799	0.1033	0.3072*	0.2916	0.1274
4.14	-0.0191	0.0202	0.0907	0.5633*	0.5871	0.1351	0.5549*	0.5834	0.1592
5.15	0.0499	0.0540	0.0715	0.5194*	0.5276	0.1153	0.5434*	0.5509	0.1053
6.1	0.0406	0.0460	0.0916	0.3860*	0.3791	0.1115	0.4109*	0.4104	0.1338
7.17	-0.0289	-0.1182	0.1933	0.0596	0.0831	0.0446	0.0325	0.0354	0.1466
9.11	0.1437	0.1809	0.1531	0.7041*	0.7055	0.1298	0.7466*	0.7499	0.1025
12.13	-0.0659	-0.0681	0.0572	0.5498*	0.5859	0.1798	0.5202*	0.5572	0.1926
All	0.0205	0.0206	0.0204	0.4937*	0.4963	0.0595	0.5041*	0.5713	0.0630

Abbreviations:  $F_{IS}$ , endogamy coefficient;  $F_{IT}$ , total consanguinity coefficient;  $F_{ST}$ , standardized variance of allele frequency. Asterisk indicates significant values at  $P < 0.05$ .

subpopulations ( $G$ -test) revealed temporal changes in animals from Calafell (Rb(4.14),  $P < 0.001$ ; Rb(5.15),  $P = 0.025$ ; Rb(6.10),  $P = 0.011$ ; Rb(12.13),  $P < 0.001$ ), Garraf (Rb(5.15),  $P = 0.002$ ; Rb(6.10),  $P = 0.001$ ; Rb(9.11),  $P = 0.001$ ), Sant Sadurn d'Anoia (Rb(5.15),  $P < 0.001$ ; Rb(9.11),  $P = 0.032$ ), Les Pobles (Rb(4.14),  $P = 0.007$ ; Rb(12.13),  $P = 0.023$ ), La Granada (Rb(4.14),  $P = 0.011$ ), Gavà (Rb(6.10),  $P = 0.031$ ), Vilanova i la Geltrú (Rb(9.11),  $P = 0.019$ ) and Santa Coloma de Queralt (Rb(5.15),  $P = 0.032$ ). Individuals from Viladecans, Garraf and La Granada showed a high increase in  $H$  index in the present period (from 0.75 to 2.55, 1.82 to 2.61 and 1.79 to 2.56, respectively; Table 1). Although data from Sant Martí Sarroca, Calafell and Santa Coloma de Queralt indicated an increase in  $H$  values, the trend was quite moderate. A reduction in mean heterozygous chromosomes was found in animals from Bellaterra and Les Pobles (Table 1). In Bellaterra, mice carrying several fusions (Rb(4.14), (5.15) and (12.13)) were described in the 1996–2000 period, whereas no metacentrics were found in our survey.

The inter-sample karyotypic heterogeneity per metacentric obtained for both periods was high, indicating differentiation between subpopulations (Table 2). However, Rb(12.13), (4.14) and, especially, Rb(9.11)  $F_{ST}$  values indicated a stronger differentiation between subpopulations in the earlier period.

The clinal parameters (centres and widths) fitted for the two periods studied (1996–2000 and 2008–2010) are illustrated in Figure 3. Concordance likelihood tests did not show significant changes in the general trend of the width between periods, while coincidence tests revealed noticeable differences in centres of Rb(4.14), (6.10) and in lesser extent, Rb(5.15), (Figure 3). These results indicated that slight temporal changes in the geographic distribution of some metacentrics had occurred, although the Rb structure of the zone had remained relatively stable between both periods.

## DISCUSSION

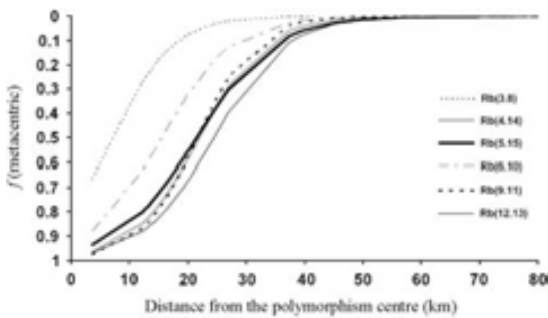
Previous studies of the polymorphism zone of Barcelona (Adolph and Klein, 1981; Nachman *et al.*, 1994; Gündüz *et al.*, 2001; Muñoz-Muñoz *et al.*, 2003) hypothesized the presence of a chromosomal race with all fusions in the homozygous state. The data examined in these studies together with the results reported here represent a general survey, covering about 45 sites and the capture of more than 600 specimens. This information treated as a whole allows us to indicate that in the Barcelona zone there is no parental Rb race, as defined by Hausser *et al.* (1994). Further, metacentric combinations obtained in each locality (Appendix) also fail to support the hypothesis of a specific metacentric population with a set of fusions fixed in the homozygous state, *sensu* Piálek *et al.* (2005), a less strict definition of a chromosomal evolutionary entity than the Rb race proposed by Hausser *et al.*, 1994. Therefore, as suggested by Sans-Fuentes (2004), it seems more appropriate to define this area as a polymorphism zone rather than a hybrid zone between two chromosomal races.

Laboratory studies in the house mouse demonstrate that Rb translocations appear spontaneously at high frequencies because of the presence of DNA sequences that make such rearrangements possible (Nachman and Searle, 1995). The presence of one fusion could increase the mutation rate, facilitating the appearance of new fusions (Gündüz *et al.*, 2001). These high mutation rates supported by the effect of genetic drift, inbreeding or the meiotic drift in small and isolated subpopulations, might explain the high fixation ratio for the Rb fusions in the whole population (Hedrick, 1981; Michalakis and Olivieri, 1993; Piálek *et al.*, 2005). Consequently, metacentric populations may be originated *in situ* by the successive accumulation of Rb fusions in the same geographical area (Britton-Davidian *et al.*, 1989). However, it must be kept in mind that selection does not act equally for all metacentrics. Recent studies demonstrate that factors, such as genomic characteristics or the morphology of the

**Table 3 Genetic diversity indexes for the Rb sites studied**

Site	$H_{exp}$	$H_{obs}$	$P(0.95)^a$	$P(0.99)^a$	A/I
<i>2008–2010 period</i>					
a. Garraf	0.3838	0.3736	1	1	2
c. La Granada	0.3033	0.3661	0.8571	0.8571	1.8571
d. Corbera de Llobregat	0.2299	0.1786	0.5714	0.5714	1.5714
e. Gavà	0.1965	0.2088	0.5714	0.5714	1.5714
f. Vilanova i la Geltrú	0.25	0.1905	0.7143	0.7143	1.7143
g. Viladecans	0.3131	0.3651	0.8571	0.8571	1.8571
h. Sant Martí Sarroca	0.2157	0.1746	0.7143	0.7143	1.7143
i. El Prat de Llobregat	0.2481	0.2857	0.8571	0.8571	1.8571
j. Cubelles	0.3178	0.3265	0.7143	0.8571	1.8571
k. Sant Sadurní d'Anoia	0.2044	0.203	0.4286	0.4286	1.4286
l. Calafell	0.2157	0.2707	0.7143	0.7143	1.7143
m. El Papiol	0.1629	0.0714	0.4286	0.4286	1.4286
n. Bellvei	0.3036	0.2619	0.7143	0.7143	1.7143
s. Les Pobles	0.0203	0.022	0.1429	0.1429	1.1429
x. Santa Coloma de Queralt	0.1953	0.2245	0.4286	0.4286	1.4286
aa. Ametlla de Segarra	0.0573	0.0476	0.1429	0.1429	1.1429
<i>1996–2000 period</i>					
a. Garraf	0.2748	0.2647	0.8571	1	2
b. Sant Pau d'Ordal	0.1890	0.1740	0.5714	0.7143	1.7143
c. La Granada	0.2646	0.2559	0.8571	1	2
e. Gavà	0.1534	0.1905	0.4286	0.4286	1.4286
f. Vilanova i la Geltrú	0.2029	0.1931	1	1	2
g. Viladecans	0.0848	0.1071	0.2857	0.2857	1.2857
h. Sant Martí Sarroca	0.0536	0.0714	0.1429	0.1429	1.1429
k. Sant Sadurní d'Anoia	0.2843	0.2245	0.7143	0.7143	1.7143
l. Calafell	0.1639	0.1857	0.5714	0.7143	1.7143
o. Bellaterra	0.0473	0.0415	0.2857	0.4286	1.4286
s. Les Pobles	0.1508	0.1677	0.4286	0.5714	1.5714
x. Santa Coloma de Queralt	0.1254	0.1633	0.4286	0.4286	1.4286
1. Avinyonet del Penedès	0.1027	0.0357	0.2857	0.2857	1.2857
2. Lavern	0.1690	0.2083	0.4286	0.5714	1.5714
3. Llorenç del Penedès	0.2714	0.3143	0.5714	0.5714	1.5714
4. Vallbona d'Anoia	0.0457	0.0571	0.1429	0.1429	1.1429
5. Barcelona	0.1796	0.2088	0.4286	0.5714	1.5714
7. Sabadell	0.0536	0.0714	0.1429	0.1429	1.1429
10. Calaf	0.0218	0.0238	0.1429	0.1429	1.1429
14. Anglesola	0.0457	0.0571	0.1429	0.1429	1.1429

Abbreviations: A/I, Mean number of alleles in heterozygosity per locus in each site;  $H_{exp}$  and  $H_{obs}$ , expected and observed heterozygosity for all locus in each Rb population.  
<sup>a</sup>Polymorphism of each site for all locus at 95% or at 99% of confidence threshold.



**Figure 2** Metacentric clinal pattern fitted for the 2008–2010 period. The variation in frequencies across the western area of the polymorphism zone of Barcelona was represented for all fusions except Rb(7.17).

**Table 4 Tests of concordance (above diagonal) and coincidence (below diagonal) of metacentric clines corresponding to the period 2008–2010**

Metacentric	3.8	4.14	5.15	6.10	9.11	12.13	All
3.8	–	0.15	1.31	0.38	0.06	0.61	2.17
4.14	119.48**	–	0.76	0.08	0.56	0.19	1.65
5.15	84.81**	0.17	–	0.23	2.66	0.19	0.02
6.10	19.98**	37.48**	25.69**	–	0.92	0.01	0.51
9.11	141.39**	0.11	0.019	37.76**	–	1.46	5.16
12.13	147.43**	4.19	5.28	64.15**	6.26	–	0.55
All	160.74**	27.07**	15.01**	7.13	28.36**	58.03**	–

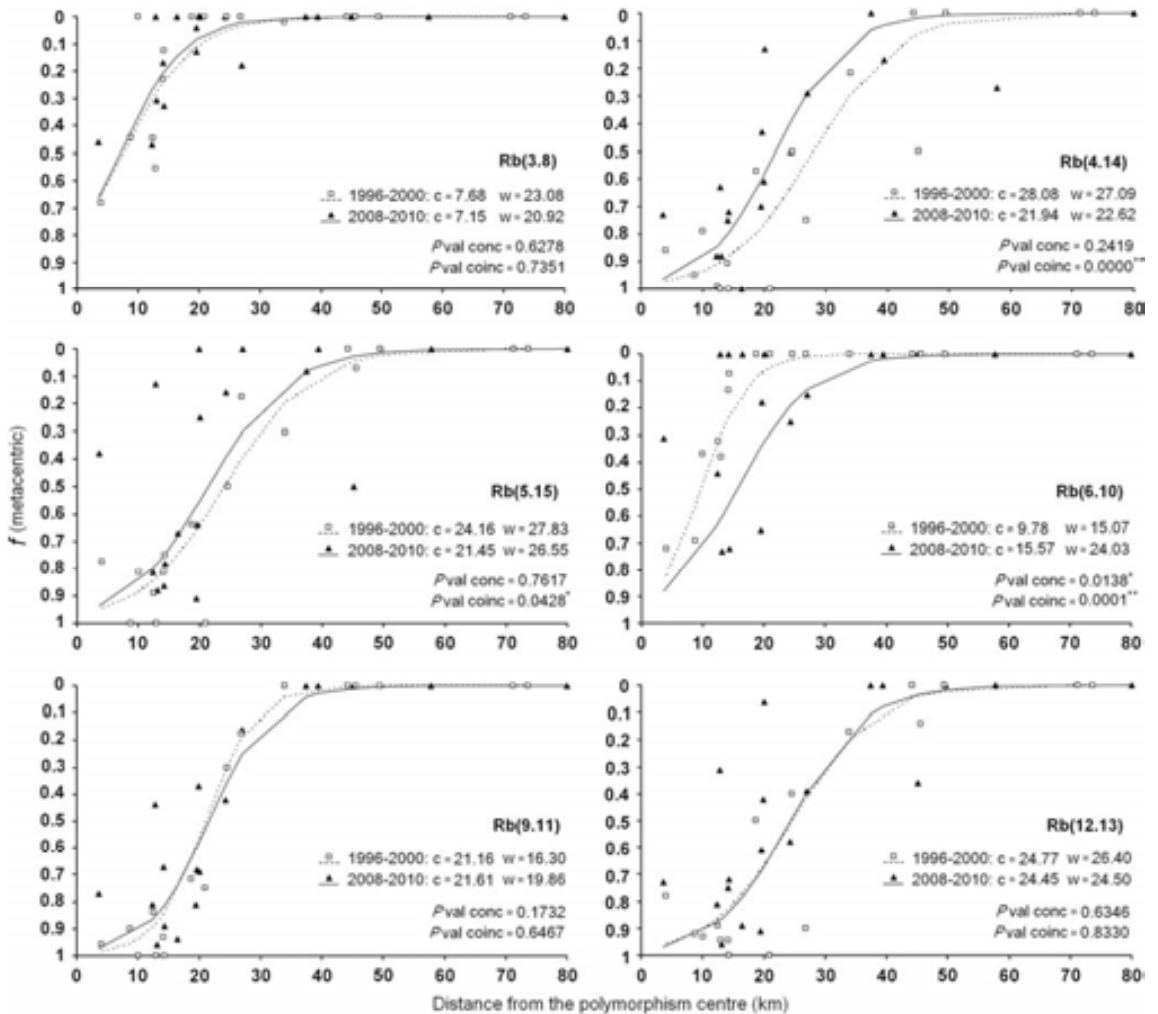
These are the  $\chi^2$  values obtained in the comparison between constrained and unconstrained maximum likelihood models for cline slopes (concordance) and cline centres (coincidence). The significance level was obtained after Bonferroni correction. Double asterisk indicates significant values at  $P < 0.01$ .

chromosomes involved in the fusions, may affect the formation of some combinations of metacentrics negatively, reducing their fixation rate in the population (see Sans-Fuentes *et al.*, 2007; and references therein).

Chromosomal data showed that, in both periods analysed, the animals with the highest number of fusions were confined to the same area, close to the sites of Garraf and Viladecans, indicating that the polymorphism centre is located in the surrounding areas. However, the mean and range of diploid numbers increased around this centre from one period (1996–2000) to the next (2008–2010), and one animal with the standard karyotype was even found in Garraf (see Table 1). These results suggest that processes of introgression of animals, carrying diverse chromosomal combinations, towards the centre of polymorphism may alter the expected metacentric frequencies in the area. The arrival of allochthonous mice in the centre of a metacentric zone has also been reported in Rb populations from Italy (Franchini *et al.*, 2007; Castiglia and Capanna, 1999) and Madeira (Nunes *et al.*, 2005). In those cases, as may also occur in the Rb zone of Barcelona, the action of humans on the natural landscape has influenced the dynamics of commensal mice (Chatti *et al.*, 1999; Castiglia and Capanna, 1999). Passive transport via vehicles, especially in farming areas, may have promoted introgression events independently of the common mouse dispersion (Cucchi *et al.*, 2005; Franchini *et al.*, 2007). Hence, interaction between mice with differing degrees of polymorphism could explain the increase in the heterozygosity per site ( $H$  index and A/I) as well as the percentage of individuals with several heterozygous chromosomes detected in the last period.

$F_{ST}$  values for both temporal samples (1996–2000 and 2008–2010) indicate significant levels of genetic fragmentation within populations in the area studied. Even, the values were lower for the latest period (2008–2010) suggesting a slight genotypic homogenization between sites.

According to Franchini *et al.* (2007) genetic fragmentation can be explained by the typical population dynamics of the house mouse, where commensalism has an important role limiting dispersal between sites. Hence, an increase in the heterogeneity of the distribution of some agricultural zones, related to the replacement of farms by urban zones, (as occurs in the vicinity of the cities of Barcelona, Tarragona and Lleida), and the conversion of traditional agriculture to intensive practices may have produced the isolation of specific polymorphic populations, allowing the fixation of fusions by genetic drift or inbreeding effects. This would explain the



**Figure 3** Comparison of clinal patterns for each metacentric between 1996–2000 and 2008–2010 periods. Asterisk indicates significant values at  $P < 0.05$ ; Double asterisk designates significant values at  $P < 0.01$  after Bonferroni correction. Abbreviations:  $c$ , centre of the clines fitted;  $Pval\ conc$ , probability of concordance obtained in the maximum likelihood test between constrained and unconstrained models for clinal widths;  $Pval\ coinc$ , probability of coincidence obtained in the maximum likelihood test between constrained and unconstrained models for clinal centres;  $w$ , width of the clines fitted.

unexpectedly high frequencies of some fusions for animals trapped far from the centre of the area (for example, sites  $x$ ,  $aa$ ) as well as the subdivision detected in the Rb area of Barcelona.

Fluctuations in genetic subdivision between the two time periods could arise as a consequence of the recent apparition of some of the chromosomal mutations detected in the area. If so, it could be assumed that the Rb population has not already reached its own migration–drift balance and that the differences in  $F_{ST}$  detected between the two time periods could simply reflect the system approaching equilibrium. Nevertheless, if migration–drift equilibrium has been reached, passive transport of animals associated with human activities could produce a genotypic homogenization between demes, thus varying the  $F_{ST}$  values in the population (see for example, Castiglia and Capanna, 1999).

Classical theories of hybrid fitness suggest that mice with some heterozygous translocations tend to be eliminated from the hybrid zones because of their adverse effect on fertility due to the high percentage of aneuploid gametes (Wallace *et al.*, 1992; Hauffe and Searle, 1998). Conversely, in the Rb polymorphism zone of Barcelona, mice with six or even seven heterozygous fusions were reported in the 1996–2000 period. Indeed, individuals with one to four metacentrics in the heterozygous state were commonly detected in the current sample. *A priori*, this situation suggests that selection against hybrids was not as strong as expected. However, individuals with more than five heterozygous fusions were not found in the period 2008–2010. This situation may indicate that selection acts against hybrids only when individuals present more than five fusions in the heterozygous state. This is consistent with the results reported in other Rb systems

of the house mouse, according to which the presence of one to three fusions in the heterozygous state was not related to significant alterations in reproduction (Wallace *et al.*, 1992, 2002).

In models of selection against hybrids, the width of a metacentric cline, assumed as a parameter of the extent of gene flow at the centre of the zone, may provide supplementary information about the reproductive isolation of a hybrid zone (Barton and Gale, 1993). Especially, when genetic flow occurs and there is no strong effect against hybrids, clines tend to be wide (Sage *et al.*, 1993). Analyses from the general clinal trend in the polymorphism zone of Barcelona showed several broad metacentric clines (Figure 2), indicating that gene flow between St and Rb mice occurs. This finding concurs with the results for the chromosomal parameters (range and mean of  $2n$ ,  $H$ ,  $A/I$  per site and frequencies for each metacentric), in which genetic exchange between populations may have an important role.

Comparative analyses among clines corresponding to the 2008–2010 period indicated that all fusions follow a concordant pattern across the area studied. By contrast, the non-coincidence of the centres for Rb(3.8) and (6.10) significantly displaced from the rest of clines indicated a staggered structure. When substantial chromosomal differences between St and Rb races are found, as in mice from Italy (Franchini *et al.*, 2010) and Tunisia (Saïd *et al.*, 1999), selective forces tend to preserve the clines together due to hybrid unfitness (Searle, 1993). By contrast, staggering can occur when those chromosomal differences are fewer and constraining forces are weaker, for example, in primary contact between St and Rb animals with few fusions. Considering that the presence of a Rb translocation leads to the appearance of new chromosomal fusions (Winking, 1986), under a primary contact scenario, the staggering of the clines could reflect the order of appearance of the fusions. The most widespread (that is, Rb(12.13)) would be the earliest formed, and those with the smallest distribution (Rb(3.8) and (7.17)) would be the most recent (Figure 3). The primary contact hypothesis is supported by the fact that the combination of metacentrics of the Barcelona polymorphism zone has not been reported elsewhere (Piálek *et al.*, 2005) and that metacentrics shared with other Rb systems have an independent origin (Riginos and Nachman, 1999). Although staggered clines have also been detected in other Rb zones of *M. musculus domesticus*, the presence of metacentric races in close geographic regions supports the hypothesis of secondary contact in these areas (Gündüz *et al.*, 2010).

Clinal comparison for each fusion indicated that the general clinal structure of the metacentrics did not change significantly between 1996–2000 and 2008–2010. Nevertheless, the Rb(4.14), (6.10) and (5.15) showed variation in the position of their cline centres. Although the current trend shows a backward movement for Rb(4.14) and Rb(5.15) towards the centre of polymorphism, the clines of Rb(6.10) indicate that this fusion has spread over the last decade. Hybrid zones can move when ecological (Bull and Burzacott, 2001), behavioural (Cabrero *et al.*, 1999; Leaché and Cole, 2007) or some other kind of advantage for one hybridizing taxa (Dorken and Pannell, 2007) occurs. In this case the zone would move in favour of the superior taxon (Barton and Hewitt, 1985; Yannic *et al.*, 2009). Otherwise, the movement of these zones could also take place to local regions of low dispersal or low population density (Barton and Hewitt, 1985). In the Rb polymorphism zone around Barcelona, the disequilibrium between anthropogenic activities (urbanization, commercial transport or desertion of rural zones) and dynamics on mice raciation may be responsible for the movement of the centre of metacentric clines. The magnitude and frequency of these events, as well as the fixation degree of each fusion in each population, may

indirectly alter the selection/dispersal balance in the tension zone. Therefore, intrinsic variations in local chromosomal composition may reverberate under the global structure of the contact zone. Nevertheless, it is necessary to continue evaluating the effects of complex local variations under the global clinal pattern to avoid overestimation of the changes detected between periods.

#### DATA ARCHIVING

There were no data to deposit.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Josep Medarde, María Casado and Ramón Solís for their help in the field work; Laia Capilla, Marta Blanc and Álex Sánchez for support in the laboratory and Maria Assumpció Sans-Fuentes for technical assistance. We also thank three anonymous reviewers for their helpful comments and suggestions. This work was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (project number CGL2007–62111) and by a PIF grant from the Universitat Autònoma de Barcelona to NM. Thanks also to Robin Rycroft (Servei d'Assessorament Lingüístic, Universitat de Barcelona) for revising the English.

- Adolph S, Klein J (1981). Robertsonian variation in *Mus musculus* from Central Europe, Spain, and Scotland. *J Hered* **72**: 219–221.
- Barton NH, Hewitt GM (1985). Analysis of hybrid zones. *Annu Rev Ecol Systematics* **16**: 113–148.
- Barton NH, Gale KS (1993). Genetic analysis of hybrid zones. In: Harrison RG (ed.) *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press: New York, pp 13–45.
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F (1996–1998). *GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire du Génome et Populations, CNRS UPR 9060. Université de Montpellier II: Montpellier, France.
- Britton-Davidian J, Nadeau JH, Croset H, Thaler L (1989). Genic differentiation and origin of Robertsonian populations of the house mouse (*Mus musculus domesticus* Ruty). *Genet Res* **53**: 29–44.
- Buggs RJA (2007). Empirical study of hybrid zone movement. *Heredity* **99**: 301–312.
- Bull CM, Burzacott D (2001). Temporal and spatial dynamics of a parapatric boundary between two Australian reptile ticks. *Mol Ecol* **10**: 639–648.
- Cabrero J, Shapiro LH, Camacho JPM (1999). Male sterility in interspecific Meadow Katydid hybrids. *Heredity* **131**: 79–82.
- Castiglia R, Capanna E (1999). Contact zones between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 1. Temporal analysis of a hybrid zone between the CD chromosomal race ( $2n=22$ ) and populations with the standard karyotype. *Heredity* **83**: 341–359.
- Castiglia R, Capanna E (2000). Contact zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 2. Fertility and segregation in laboratory-reared and wild mice heterozygous for multiple Robertsonian rearrangements. *Heredity* **85**: 147–156.
- Chatti N, Ganem G, Benzekri K, Catalan J, Britton-Davidian J, Saïd K. (1999). Microgeographical distribution of two chromosomal races of house mice in Tunisia: pattern and origin of habitat partitioning. *Proc R Soc Lond* **266**: 1561–1569.
- Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice (1972). Standard karyotype of the mouse, *Mus musculus*. *Heredity* **63**: 69–72.
- Cucchi T, Vigne JD, Auffray JC (2005). First occurrence of the house mouse (*Mus musculus domesticus* Schwarz & Schwarz, 1943) in the Western Mediterranean: a zooarchaeological revision of subfossil occurrences. *Biol J Linn Soc* **84**: 429–445.
- Dorken ME, Pannell JR (2007). The maintenance of hybrid zones along a disturbance gradient. *Heredity* **99**: 89–101.
- Endler JA (1977). *Geographic Variation, Speciation and Clines*. Princeton University Press: Princeton.
- Faria R, Navarro A (2010). Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol Evol* **25**: 660–669.
- Fel-Clair F, Lenormand T, Catalan J, Grobert J, Orth A, Boursot P, Viroux MC, Britton-Davidian J (1996). Genomic incompatibilities in the hybrid zone between house mice in Denmark: evidence from steep and non-coincident chromosomal clines for Robertsonian fusions. *Genet Res* **67**: 123–134.
- Ford CE (1966). The use of chromosome markers. In: *Tissue Grafting and Radiation*. Academic Press: New York, pp 197–206.
- Franchini P, Castiglia R, Capanna E (2007). Reproductive isolation between chromosomal races of the house mouse *Mus musculus domesticus* in a parapatric contact area revealed by an analysis of multiple unlinked loci. *J Evol Biol* **21**: 502–513.

- Franchini P, Colangelo P, Solano E, Capanna E, Verheyen E, Castiglia R (2010). Reduced gene flow at pericentromeric loci in a hybrid zone involving chromosomal races of the house mouse. *Mus musculus domesticus* *Evol* **64**: 2020–2032.
- Gazave E, Catalan J, Ramalinho MG, Mathias ML, Nunes C, Dumas D, Britton-Davidian J, Auffray JC (2003). The non-random occurrence of Robertsonian fusion in the house mouse. *Genet Res* **81**: 33–42.
- Gündüz I, López-Fuster MJ, Ventura J, Searle JB (2001). Clinal analysis of a chromosomal hybrid zone in the house mouse. *Genet Res* **77**: 41–51.
- Gündüz I, Pollock CL, Giménez MD, Förster DW, White TA, Sans-Fuentes MA, Hauffe HC, Ventura J, López-Fuster MJ, Searle JB (2010). Staggered Chromosomal Hybrid Zones in the House Mouse: Relevance to Reticulate Evolution and Speciation. *Genes* **1**: 193–209.
- Gropp A, Winking H (1981). Robertsonian translocations: cytology, meiosis, segregation pattern and biological consequences of heterozygosity. Symposia of the Zoological Society of London. In: Berry RJ (ed.) *Biology of the House Mouse*. Academic press: London, pp 141–181.
- Harrison RG (1990). Hybrid zones: windows on evolutionary process. In: Futuyma D, Antonovics J (eds) *Evolutionary Biology*. Oxford University Press: Oxford. Vol. 7, pp 69–128.
- Hauffe HC, Searle JB (1993). Extreme karyotypic variation in a *Mus musculus domesticus* hybrid zone: The tobacco mouse story revisited. *Evolution* **47**: 1374–1395.
- Hauffe HC, Searle JB (1998). Chromosomal heterozygosity and fertility in house mice (*Mus musculus domesticus*) from northern Italy. *Genetics* **150**: 1143–1154.
- Hausser J, Fedyk S, Fredga K, Searle JB, Volobouev V, Wójcik JM, Zima J (1994). Definition and nomenclature of the chromosome races of *Sorex araneus*. *Folia Zoologica* **43**: 1–9.
- Hedrick PW (1981). The establishment of chromosomal variants. *Evolution* **35**: 322–332.
- Leaché AD, Cole CJ (2007). Hybridization between multiple fence lizard lineages in an ecotone: locally discordant variation in mitochondrial DNA, chromosomes, and morphology. *Mol Ecol* **16**: 1035–1054.
- Mandahl N (1992). Methods in solid tumour cytogenetics. In: *Human Cytogenetics. A Practical Approach*. IRL Press: London. Vol. II, pp 155–187.
- Michalakis Y, Olivieri I (1993). The influence of local extinctions on the probability of fixation of chromosomal rearrangements. *J Evol Biol* **6**: 153–170.
- Muñoz-Muñoz F, Sans-Fuentes MA, López-Fuster MJ, Ventura J (2003). Non-metric morphological divergence in the western house mouse, *Mus musculus domesticus*, from the Barcelona chromosomal hybrid zone. *Biol J Linn Soc* **80**: 313–322.
- Muñoz-Muñoz F, Sans-Fuentes MA, López-Fuster MJ, Ventura J (2006). Variation in fluctuating asymmetry levels across a Robertsonian polymorphic zone of the house mouse. *J Zool Syst Evol Res* **44**: 236–250.
- Muñoz-Muñoz F, Sans-Fuentes MA, López-Fuster MJ, Ventura J (2011). Evolutionary modularity of the mouse mandible: dissecting the effect of chromosomal reorganizations and isolation by distance in a Robertsonian system of *Mus musculus domesticus*. *J Evol Biol* **24**: 1763–1776.
- Nachman MW, Boyer SN, Searle JB, Aquadro CF (1994). Mitochondrial DNA variation and the evolution of Robertsonian chromosomal races of house mice. *Mus domesticus* *Genet* **136**: 1105–1120.
- Nachman MW, Searle JB (1995). Why is the mouse karyotype so variable? *Trends Ecol Evol* **10**: 397–402.
- Nunes AC, Britton-Davidian J, Catalan J, Ramalinho MG, Capela R, Mathias ML, Ganem G (2005). Influence of physical environmental characteristics and anthropogenic factors on the position and structure of contact zone between two chromosomal races of the house mouse on the island of Madeira (North Atlantic, Portugal). *J Biogeography* **32**: 2123–2134.
- Nunes AC, Catalan J, Lopez J, Ramalinho MG, Mathias ML, Britton-Davidian J (2011). Fertility assessment in hybrids between monobrachially homologous Rb races of the house mouse from the island of Madeira: implications for modes of chromosomal evolution. *Heredity* **106**: 348–356.
- Piálek J, Hauffe HC, Searle JB (2005). Chromosomal variation in the house mouse. *Biol J Linn Soc* **84**: 535–563.
- Raymond M, Rousset F (1995). GENEPOP software: Population genetics software for exact tests and ecumenism. *J Hered* **86**: 248–249.
- Riginos C, Nachman MW (1999). The origin of a Robertsonian chromosomal translocation in house mice inferred from linked microsatellite markers. *Mol Biol Evol* **16**: 1763–1773.
- Rousset F, Raymond M (1995). Testing heterozygotes excess and deficiency. *Genetics* **140**: 1413–1419.
- Sage RD, Atchley WR, Capanna E (1993). House mice as models in systematic biology. *Syst Biol* **42**: 523–561.
- Said K, Auffrey JC, Boursot P, Britton-Davidian J (1999). Is chromosomal speciation occurring in house mice in Tunisia? *Biol J Linn Soc* **68**: 387–399.
- Sans-Fuentes MA (2004). *Estudio biológico de Mus domesticus Ruddy, 1772 en una zona de polimorfismo Robertsoniano*. PhD Thesis Universitat de Barcelona: Barcelona.
- Sans-Fuentes MA, López-Fuster MJ, Ventura J, Diez-Noguera A, Cambras T (2005). Effect of Robertsonian translocations on circadian rhythm of motor activity in house mouse. *Behav Genet* **35**: 603–613.
- Sans-Fuentes MA, Muñoz-Muñoz F, Ventura J, López-Fuster MJ (2007). Rb(7.17), a rare Robertsonian fusion in wild populations of the house mouse. *Genet Res* **89**: 207–213.
- Sans-Fuentes MA, Ventura J, López-Fuster MJ, Corti M (2009). Morphological variation in house mice from the Robertsonian polymorphism area of Barcelona. *Biol J Linn Soc* **97**: 555–570.
- Sans-Fuentes MA, García-Valero J, Ventura J, López-Fuster MJ (2010). Spermatogenesis in house mouse in a Robertsonian polymorphism zone. *Reproduction* **140**: 560–581.
- Searle JB (1993). Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. In: Harrison RG (ed.) *Hybrid Zones and Evolutionary Process*. Oxford University Press: Oxford, pp 309–353.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995). *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 3rd edn. Freeman WH, New York, p 887.
- Szymura JM, Barton NH (1986). Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toads, *Bombina orientalis* and *B. variegata*, near Cracow in southern Poland. *Evolution* **40**: 1141–1159.
- Wallace BM, Searle JB, Everett CA (1992). Male meiosis and gametogenesis in wild house mouse (*Mus musculus domesticus*) from a chromosomal hybrid zone. A comparison between 'simple' Robertsonian heterozygotes and homozygotes. *Cytogenet Cell Genet* **6**: 211–220.
- Wallace BM, Searle JB, Everett CA (2002). The effect of multiple simple Robertsonian heterozygosity on chromosome pairing and fertility of wild-stock house mice (*Mus musculus domesticus*). *Cytogenet Genome Res* **96**: 276–286.
- Weir BS (1990). *Genetic data analysis*. Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts.
- Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358–1370.
- Winking H (1986). Some aspects of Robertsonian karyotype in European wild mice. *Curr Top Microbiol Immunol* **127**: 68–74.
- Yannic G, Basset P, Hausser J (2009). Chromosomal rearrangements and gene flow over time in an inter-specific hybrid zone of the *Sorex araneus* group. *Heredity* **102**: 616–625.

## APPENDIX Individual karyotypes corresponding to the 2008–2010 period

Site	N	2n	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
a. Garraf	1	29	H	M	M	M	A	M	M
	1	29	M	M	H	H	H	M	M
	1	30	M	M	H	H	H	H	M
	1	31	H	M	H	H	A	M	M
	1	32	H	H	H	H	A	M	M
	1	32	M	M	H	A	A	M	H
	1	32	H	M	H	H	A	M	H
	1	32	H	M	A	H	A	M	M
	1	32	H	H	M	H	A	H	M
	1	33	H	M	A	A	A	M	M
	1	36	A	H	H	A	A	H	H
	1	38	A	H	A	A	A	A	H
	1	40	A	A	A	A	A	A	A
b. Sant Pau d'Ordal	1	34	A	H	H	M	A	H	H
c. La Granada	1	29	M	M	M	M	A	H	M
	1	30	M	M	M	A	A	M	M



APPENDIX (Continued)

Site	N	2n	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
	1	31	H	M	H	M	A	M	H
	1	31	H	M	M	H	A	M	H
	1	31	H	H	M	H	A	M	M
	1	31	A	M	M	H	A	M	M
	1	31	H	M	M	A	A	M	M
	1	32	H	M	M	H	A	H	H
	1	32	H	H	M	A	A	M	M
	3	32	H	M	H	H	A	H	M
	1	32	M	M	H	A	A	M	H
	1	32	A	M	H	H	A	M	M
	1	33	A	H	M	H	A	M	H
	1	34	A	H	M	H	A	H	H
d. Corbera de Llobregat	1	36	A	A	A	A	A	M	M
	1	36	A	M	A	A	A	H	H
	1	36	A	M	H	A	A	H	A
	1	37	A	H	H	A	A	H	A
	1	37	A	M	A	A	A	H	A
	1	37	A	A	A	A	A	H	M
	1	38	A	M	A	A	A	A	A
	1	39	A	H	A	A	A	A	A
e. Gavà	1	29	M	M	M	H	A	M	M
	4	30	A	M	M	M	A	M	M
	3	30	H	M	M	H	A	M	M
	1	30	H	M	H	M	A	M	M
	1	30	H	H	M	M	A	M	M
	1	31	H	H	H	M	A	M	M
	1	31	A	M	M	H	A	M	M
	1	36	A	H	H	A	A	H	H
	1	-	-	-	-	-	-	-	-
f. Vilanova i la Geltrú	1	31	H	M	M	A	A	M	M
	2	33	A	M	M	A	A	H	M
	1	33	A	H	M	A	A	M	M
	1	34	A	M	M	A	A	H	H
	1	38	H	A	A	A	A	H	A
g. Viladecans	2	30	H	M	M	H	A	M	M
	1	30	H	H	M	M	A	M	M
	1	31	A	M	M	M	A	H	M
	1	32	M	H	M	H	A	H	H
	2	32	A	M	H	M	A	M	H
	1	34	H	H	H	A	A	M	H
	1	34	A	H	H	H	A	M	H
h. Sant Martí Sarroca	1	31	A	M	M	A	H	M	M
	1	32	A	M	M	A	A	M	M
	2	32	A	M	M	A	A	M	M
	1	32	A	M	H	A	H	M	M
	2	34	A	M	H	A	A	M	H
	1	34	A	M	A	A	A	M	M
	1	34	A	M	H	A	A	H	M
i. El Prat de Llobregat	1	29	H	M	M	M	A	M	M
	2	30	H	M	M	H	A	M	M
	1	30	A	M	M	M	A	M	M
	1	31	H	M	M	H	A	M	H
	1	31	A	M	M	H	A	M	M
	3	31	A	M	M	M	A	H	M

## APPENDIX (Continued)

Site	N	2n	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
	1	31	H	M	M	A	A	M	M
	2	31	A	H	M	M	A	M	M
	1	31	H	H	M	M	A	H	M
	3	32	A	H	M	H	A	M	M
	1	32	A	A	M	M	A	M	M
	1	32	A	H	M	M	A	H	M
	1	33	A	M	H	H	A	M	H
	1	33	A	H	M	H	A	M	H
	1	33	A	H	M	H	A	H	M
	2	33	A	H	H	H	A	M	M
	1	33	A	M	M	H	A	H	H
	1	34	A	H	M	H	A	A	M
	1	34	A	H	H	H	A	M	H
	1	34	H	H	H	A	A	H	M
j. Cubelles	1	32	A	H	M	H	A	M	M
	1	33	H	H	H	H	A	M	H
	1	33	A	H	M	A	A	M	M
	1	33	A	M	M	H	A	M	A
	1	34	A	H	H	A	A	M	M
	1	34	A	M	M	A	A	A	M
	1	34	A	H	M	A	A	M	H
	1	35	A	H	H	H	A	H	H
	1	35	A	A	M	A	A	M	H
	1	36	A	A	H	A	A	H	M
	1	36	A	H	A	H	A	H	H
	1	36	A	H	H	A	A	H	H
	1	38	A	A	A	A	A	H	H
	1	39	A	A	H	A	A	A	A
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
k. Sant Sadurní d'Anoia	1	35	A	H	A	A	A	M	M
	1	35	A	M	A	A	A	H	M
	1	35	A	M	A	A	A	M	H
	1	36	A	H	A	A	A	H	M
	1	36	A	M	A	A	A	H	H
	1	37	A	M	A	A	A	A	H
	1	37	A	H	A	A	A	M	A
	2	37	A	H	A	A	A	H	H
	1	37	A	M	A	A	A	H	A
	1	38	A	M	A	A	A	A	A
	2	38	A	H	A	A	A	H	A
	2	38	A	H	A	A	A	A	H
	1	38	A	A	A	A	A	A	M
	2	39	A	H	A	A	A	A	A
	1	39	A	A	A	A	A	A	H
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
l. Calafell	1	37	A	H	A	H	A	H	A
	1	37	H	H	A	A	A	A	H
	1	37	H	A	A	A	A	A	M
	1	37	A	M	A	A	A	A	H
	1	37	A	H	A	A	A	A	M
	1	37	A	H	A	H	A	A	H
	1	37	H	H	A	A	A	A	H
	1	37	A	H	A	A	A	A	M
	1	38	A	H	A	A	A	H	A
	4	38	A	A	A	A	A	H	H
	1	38	A	H	A	A	A	A	H
	1	38	A	A	A	H	A	A	H
	1	38	A	H	A	A	A	A	H
	3	39	A	A	A	A	A	A	H

**APPENDIX (Continued)**

Site	N	2n	3.8	4.14	5.15	6.10	7.17	9.11	12.13
m. El Papiol	1	36	A	A	M	A	A	M	A
	2	37	A	A	H	A	A	M	A
	2	38	A	H	A	A	A	A	H
	2	38	A	A	A	A	A	M	A
	1	39	A	A	A	A	A	H	A
n. Bellvei	1	35	A	A	M	A	A	H	M
	1	35	A	H	A	H	A	M	H
	1	36	A	H	A	A	A	H	M
	1	37	A	M	A	A	A	A	H
	1	37	A	A	M	H	A	A	A
	1	37	A	A	A	H	A	H	H
o. Bellaterra	7	40	A	A	A	A	A	A	A
p. Vacarisses	7	40	A	A	A	A	A	A	A
q. Badalona	11	40	A	A	A	A	A	A	A
	2	39	-	-	-	-	-	-	-
r. Sta. Perpètua de la Mogoda	10	40	A	A	A	A	A	A	A
s. Les Pobles	11	40	A	A	A	A	A	A	A
	2	39	A	A	H	A	A	A	A
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
t. Castellar del Vallès	8	40	A	A	A	A	A	A	A
u. Jorba	1	39	A	H	A	A	A	A	A
	2	40	A	A	A	A	A	A	A
v. Castellfollit del Boix	14	40	A	A	A	A	A	A	A
w. Caldes de Montbuí	2	40	A	A	A	A	A	A	A
x. Santa Coloma de Queralt	2	36	A	M	H	A	A	A	H
	1	36	A	M	M	A	A	A	A
	1	37	A	H	H	A	A	A	H
	1	37	A	H	M	A	A	A	A
	2	38	A	H	A	A	A	A	H
y. Fals	3	40	A	A	A	A	A	A	A
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
z. Nulles	7	40	A	A	A	A	A	A	A
aa. Ametlla de Segarra	1	38	A	M	A	A	A	A	A
	3	39	A	H	A	A	A	A	A
	5	40	A	A	A	A	A	A	A
ab. Olost	16	40	A	A	A	A	A	A	A
ac. Arbeca	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	40	A	A	A	A	A	A	A

Abbreviations: A, homozygote acrocentric; H, heterozygote metacentric; M, homozygote metacentric; N, number of individuals.



# **Agraïments**

---



És curiós lo ràpid que passa el temps. Tot just fa un sospir que vaig entrar al departament a fer unes simples pràctiques en empresa i per aquelles coses que té la vida m'adono que ja han passat més de cinc anys i que en breu sortiré d'aquí amb un títol de doctora sota el braç. Han estat uns anys intensos, plens de moments inoblidables, somriures i també d'algunes llàgrimes. Uns anys de superació personal i professional. Uns anys que han convertit aquella jove entusiasta dels animalons en una investigadora titulada. Uns anys que romandran dins del meu cor per sempre més. És per això que voldria donar les gràcies a tots aquells que m'han acompanyat al llarg d'aquest camí, a tots aquells que m'han donat suport i energia per continuar en els bons i no tant bons moments, a tots aquells que han fet possible que aquesta tesi sigui una realitat.

Així doncs, en primer lloc agraeixo als meus directors de tesi haver-me acollit al seu grup d'investigació i donar-me l'oportunitat de créixer i col·laborar en la línia de recerca. Gràcies Jacint i Pepa.

Al Francesc, el meu germà gran de la ciència, que sempre està allà per donar-te un cop de mà amb el que sigui. Em sento molt afortunada d'haver compartit aquesta experiència amb tant gran persona i tant gran científic. Ets el millor exemple a seguir i tant de bo algun dia arribi a semblar-me (encara que només sigui una miqueta) a tu. Moltes gràcies de tot cor!!

A les meves companyes de departament tots els grans 'momentazos' que m'han regalat durant aquesta etapa. Anna, Carolina, Ces, Laia, "Plega" (no t'enfadis Laiona ^^)... enyoraré moltíssim els vostres robatoris furtius de xocolata, els moments de cotilleo amb pipes/coffee i com no, el vostre suport en èpoques de frustració. Sou unes grans companyes, em sento molt feliç d'haver-les conegut!! També voldria agrair a les nenes de vete les bones estones que hem passat preparant pica-piques i reunions de departament superinteressants entre d'altres activitats variopintes.

A l'Anna, Cris, Francesc, Marco, Marta, Mili, Nitú, Rubén i Sandra, els meus compis de dinars (o millor dit, d'ex-dinars) Cresils/Torreferrussils que sempre aconsegueixen treure'm un somriure a l'hora d'anar a pels coffees.



Gràcies per compartir tantes bones anècdotes quotidianes i discussions filosòfiques sobre com salvar el món!!

A totes aquelles persones que m'han donat un cop de mà en les feines de camp i laboratori... María, Ramón, Jéssica, Laia... sense vosaltres no hagués estat possible fer tantíssims protocols de forma simultània!!! I al Manolo i a l'Encarna, els nostres estimats tècnics de departament, per estar sempre disposats a tirar-te un flotador quan més ho necessites!!

A la doctora Silvia Garagna i al seu meravellós equip de recerca per acollir-me amb els braços ben oberts al seu laboratori de Pavia. Valeria, Mario, Martina, Paola, Giulia, Danillo, grazie mille per il vostro aiuto, fiducia e grande momenti che mi hai dato!!! Spero che ci possiamo vedere prestísimo!!

A les noves generacions que lluiten per entendre perquè nassos la nostra zona de polimorfisme és diferent de la resta. Jéssica i Laia us encoratjo per seguir endavant i buscar noves peces que ajudin a donar sentit a aquest meravellós trencaclosques de polimorfismes.

A l'equip de secretaria del departament, i molt especialment a la Pilar i a l'Òscar, per facilitar-me tantíssim portar al dia els temes de burrocàcia de la tesi i borses de viatge.

I com no podia ser d'una altra manera, voldria agrair les tones de paciència que ha tingut la meva família amb mi. Gràcies per suportar el meu mal humor, horaris indecents i preocupacions varies durant aquests anys. Tot i que no en sigueu massa conscients, m'heu ajudat moltíssim a sobreportar el pes que m'ha comportat fer aquesta tesi. També voldria fer un especial èmfasi a tota la feina que ha fet el meu pare per aquest projecte, gràcies per acompanyar-me a fer les captures i per haver-me permès gaudir de tants bons moments amb tu, no hi ha prou paraules en aquest món per poder descriure lo eternament agraïda que t'estic...

A tots els meus amics de la cuchipandi, i molt especialment a l'Aurora, la Débora, la Eli i al Víctor (fotògraf especialista en treure guapos als meus ratis ^^). Gràcies per fer-me tocar de peus a terra quan toca, per fer-me riure amb les vostres idees de bomber, per aguantar amb dignitat els 'tostones' que us foto



i per regalar-me tants anys de felicitat i aventurilles. Sou els millors amics que es pot tenir!!!!

Al Pablo, milers de gràcies per la teva paciència amb les meves cabòries, per escoltar-me i recolzar-me en tot moment, per fer-me adquirir una nova perspectiva de les coses i per dibuixar-me un gran somriure al cor. Gràcies per atrevir-te a ser el company d'una doctoranda casada amb la seva tesi!!!

Per finalitzar, voldria donar les gràcies a tots els propietaris de les granges, masies i hípiques que s'han ofert a col·laborar amb nosaltres. Gràcies per creure en nosaltres i contribuir en l'estudi de la zona de polimorfisme robertsonià de Catalunya, sense vosaltres res d'això hagués estat possible.

